



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Nuevos protagonistas de la regulación transcripcional del frijol
para la simbiosis fijadora de nitrógeno con *Rhizobium etli*.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. LITZY AYRA PARDO

TUTORA PRINCIPAL
DRA. GEORGINA HERNÁNDEZ DELGADO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS UNAM

COMITÉ TUTORAL

DRA. MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS UNAM

DR. OSWALDO VALDÉS-LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

Tesis Doctoral:

Nuevos protagonistas de la regulación transcripcional del frijol para la simbiosis fijadora de nitrógeno con *Rhizobium etli*.

que para obtener el grado de Doctora en Ciencias presenta:
Litzy Ayra Pardo

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Georgina Hernández Delgado, del Programa de Genómica Funcional de Eucariontes del Centro de Ciencias Genómicas/UNAM.

El Comité Tutorial que evaluó el avance del presente proyecto de investigación se compuso por los Dres. Georgina Hernández Delgado, María de Lourdes Girard Cuesy y Oswaldo Valdés-López.

El Jurado de la réplica oral de este trabajo de investigación se compuso por los Dres María del Carmen Monserrat Quinto Hernández, Adriana Garay Arroyo, Damien Jean René Formey de Saint Louvent, José Luis Reyes Taboada y Georgina Hernández Delgado.

LAP recibió una beca para estudios de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 582722) y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA)-UNAM por medio del proyecto IN203819, así como apoyo para una estancia de investigación en el extranjero por parte del CONACYT y del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM. El trabajo experimental fue financiado, principalmente, por donativos a GH de CONACyT (A1-S-22570) y PAPIIT (IN203819).

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se la dedico en primer lugar a mi hijo Albertico, que desde muy pequeño no dejó de brindarme apoyo, amor, y de hacerme reír con cada una de sus ocurrencias para brindarme la fuerza que permitió no abandonar esta meta y poder alcanzar este gran logro personal. Por supuesto, le estoy agradecida inmensamente a mis padres Fernando y Nereida, por el cuidado excelente que le han dado a mi niño. Por los valores que me transmitieron, la confianza que tuvieron en mí. A mis hermanos Enrique y Camilo, que siempre han sido el ejemplo para seguir y los admiro muchísimo.

A mi tutora Georgina Hernández (cariñosamente Gina). Mi historia con Gina comenzó hace varios años. En el momento que me dio la oportunidad de aceptarme en su laboratorio, cuando le pedí una corta estancia y que me enseñara de las técnicas que usaban en su grupo de trabajo. Me formó, me permitió conocer una cultura diferente, me llevó a museos, me brindó su tiempo y fue tan linda su hospitalidad que sentí unos deseos enormes de regresar. Entonces juntas nos presentamos a la beca doctoral, le agradezco infinitamente su confianza en mí. No fue fácil al inicio, tantos trámites migratorios, cumpleaños y otras fechas tan significativas para mí y tan lejos de la familia, encontrar renta, aprender de las diferencias culturales, pero es frente a cada dificultad que uno crece y se hace más fuerte. Gina, además de su dirección y su enseñanza, me brindó su casa, me regaló su amistad, su afecto y su paciencia, por eso Gina, mi más sincera y mayor gratitud es para ti también.

A Joel Gómez, por tu paciencia, tu apoyo incondicional, por acompañarme varios fines de semana a regar las plantas y ayudarme en mis experimentos, a hacer los gráficos de R, la filogenia. Por llevarme a conocer otros estados de México, por cumplir mis sueños en Europa. Por emocionarte con cada logro que

te contaba, por apoyarme siempre y por todo tu amor. Mi gratitud también es para Mariana, por todas las atenciones y el cariño que me brindó.

A Lupita y toda su familia incluyendo a sus padres en Puente de Ixtla, por el alojamiento en su casa, por compartir varias cenas, excursiones y momentos inolvidables, te quiero como a una hermana mi estimada amiga.

Al Dr. Oswaldo Valdés-López de la FES Iztacala, por toda la asesoría en el transcurso de este proyecto, por sus sugerencias en cada examen tutorial y por brindarme la oportunidad de poder continuar superándome en su grupo de trabajo. A las jóvenes de su laboratorio Rocío, Carolina y Socorro (Coco), excelentes muchachas, gracias por el aporte que hicieron a la tesis y ayudarme siempre que socorrí a ustedes.

A la Dra Maluye, por sus sugerencias también en mis exámenes y por brindarme un espacio en su laboratorio y los recursos necesarios para cumplir con algunas etapas del proyecto. Muchísimas gracias también a Maritza, Susana y especialmente a Paz por todo lo que me enseñó con tanta bondad.

A la Dra. Adriana Garay, por estar presente en el examen que permitió entrar a este doctorado, luego en mi examen de candidatura y por darme todas las herramientas para explorar nuevas bases de datos y colaborar en nuestro proyecto.

A mi grupo de trabajo en el Laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes: A los Dres. Mario Ramírez, Mario Serrano, Damien Formey, Alex Thromas, por las recomendaciones, profesionalidad, la amistad y el apoyo que siempre me brindaron. A todos los investigadores y becarios, especialmente a Ivette, Wendy, Jhordan, que a pesar de las restricciones por Covid, no dejamos de encontrarnos en el laboratorio cada uno inmerso en sus proyectos, pero siempre dándonos apoyo, y compartiendo los mejores cafés, de esos que se toman entre amigos. A Sarita, por regalarme un abrazo cuando más lo necesitaba, por su

apoyo incondicional, sus consejos y transferirme su experiencia y sus conocimientos en el trabajo con el frijol. A Martha, por escucharme, aconsejarme y por nuestra gran amistad. A todos mis compañeros: María Antonieta (Maru), Gladys, Víctor, Adriana, Alfonso, Melissa, Ana Karen, Pedrito, Jhonatan, Bárbara Nova, Luis Pedro, Don Enrique, Sandra y Vicky (por los gratos momentos que compartimos juntos).

A La Universidad de la Habana en Cuba, por la formación que en sus aulas pude obtener y especialmente a los Dres. Eduardo Ortega, Rosa Rodés y Ana Rosa Blanco, excelentes profesores que me hicieron valorar la docencia tanto como a la investigación, por la amistad y por todos los conocimientos que me transmitieron. También, a los profesores que tuve acá en México en el Instituto de Biotecnología (IBT), el Instituto de Biomédicas y el Instituto de Ecología. Gracias por el tiempo dedicado, los conocimientos transmitidos y por preparar tantas generaciones de alumnos.

Le agradezco infinitamente a la UNAM, a esta gran universidad, pero en especial, le agradezco al Centro de Ciencias Genómicas, esta gran institución de la cual me siento muy orgullosa por haberme seguido formando en sus aulas, laboratorios, auditorio, por haber habitado en “Las Casitas”. A la Dra. Susana Brom, al Dr. David Romero, a Denny Abigail, a Malena, al contador Pablo, la Licenciada Mirna, el Dr. Christian Sohlenkamp, a Gustavo, Luis Antonio, Toño, los ATIS de la Licenciatura, a Waldo, Joe Espiritu, los vigilantes, en fin, a TODOS los trabajadores del CCG que también han contribuido con su trabajo a que mi estancia aquí en México haya sido la mejor.

A mi amigo Remo y su familia. A Marisel y a José, a Laura Hernández, por los momentos tan bonitos y divertidos que pasamos juntos y la gran amistad que nos une a pesar de la distancia. A mis amistades en el Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas en Valencia; los Dres. Luis Cañas y Concepción

Mena (Concha), a Rim, Edelyn, Mary Cruz, Analuz, Eva y a Marisol, fue un placer poder conocerlos y trabajar con ustedes, les agradezco todos los conocimientos que me aportaron.

A migración por el otorgamiento de residencias temporales para mis padres y mi hijo, que pudieron venir a conocer esta hermosa ciudad y compartir también junto a mis amigos.

Para todos los que me han apoyado siempre. ¡¡¡Muchas Gracias!!!

ÍNDICE	
RESUMEN.	9
ABSTRACT.	10
LISTA DE FIGURAS.	11
LISTA DE TABLAS.	13
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	14
I.1 Importancia de las leguminosas y del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	14
I.2 Asociación simbiótica fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios.	15
1.2.1 Etapas iniciales.	15
I.2.2 Organogénesis y función de los nódulos.	21
I.2.3 Senescencia de nódulos	25
I.2.4 Vías para la regulación del número de nódulos.	26
I.2.5 Factores transcripcionales de plantas relacionados a la simbiosis.	29
I.2.6 Regulación postranscripcional mediada por miRNAs a FT de la simbiosis.	32
I.3 Factores transcripcionales con dominio MADS/AGL.	36
HIPÓTESIS	39
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.	39
II.1 Objetivo General.	39
II.2 Objetivos particulares.	39
CAPÍTULO III. Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-domain/ AGL Transcription Factors.	41
CAPÍTULO IV Papel de <i>PvFUL</i>-like en el desarrollo de raíz de Arabidopsis.	60
IV.1 Antecedentes del Capítulo IV.	60
IV.2 Objetivo del Capítulo IV.	62
IV.3 Materiales y Métodos del Capítulo IV.	62
IV.3.1 Material vegetal, construcción genética y condiciones de crecimiento.	62
IV.3.2 Caracterización fenotípica de la raíz.	63
IV.3.3 Microscopía.	63
IV.4 Resultados y Discusión del Capítulo IV.	64
IV.4.1 Fenotipo de raíz en la mutante <i>ful-1</i>.	64
IV.4.2 Transformación genética de <i>ful-1</i> con <i>PvFUL</i>-like y caracterización de las plantas transgénicas.	67
IV.5 Perspectivas del capítulo IV.	68

CAPÍTULO V Factores transcripcionales del frijol pertenecientes a la familia <i>SHI/STY/SRS</i> como reguladores claves para el desarrollo y funcionamiento de nódulos en la asociación simbiótica con <i>R. etli</i>.	72
V.1 Antecedentes del Capítulo V.	72
V.2 Objetivo del capítulo V.	74
V.3 Materiales y Métodos del Capítulo V.	74
V.4 Resultados y Discusión del Capítulo V.	76
V.4.1 Análisis de la expresión de los genes <i>PvSTY</i> en raíces y nódulos de plantas de frijol común en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.	76
V.4.2 Identificación de elementos <i>cis</i> reguladores en el promotor <i>PvSTY10</i>.	79
V.4.3 ¿Es regulado el gen <i>STY</i> de frijol por la vía de señalización NIN-NFY?	82
V.5 Perspectivas del Capítulo V.	84
CAPÍTULO VI DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.	86
CAPÍTULO VII REFERENCIAS.	92

RESUMEN.

Las leguminosas, de gran importancia agronómica como alimento o forraje, son capaces de establecer simbiosis con las bacterias fijadoras de N₂, conocidas como rizobios. En esta simbiosis la planta desarrolla los nódulos radicales en donde se aloja el rizobio y fija N₂ atmosférico en formas que pueden ser asimiladas por la planta. La fijación simbiótica de N₂ es importante para la agricultura sustentable, desde el punto de vista ecológico y económico porque reduce el costo de fertilizantes químicos. A pesar de su importancia, aún son muy pocos los factores de transcripción (FT) de las leguminosas para los que se ha demostrado su función. El genoma del frijol (*Phaseolus vulgaris*), la leguminosa más importante para el consumo humano en el mundo codifica 3,726 genes que corresponden a FT, los cuales son proteínas reguladoras maestras que controlan la expresión génica en respuesta a diferentes estímulos. En las plantas los FT son esenciales para regular diferentes procesos y se han clasificado en diferentes familias génicas. En este trabajo de tesis se analizaron los FT de la familia MADS/AGL (PvAGL) y de la familia STY (PvSTY) del frijol para elucidar su función en la regulación transcripcional de la simbiosis con *Rhizobium etli*. Los FT MADS/AGL de plantas se han caracterizado principalmente como reguladores del desarrollo de la flor y de la transición a la floración. Recientemente se ha demostrado la participación de los FT MADS (ANR1; XAL1; XAL2; AGL19; AGL17; AGL21 y AGL16) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y nuestro análisis filogenético muestra que, en las cuatro especies de leguminosas analizadas, hay genes ortólogos a esos genes MADS de *A.thaliana*, que tienen alta expresión tanto en la raíz como en el nódulo. Los datos presentados en esta tesis atestiguan la relevancia de los PvAGL como reguladores positivos de varios procesos en la simbiosis entre frijol-rizobios como: el desarrollo de raíz, la infección por rizobios, la organogénesis y el funcionamiento de los nódulos, así como el mecanismo de auto regulación de la nodulación a través de la interacción con PvNIN, el regulador maestro de la simbiosis. Además, proponemos que la familia de genes *STY* en el frijol común está involucrada tanto en la regulación de la simbiosis con *R.etli* como en el desarrollo de raíces y pudieran ser regulados transcripcionalmente por FT de las familia NF-Y y AGL. El conocimiento aportado sobre el papel de estos FT como reguladores de la simbiosis fijadora de nitrógeno, puede ser relevante para el desarrollo de sistemas agrícolas que protejan el medio ambiente y sean capaces de cubrir la demanda de alimentos de la población.

ABSTRACT.

Legumes, of great agronomic importance as food or forage, can establish symbiosis with N₂-fixing bacteria, known as rhizobia. In this symbiosis, the plant develops the root nodules where the rhizobia establish and fix atmospheric N₂ into compounds that can be assimilated by the plant. The symbiotic N₂ fixation is important for sustainable agriculture, from the ecological and economic point of view because it reduces the cost of chemical fertilizers. Despite their importance, there are still very few legumes transcription factors (TF) of whose function has been demonstrated. TF are master regulatory proteins that control gene expression in response to different stimuli. In plants, TF are essential for regulating different processes and these have been classified into different gene families. The common bean genome, the most important legume for human consumption in the world, encodes 3,726 genes of TF. In this thesis work, we analyzed the TF from the MADS/AGL (PvAGL) and the STY families (PvSTY) from common bean to elucidate their role in the transcriptional regulation of the symbiosis with *Rhizobium etli*. The plants' MADS / AGL TF have been characterized primarily as regulators of flower development and transition to flowering. The participation of MADS (ANR1; XAL1; XAL2; AGL19; AGL17; AGL21 and AGL16) TF in *Arabidopsis thaliana* root development has been recently demonstrated. Our phylogenetic analysis shows that in the four legume species analyzed, there are genes orthologous to those *A. thaliana* MADS genes, which have high expression both in the roots and nodules. The data presented in this thesis testify the relevance of PvAGL as positive regulators of various processes in the common bean-rhizobia symbiosis such as: root development, rhizobial infection, nodule organogenesis and function, as well as the autoregulation of nodulation, through interaction with PvNIN, the master regulator of symbiosis. In addition, we propose that common bean STY TF are involved both in the regulation of symbiosis with *R. etli* and in the development of roots, and could be probably transcriptionally regulated by TF from the NF-Y and AGL families. The knowledge provided on the role of these TF as regulators of nitrogen-fixing symbiosis may be relevant for the development of agricultural systems that protect the environment and can meet the population's demand for food.

LISTA DE FIGURAS.

Figura I.1. Estructura generalizada de un flavonoide

Figura I.2. Estructura de Factores Nod (FN) de *Sinorhizobium meliloti* y de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* que nodulan en *Medicago* spp o en *Pisum* y *Vicia* spp, respectivamente.

Figura I.3. Receptores simbióticos.

Figura I.4. Señalización río abajo de las oscilaciones de calcio en el proceso simbiótico.

Figura I.5. Proceso de infección en la simbiosis Rhizobium-Leguminosa.

Figura I.6. Esquema que muestra las etapas de desarrollo de nódulos indeterminados y determinados de leguminosas.

Figura I.7. Transporte y metabolismo en una célula infectada del nódulo.

Figura I.8. Vía de señalización molecular para la auto regulación de la nodulación (AON).

Figura I.9. Nodulación regulada por fuentes exógenas de nitrato.

Figura I.10| Biogénesis de miRNA en plantas.

Figura I.11. Representación esquemática de los dominios presentes en proteínas MADS de plantas, animales y hongos Tipo I (SRF-like) y Tipo II (MEF2-like).

Figure III.1 Maximum likelihood phylogenetic tree of the AGL-TFs from *Phaseolus vulgaris* (blue), *Glycine max* (black), *Medicago truncatula* (red), *Lotus japonicus* (green) and *Arabidopsis thaliana* (orange).

Figure III.2 Expression profile by tissue of AGL genes from different plant species grouped in clades including Arabidopsis AGLs highly expressed in roots.

Figure III.3 Expression analysis of *P. vulgaris* AGL genes highly expressed in root/nodules.

Figure III.4 Common bean transgenic roots expressing the RNAi_AGL, EV or OE_FUL constructs.

Figure III.5 Response to rhizobial infection of transgenic roots expressing the RNAi_AGL, or OE_FUL construct compared to the control vector (EV).

Figure III.6 Expression levels of early nodulation genes upon *R. etli* infection of transgenic roots expressing the RNAi_AGL or OE_FUL construct compared to EV.

Figure III.7 Root phenotype of *R. etli*-inoculated composite plants expressing the RNAi_AGL, or OE_FUL construct compared to EV.

Figure III.8 Nodulation phenotype *R. etli*-inoculated composite plants expressing the RNAi_AGL, or OE_FUL construct compared to EV.

Figure III.9 Mature transgenic nodules expressing the AGL_RNAi or OE_FUL constructs compared to EV.

Figure III.S1 Expression analysis of *P. vulgaris* AGL genes that are expressed in root/nodule tissues.

Figure III.S2 Identification of cis-elements upstream from the initiation codon of the PvFUL-like gene.

Figure III.S3 Expression analysis by qRT-PCR of PvFUL-like gene in transgenic roots/nodules expressing OE-FUL construct.

Figure III.S4 Gene construct for RNAi gene silencing of common-bean root/nodule AGLs.

Figure III.S5 Gene expression analysis by qRT-PCR of PvAGL genes in transgenic roots/nodules from composite plants inoculated with *R. etli* at 15 dpi.

Figure III.S6. Transgenic roots expressing the RNAi *_AGL* or OE *_FUL* construct compared to the control vector (EV).

Figura IV.1 Fenotipo de la raíz en el genotipo silvestre Ler y la línea mutante *ful-1* de Arabidopsis.

Figure IV.2 Distribución de las células del meristemo de la raíz de Arabidopsis.

Figura IV.3 Selección de plántulas transgénicas por la fluorescencia roja emitida por el gen reportero *tdTomato*.

Figura IV.4 Caracterización fenotípica del desarrollo de las silicuas en la planta mutante *ful-1* y en la complementación con el gen de frijol (*ful-1_OEPvFUL*).

Figura V.1 Árbol filogenético de la familia *STY* obtenida por el método de Neighbour-joining.

Figura V.2 Mapa de calor con los datos de RNA-seq de los genes de la familia *STY* del frijol en raíces y nódulos formados en la simbiosis entre *P. vulgaris* cv. *N. jamapa* y *R. tropici*.

Figura V.3 Análisis de expresión de 10 miembros de la familia *PvSTY* en raíces y nódulos formados en diferentes etapas de la simbiosis entre *P. vulgaris*-*R. etli*.

Figura V.4 Identificación de elementos *cis* río arriba del codón de iniciación en el gen *PvSTY10* (Phvul.011G206400.1).

Figura V.5 Eficiencia de nodulación en la simbiosis entre el frijol común y diferentes cepas de *Rhizobium* (GR14/152N3).

Figura VI.1 Modelo de regulación de los FT *AGL* y *STY* en la simbiosis frijol-*R. etli*.

LISTA DE TABLAS.

Tabla I.1 miRNAs que funcionan como reguladores postranscripcionales asociados a la simbiosis.

Table III.1 Identification of CArG-box sequences in *P. vulgaris* early symbiotic genes.

Table III.S1. The AGL-TFs from Arabidopsis, *P.vulgaris*, *L.japonicus*, *M.truncatula* and *G.max* considered in the phylogenetic analysis.

Table III.S2. Primers used for qRT-PCR expression analysis

Tabla V.1 Oligonucleótidos utilizados en los análisis de expresión por qRT-PCR.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

I.1 Importancia de las leguminosas y del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

El nitrógeno es el elemento más abundante en nuestra atmósfera, no es utilizable por los organismos vivos, excepto por las pocas especies que tienen la capacidad de convertirlo en formas que pueden ser incorporadas al metabolismo; es un constituyente de moléculas esenciales tales como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y otros componentes celulares.

En los suelos, el nitrógeno se encuentra en concentraciones muy bajas y constituye uno de los principales factores que limita el desarrollo de los cultivos. En los últimos años, se ha mantenido la tendencia de producir fertilizantes nitrogenados a partir de materias primas no renovables, que además de tener un costo elevado, incrementa los problemas ambientales como la filtración de nutrientes en los suelos, cambios en el ciclo global del nitrógeno y la contaminación por nitratos en los cursos de agua, entre otros daños (Reinprecht et al., 2020). Por tanto, una estrategia alternativa a la fertilización química, es el empleo de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico para sustituir parcial o totalmente las fuentes industriales (Tang et al., 2020).

Casi el 80% del nitrógeno fijado biológicamente, proviene de la simbiosis entre plantas leguminosas y especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Martínez-Romero, 2003). Este proceso consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a través de la enzima nitrogenasa dentro de órganos especializados denominados nódulos, en una forma de nitrógeno que la planta pueda utilizar, como es el amoníaco (Ferguson et al., 2010).

Las leguminosas (*Fabaceae*) constituyen la tercera gran familia de plantas superiores y ocupan el segundo lugar, después de los cereales (*Gramineae*), en importancia agronómica fundamentalmente por su utilización en la alimentación humana como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), la soya (*Glycine max*) y el guisante (*Pisum sativum*) o como forraje para el ganado como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el trébol (*Trifolium* spp) (Graham and Vance, 2003). Además, se utilizan en la rotación de cultivos y recuperación de ecosistemas debido al aporte de formas asimilables de N₂.

Se han descrito aproximadamente 50 especies del género *Phaseolus*, siendo *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*, y *P. lunatus* las especies con mayor impacto

agronómico (Martínez-Romero, 2003), utilizándose en la dieta humana por el alto contenido proteico y por ser fuente de vitaminas y minerales, tales como la biotina, el hierro y el fósforo, entre otros (Broughton et al., 2003).

Este cultivo se originó en Mesoamérica y posteriormente se expandió hacia la región Andina en Sudamérica dando origen a dos poblaciones silvestres o acervos genéticos que se domesticaron independientemente (Broughton et al., 2003). Recientemente, se publicó la secuencia del genotipo Andino G19833 (Schmutz et al., 2014) y del genotipo Mesoamericano BAT93 (Vlasova et al., 2016), lo cual es de gran relevancia para los estudios genómicos en frijol.

El micro-simbionte original del frijol es *Rhizobium etli* que también es de origen Mesoamericano y ambos simbiontes han co-evolucionado por miles de años en cada una de las zonas geográficas de domesticación (Broughton et al., 2003). Sin embargo, en los estudios de aislamientos de rizobios de nódulos, también se han identificado asociaciones simbióticas con *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. giardinii*, *R. gallicum* y algunos simbiontes de leguminosas tropicales como *R. fredii* y *R. meliloti* (Martínez-Romero, 2003).

Por técnicas de fitomejoramiento, se han podido obtener cultivos de frijol con una mayor tolerancia a la sequía, resistencia a enfermedades o insectos además de otras características agronómicas importantes (Flôres et al., 2017); otros estudios se han enfocado en la caracterización de cepas de rizobios con el fin de encontrar cepas idóneas para mejorar la fijación de nitrógeno en las plantas de frijol (Aguilar et al., 2004).

I.2 Asociación simbiótica fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios.

1.2.1 Etapas iniciales.

Para que ocurra el proceso de simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno, se establece un diálogo molecular que inicia por la secreción de flavonoides en las raíces de las leguminosas.

Todos los flavonoides contienen 2 anillos de benceno unidos a través de un anillo pirrol heterocíclico (Figura I.1 A); cambios en el anillo o en los grupos R, dan entre otros compuestos, isoflavonoides o flavonas como se ilustra en la (Figura I.1 B, C) (Hirsch et al., 2001).

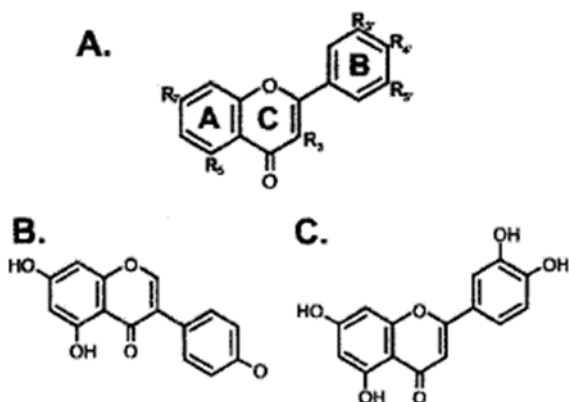


Figura I.1|. Estructura generalizada de un flavonoide A. Estructura general. Cambios en el anillo o en los grupos R, resultan en flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonoides y flavonoides glicosilados, entre otros. B. Isoflavonoide (Genisteina). C. Flavona (Luteolina). (Modificado de Hirsch et al., 2001).

Los flavonoides son reconocidos específicamente por proteínas Nod D rizobiales, que son los reguladores transcripcionales que activan las “cajas nod” localizadas corriente arriba de los genes de nodulación, que son responsables de la síntesis y secreción de los factores de nodulación (FN) (Weston and Mathesius, 2013).

Los FN por su naturaleza química también se conocen como lipoquitooligosacáridos (LCO). Estos constan de una cadena común de tres a cinco unidades de N-acetil glucosamina (quitina) unidas por enlace β -1,4 con una sustitución en el extremo no reductor de una cadena alifática de variada longitud e insaturación (C16-C20) y distintas sustituciones (acetil, carbamoil, metil, sulfato y grupos azúcares) en el extremo reductor (Denarie and Cullimore, 1993; Kamst et al., 1998) (Figura I.2).

Estas sustituciones del esqueleto son las que determinan la especificidad entre el rizobio y su leguminosa hospedera (Debellé et al., 2001; Oldroyd and Downie, 2004) y su síntesis está determinada por otros genes *nod* específicos, todos ellos inducidos por la proteína bacteriana NodD, que sensa el flavonoide adecuado (Kamboj et al., 2010).

Se ha demostrado también que los LCO activan enzimas relacionadas con la defensa incluyendo proteínas que participan en la biosíntesis de fitoalexinas, en la producción de inhibidores de proteasas y en otras proteínas relacionadas con la patogénesis (Kuć and Rush, 1985).

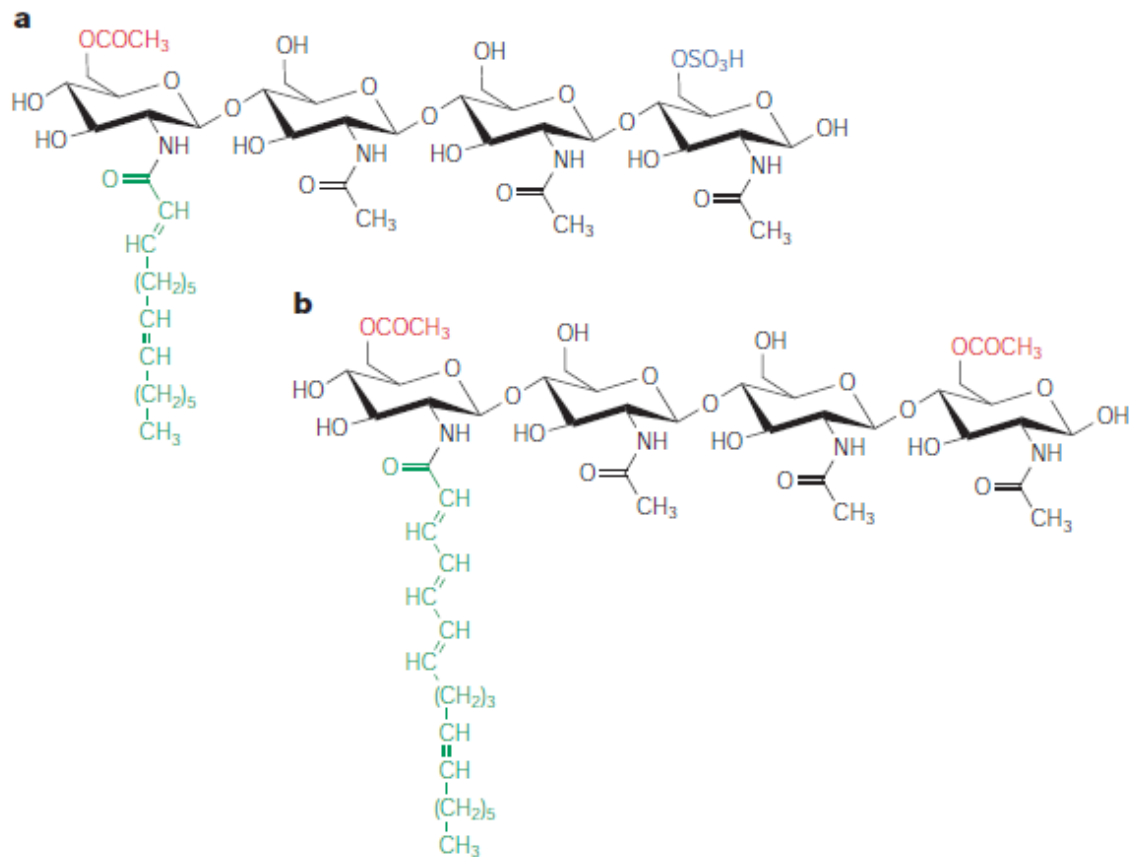


Figura I.2]. Estructura de Factores Nod (FN) de *Sinorhizobium meliloti* y de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* que nodulan en *Medicago* spp o en *Pisum* y *Vicia* spp, respectivamente. El esqueleto de N-acetil glucosamina (unidas por enlaces β 1-4), puede tener diferentes sustituciones en dependencia de la especie de Rhizobio. a) FN de *S. meliloti* contiene un grupo sulfato (azul) y para su síntesis, se requiere de proteínas bacterianas NodH, NodP y NodQ (Roche et al., 1991). b) En la misma posición, el FN de *R. leguminosarum* biovar *viciae* tiene un grupo acetilo (rojo) y en su síntesis interviene la proteína NodX. Esta modificación se requiere específicamente para la nodulación de algunos tipos de *P. sativum* (Firmin et al., 1993). Las cadenas acilo (verdes) dependientes de Nod F y Nod E pueden variar en su longitud y grado de saturación. Aunque los grupos acetilo se unen al mismo residuo por NodL en ambas cepas, no se encuentran en los FN de otras especies de rizobios. Otras sustituciones que no se muestran en la figura, pueden estar presentes en los factores Nod de otros rizobios. (Tomado de Oldroyd y Downie., 2004).

Los FN producidos por los rizobios son percibidos en los pelos radicales por receptores específicos conocidos como: Nod Factor Receptor 1/5 (NFR1/NFR5) y symbiosis receptor-like kinase (SYMRK) en *L.japonicus* o por sus ortólogos en *M.truncatula* Nod factor perception (NFP)/ LysM receptor kinase 3 (LYK3) y corriente debajo de estos receptores, se

encuentra otro receptor tipo cinasa conocido como “Does Not Make Infection 2” (DMI2) (Oldroyd, 2013) (Figura I.3). La autofosforilación del receptor NFR1 y la señalización mediada por los receptores en cooperación con NFR5 es esencial para la función *in vivo* (Madsen et al., 2011). En *L. japonicus* las variantes mutadas en los residuos de fosforilación que son críticos para la actividad cinasa de NFR1 fueron incapaces de generar nódulos en las raíces transgénicas, sin embargo, la complementación con el NFR1 silvestre bajo un promotor 35S garantizó que 14 de las 15 mutantes, produjeran nódulos llenos de bacterias (Madsen et al., 2011).

La percepción de los FN y la señalización mediada por estos receptores, la mayoría con actividad cinasa, conduce a que se desencadenen varias respuestas en el ápice de los pelos radicales de las leguminosas como son: cambios en el potencial eléctrico de membranas, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incremento en el influjo y eflujo de calcio, remodelación del citoesqueleto, curvatura del pelo radicular y expresión de genes del ciclo celular, entre otras (Oldroyd, 2013). Los influjos de calcio inducen la despolarización de la membrana nuclear que activa canales de calcio modulados por voltaje y permite la entrada de calcio al núcleo (Figura I.3).

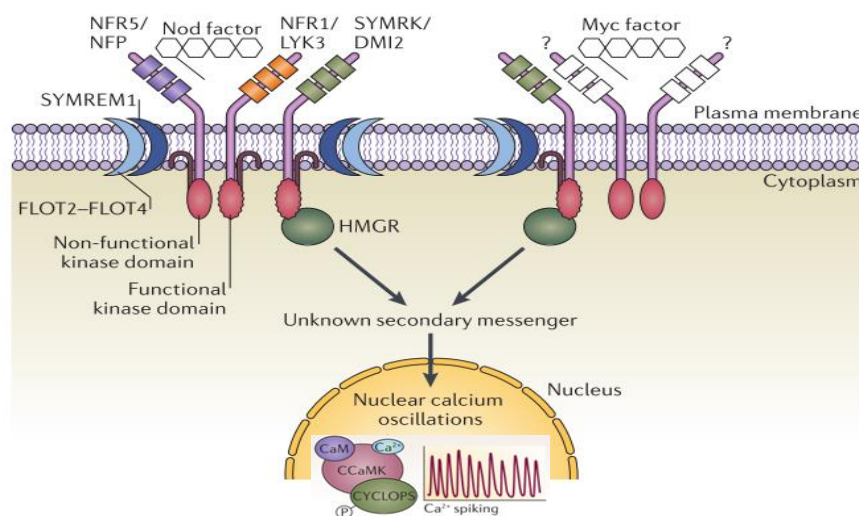


Figura I.3]. Receptores simbióticos. Los complejos heteroméricos que forman los receptores simbióticos NFR5/NFR1 y SYMRK en *L.japonicus* o sus ortólogos NFP/LYK3 y DMI2 en *M.truncatula* son fundamentales para el reconocimiento de los factores de nodulación producidos por los rhizobios. Además, la remorina simbiótica 1 (SYMREM1) y

las flotilinas FLOT2 y FLOT4, se asocian a los receptores y juegan un papel importante durante la infección bacteriana. El 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR), está involucrado en la producción de un mensajero secundario. Seguido a la percepción de los FN, 5 genes de la vía común de simbiosis en *L.japonicus* son requeridos para la inducción de las oscilaciones de Ca^{2+} (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007; Charpentier et al., 2008; Groth et al., 2010). La proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} / calmodulina (LjCCaMK) integra esta señal al fosforilar proteínas que influyen en la inducción de cascadas regulatorias de genes que garanticen las divisiones en células corticales y el desarrollo de nódulos. (Tomado de Oldroyd., 2013).

Se plantea que el calcio se une y activa a la calmodulina cinasa dependiente de calcio (Murray, 2011) (Figura I.4) y este complejo CCaMK forma un dímero con la proteína IPD3 (CYCLOPS). Los FT NODULATION SIGNALING PATHWAY (NSP1 y NSP2), se asocian a los promotores de genes inducidos por rizobios activando la expresión de genes como: *Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation (ERN1)* y *NODULE INCEPTION (NIN)* (Oldroyd, 2013) (Figura I.4).

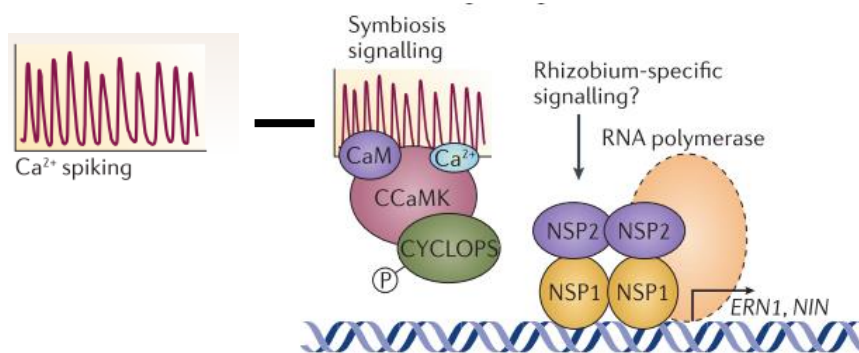


Figura I.4]. Señalización río abajo de las oscilaciones de calcio en el proceso simbiótico. La percepción y transducción de las señales de calcio involucra a la proteína Ca^{2+} /CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASE (CCaMK), que interactúa con CYCLOPS, y otros componentes río abajo, como los reguladores transcripcionales NODULATION SIGNALING PATHWAY (NSP1/NSP2), que controlan la expresión de los genes tempranos para la nodulación como *ETHYLENE-RESPONSIVE FACTOR REQUIRED FOR NODULATION (ERN1)* y *NODULE INCEPTION (NIN)*. (Modificado de Oldroyd, 2013).

Como se mencionó anteriormente, otra respuesta desencadenada por la percepción de FN es la curvatura o deformación del pelo radicular (Bhuvaneswari et al., 1981). Al deformarse el ápice del pelo de la raíz, encapsula una proporción pequeña de bacterias (Turgeon and Bauer, 1985) con una alta concentración de FN y de enzimas que degradan la pared celular, lo que ayuda en la formación de un hilo infectivo (Oldroyd et al., 2011) (Figura I.5), que son estructuras tubulares que se forman por la invaginación de la pared celular y de la membrana plasmática por donde las bacterias se internalizan al córtex de la raíz (Udvardi and Poole, 2013).

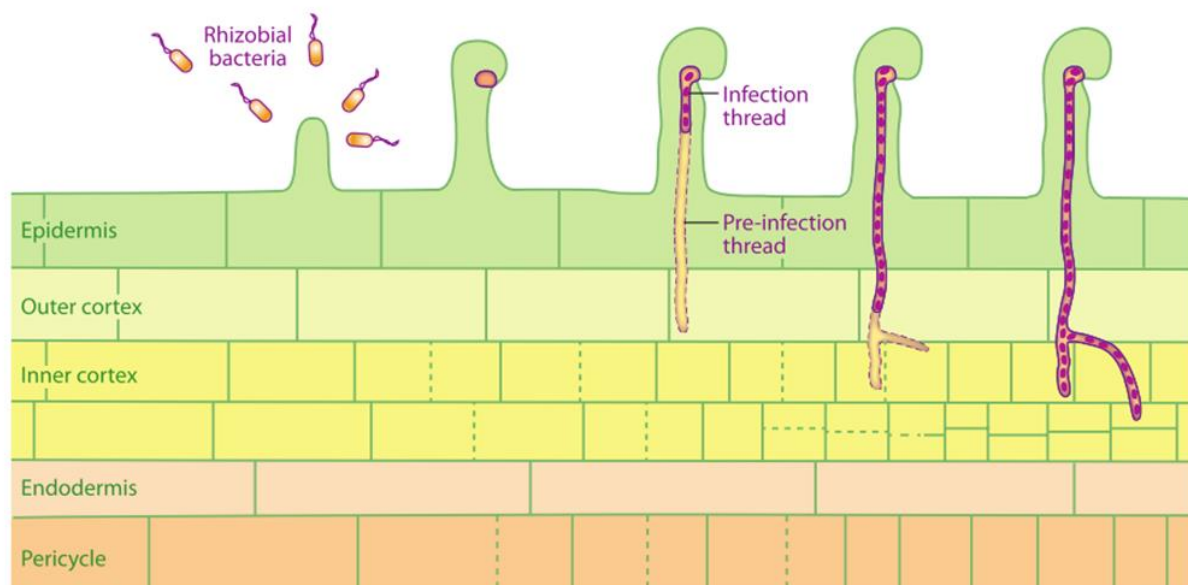


Figura I.5]. Proceso de infección en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Las bacterias son atrapadas en el pelo radicular encorvado y a partir de ahí, se forma el hilo de infección, éste progresa hasta las células del córtex interno donde el primordio del nódulo es formado a través de una serie de divisiones celulares. (Tomado de Oldroyd *et al.*, 2011).

En el desarrollo del hilo de infección participan otros elementos, como las flotilinas (*FLOT2* y *FLOT4*) (Figura I.3) que, se requieren para la iniciación del hilo de infección. Además, estas proteínas forman parte de balsas lipídicas en *M. truncatula* que se asocian con proteínas que participan en el reconocimiento y señalización de los NF (Oldroyd et al., 2011).

Los hilos infectivos se ramifican en el tejido cortical de la raíz depositando por endocitosis en el citoplasma de las células corticales a las bacterias que transportan (Udvardi and Poole, 2013).

I.2.2 Organogénesis y función de los nódulos.

Todo el proceso de infección que hemos descrito en la sección anterior y la organogénesis de los nódulos, son procesos coordinados que inician desde la percepción de los FN (Oldroyd et al., 2011).

Existen dos tipos de nódulos en las leguminosas de acuerdo con su origen y morfología: indeterminados y determinados (Figura I.6) y el tipo de nódulo está determinado por la planta hospedante. Entre las leguminosas que participan en la formación de nódulos indeterminados se encuentran la alfalfa (*Medicago sativa*), el trébol (*Trifolium repens*; *T. pratense*), el haba (*Vicia faba*), el guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y *M. truncatula*. En estos nódulos, el primordio deriva de las células corticales internas que originan un meristemo persistente, pues continuamente produce nuevas células, que al madurar pueden ser infectadas y esto permite que existan zonas sucesivas de invasión por rizobios que se pueden diferenciar dentro del nódulo. Por otro lado, las leguminosas que forman nódulos determinados son predominantemente especies tropicales y subtropicales como la soya (*Glycine max*) y las judías entre ellas el frijol común (*P. vulgaris* L), pero también otras especies de climas templados, como *Lotus japonicus*. En este caso, el primordio del nódulo se origina de las células corticales externas que dan lugar a un meristemo transitorio, por lo que todas las células invadidas tienen una fase de desarrollo similar (Ferguson et al., 2010) (Figura I.6).

La organogénesis del nódulo también está regulada por fitohormonas. Estudios en *Vicia sativa* demostraron que el etileno endógeno producido en las células cercanas a los vasos del floema suprimía la división celular asociada al desarrollo de nódulos en esta zona (Lohar et al., 2009) y es por esto que los primordios de nódulos normalmente se forman continuos a los polos del xilema primario. Además, en plantas insensibles al etileno por tener mutada la enzima ACC oxidasa (que cataliza el último paso de la biosíntesis de etileno), se incrementó el número de bacteroides por simbiosoma en comparación a las plantas silvestres, lo que

demuestra que el etileno puede jugar un papel relevante tanto en el proceso de infección a la raíz como en el posicionamiento del primordio de los nódulos (Lohar et al., 2009).

En cambio, las auxinas, las citoquininas, las giberelinas y los brasinoesteroides generalmente actúan como reguladores positivos promoviendo el desarrollo de los nódulos, en dependencia de las concentraciones y del balance con otras hormonas (Mathesius et al., 1998; Ferguson et al., 2005; Plet et al., 2011).

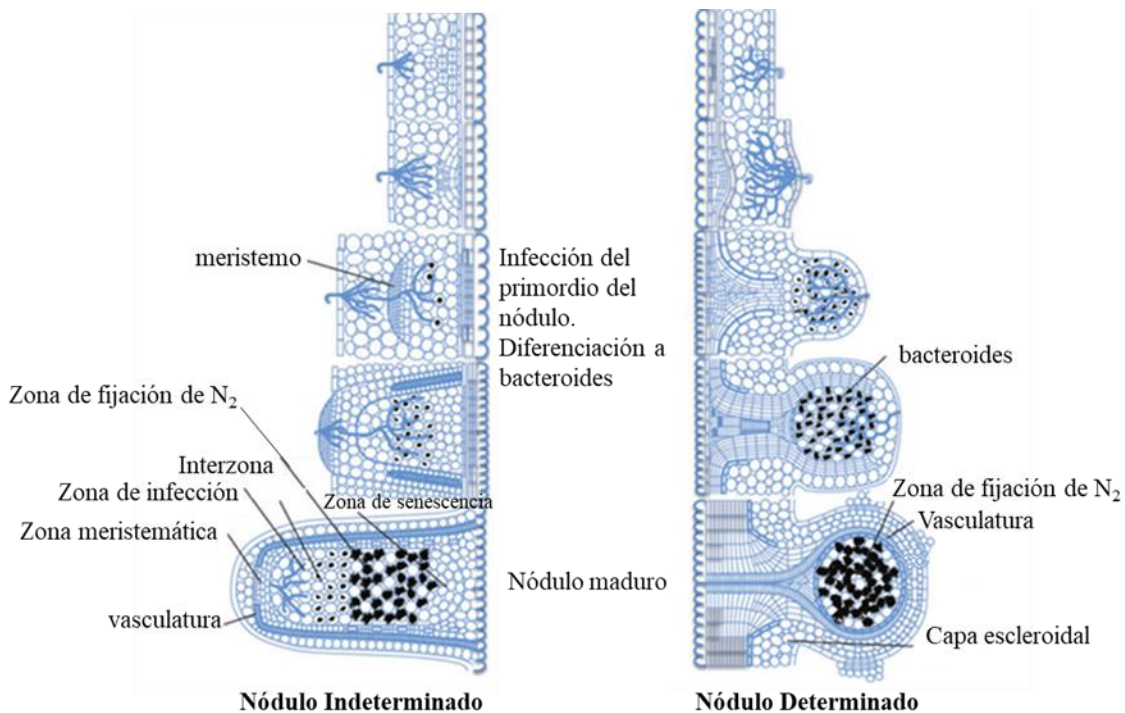


Figura I.6]. Esquema que muestra las etapas de desarrollo de los nódulos indeterminados y determinados de leguminosas.

Izquierda: nódulo indeterminado, modelo guisantes y a la derecha: nódulo determinado, modelo soya. Al percibir los FN, el pelo de la raíz se deforma y forma un bolsillo en el cual el rizobio queda atrapado. Se inicia la formación del hilo infectivo que le permite al rizobio entrar en la planta y las divisiones celulares se observan primero en la corteza interna para los nódulos indeterminados o en la capa de células subepidérmicas para los nódulos determinados para dar lugar al primordio del nódulo. El hilo infectivo progresa hacia el primordio y libera a los rhizobios en “gotas de infección” los cuales se diferencian dentro de los simbiosomas en bacteroides que pueden llevar a cabo la fijación del nitrógeno.

En el primordio del nódulo indeterminado se desarrolla un meristemo que produce continuamente nuevas células que, al madurar, pueden ser infectadas lo que permite que existan zonas sucesivas de invasión por rhizobios y una diferenciación dentro del nódulo. En cambio, los nódulos determinados, no desarrollan el meristemo persistente, de ahí que todas las células invadidas tienen una fase de desarrollo similar. (Modificado de Ferguson et al., 2010).

Una vez que las bacterias son liberadas en el citoplasma de las células corticales de la raíz éstas son rodeadas por una membrana de la planta llamada membrana del simbiosoma (SM). Cada célula infectada se llena con miles de simbiosomas y los rizobios se van diferenciando eventualmente en formas fijadoras de nitrógeno conocidos como bacteroides, en los cuales se inducen los genes para la fijación de nitrógeno (genes *nif*) y los genes asociados a los procesos de fijación (genes *fix*) (Udvardi and Poole, 2013).

Las capas de células externas en el nódulo crean una barrera a la difusión de gases, limitando la velocidad de entrada del oxígeno al tejido central infectado. Una vez que el oxígeno atraviesa la barrera y alcanza la zona central de los nódulos, la leghemoglobina (Lb) lo transporta desde la membrana plasmática de las células infectadas hacia la membrana del simbiosoma, para proveer adecuadamente de oxígeno al bacteroide. La difusión facilitada de oxígeno por la Lb y las altas tasas respiratorias de los bacteroides aseguran que el flujo de oxígeno sea bajo y constante a través del citoplasma vegetal, evitando cambios bruscos en su concentración, que sería perjudicial para la enzima nitrogenasa (Appleby et al., 1975).

La sacarosa, que se deriva del proceso de fotosíntesis por la planta constituye la principal fuente de carbono para el metabolismo del bacteroide (Kouchi and Yoneyama, 1984).

La sacarosa en el mesófilo, pasa en su mayor parte al apoplasto y de ahí se incorpora al simplasto en la célula acompañante o en el elemento criboso por co-transporte activo, facilitado por una ATPasa de membrana, para viajar a través de los plasmodesmos hasta las células de la raíz (Julius et al., 2017).

En las células simbióticas de la planta, se hidroliza en UDP-glucosa y fructosa por la sacarosa sintasa o la invertasa alcalina (Gordon et al., 1999) (Figura I.7). Los transportadores específicos responsables del transporte de azúcares y algunos aminoácidos hacia el bacteroide no han sido identificados, pero al parecer el malato es importado hacia los bacteroides por un transportador dicarboxilato desde la membrana del simbiosoma (Udvardi and Poole, 2013), (Figura I.7). La mutación en el locus (*rug4*) de *P. sativum*, afecta directamente al gen que codifica para la sacarosa sintasa. Al verse afectada la capacidad de las plantas de proveer fuentes de carbono al bacteroide, se afecta el ciclo de los ácidos tricarbónicos, del cual se deriva el ATP necesario para la actividad de la enzima nitrogenasa y los mutantes son incapaces de producir nódulos fijadores de nitrógeno. (Gordon et al., 1999).

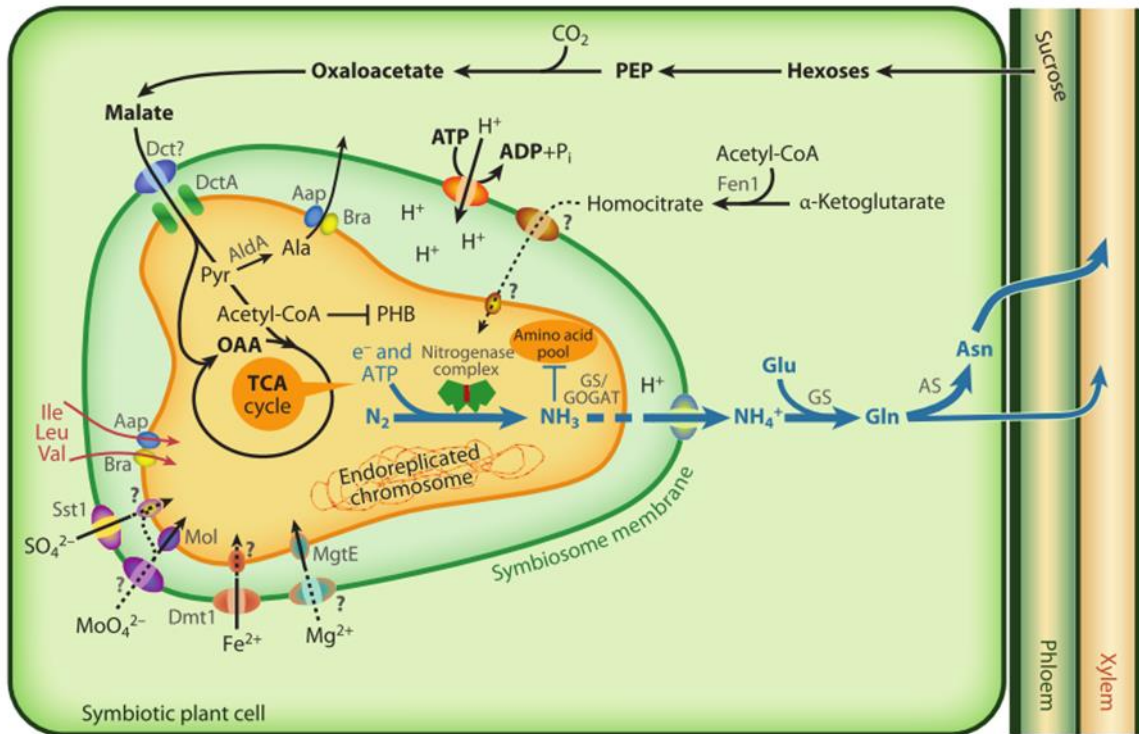


Figura I.7]. Transporte y metabolismo en una célula infectada del nódulo. La sacarosa proveniente de las hojas es convertida a malato en la planta e importada hacia los bacteroides a través de la membrana del simbiosoma, como fuente de energía para la fijación de nitrógeno. El producto que se deriva de la fijación de nitrógeno es exportado de regreso a la planta como asparagina (Asn) (flechas azules). En muchas leguminosas, como por ejemplo el frijol y la soja, los productos exportados son principalmente ureidos. (Tomado de Udvardi and Poole., 2013).

Los productos hidrolizados del metabolismo de la sacarosa son usados para la biosíntesis de celulosa y almidón o metabolizados por enzimas glicolíticas para producir fosfoenolpiruvato (PEP), el cual puede ser carboxilado a oxaloacetato y ser reducido por la malato deshidrogenasa para producir el malato que se le suministra al bacterioide (Rosendahl et al., 1991) (Figura I.7). El primer paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) es la síntesis de citrato como resultado de la condensación del oxaloacetato y el acetil-CoA. El oxaloacetato se deriva del malato, succinato y el fumarato que provee la planta, pero el acetil-CoA se obtiene cuando el malato es descarboxilado por la enzima málica hacia piruvato y este es convertido a acetil-CoA por el piruvato deshidrogenasa (Zhang et al., 2012) (Figura I.7). Mutaciones en las enzimas del TCA, producen un fenotipo Fix^- (Walshaw et al., 1997), por lo que este ciclo es esencial para la fijación de nitrógeno.

El amonio (NH_4^+) es el producto principal que se exporta desde los bacteroides, aunque también secretan aminoácidos como alanina y aspartato (Garneau et al., 2018) (Figura I.7). La acidificación del espacio del simbiosoma es facilitado por una bomba de protones H^+ -ATPasa (Blumwald et al., 1985). Se asume que el amoníaco (NH_3) difunde pasivamente a través de la membrana del bacteroide y en el espacio ácido peribacteroidal es protonado a amonio (Figura I.7). Sin embargo, un canal catiónico capaz de transportar NH_4^+ que se identificó en la membrana del simbiosoma en soya, guisantes y *L. japonicus* sugiere que el movimiento del amonio es desde el espacio del simbiosoma hacia el citosol de la célula vegetal, siendo el Mg^{2+} citosólico el principal regulador (Roberts and Tyerman, 2002).

El amonio que le transfiere el bacteroide a la planta se asimila en el nódulo por acción de la glutamina sintetasa (GS1). Esta enzima cataliza la asimilación de amonio en glutamina, usando el glutamato como sustrato (Figura I.7) mientras que la enzima glutamato sintasa (GOGAT), cataliza la reducción de la glutamina formando dos moléculas de glutamato (Ortega et al., 2006).

En las leguminosas de origen templado tales como guisantes, trébol y alfalfa, que tienden a formar nódulos indeterminados, exportan el nitrógeno fuera del nódulo hacia las hojas en forma de amidas, fundamentalmente glutamina y asparagina, sin embargo, las leguminosas de origen tropical como soya y el frijol común, que forman nódulos determinados, distribuyen el nitrógeno al resto de la planta principalmente en forma de ureidos (Quiles et al., 2019). Estas fuentes de nitrógeno se destinan a la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados (Smith and Atkins, 2002).

I.2.3 Senescencia de nódulos

Con el paso del tiempo los nódulos determinados comienzan a envejecer en un proceso conocido como senescencia de nódulos. Este proceso es visible porque pierden el color rosa que adquieren en la etapa madura y de mayor actividad (asociado con la funcionalidad de la proteína leghemoglobina) hacia un tono verde (asociado con la degradación del grupo hemo) (Herrada et al., 1993). A nivel estructural, el citoplasma ya no es tan denso y se comienza a desintegrar la membrana del simbiosoma (Timmers et al., 1999). En el proceso de senescencia, la actividad proteolítica conlleva a una degradación a gran escala de proteínas

provocando la muerte tanto de los bacteroides como de las células del nódulo (Van de Velde et al., 2006).

I.2.4 Vías para la regulación del número de nódulos.

La formación y el mantenimiento de los nódulos implica un gasto energético para la planta hospedera; por lo tanto, ésta es capaz de regular finamente el número de nódulos en dependencia de los requerimientos energéticos de la planta, así como de las condiciones ambientales como es la acidez o la disponibilidad de nitrato o amonio en el suelo.

Una de esas vías está dada por una regulación local en la raíz, en la zona susceptible a la infección. En la simbiosis entre alfalfa-*Rhizobium meliloti*, después de inducirse los primeros primordios de nódulos, una gran proporción de hilos de infección abortan en las células corticales de la raíz y ambos simbiosiontes experimentan necrosis de manera simultánea, debido a un mecanismo de defensa de la planta similar a la reacción hipersensible que se observa en las interacciones entre planta-patógeno que son incompatibles (Vasse et al., 1993).

Una segunda vía es por un mecanismo de retroalimentación negativa conocida como “auto regulación de la nodulación” (AON) (Reid et al., 2011) (Figura I.8). Después de los eventos iniciales de la infección por rizobios, se producen diferente número de péptidos en la raíz, dependiendo de la especie, que son estructuralmente similares y son codificados por *Rhizobia-Induced CLAVATA- Endosperm Surrounding Region (ESR)-related (CLE)*. Se han identificado 3 péptidos CLE en soya codificados por *GmRIC1* y *GmRIC2* (Ferguson et al., 2014), 2 en *M. truncatula MtCLE12* y *MtCLE13* (Mortier et al., 2010), 2 en frijol *PvRIC1* y *PvRIC2* (Ferguson et al., 2014) y 3 en *L. japonicus*, *LjCLE-RS1*; *LjCLE-RS2* y *LjCLE-RS3* (Okamoto et al., 2009; Yoro et al., 2020).

En la figura se muestran los péptidos CLE de 12-13 aminoácidos, procesados post-traduccionalmente (Hastwell et al., 2015) (Figura I.8). Otras modificaciones antes de llegar a ser un péptido maduro es la hidroxilación en las prolinas y la glicosilación de la prolina central (Corcilius et al., 2017). Los péptidos correctamente procesados y funcionales son transportados por el xilema hacia la parte aérea de la planta y son percibidos en células del parénquima de las hojas por receptores con repeticiones ricas en leucina llamados *GmNARK/PvNARK/MtSUNN/LjHAR1/PsSym29* (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002; Searle et al., 2003; Schnabel et al., 2005; Ferguson et al., 2014) que pueden ser

homodiméricos o formar complejos heterodiméricos (Reid et al., 2011) (Figura I.8). Las mutaciones en estos receptores producen fenotipos de supernodulación, acompañado en ocasiones por el desarrollo anormal de la raíz (Wopereis et al., 2000; Schnabel et al., 2005). El reconocimiento de CLE por los receptores produce una autofosforilación del dominio cinasa de NARK el cual es defosforilado por las proteínas fosfatasas asociadas a cinasas KAPP1 y KAPP2 (Miyahara et al., 2008), desencadenando más eventos de señalización y la producción de una señal que se deriva de la parte aérea de la planta y viaja a través del floema hacia la raíz (Ferguson et al., 2018) (Figura I.8). Esta señal pudieran ser moléculas de RNA las cuales se protegen de la RNasa-A por la metilación del extremo 3' o por las proteínas de unión al RNA (Ham and Lucas, 2017). Esta señal derivada de la parte aérea suprime el desarrollo adicional de nódulos, posiblemente al regular una proteína F-box llamada Too Much Love (TML); (Takahara et al., 2013) (Figura I.8). LjTML (de *L. japonicus*) forma parte de un complejo ligasa ubiquitina E3 que a través del dominio Kelch que dirige a sus proteínas blanco a la degradación proteosomal (Takahara et al., 2013). Los ortólogos de TML en *Arabidopsis thaliana* (a partir de ahora le llamaremos Arabidopsis) y en soya, son blancos del miR2111 (Zhang and Su, 2020), lo cual sugiere que, en las leguminosas, si el miR2111 es la señal de la AON derivada de la parte aérea, es transportado a la raíz para degradar a su blanco TML y garantizar la organogénesis de nódulos (Ferguson et al., 2018) (Figura I.8). Se considera también que las hormonas citocininas pudieran ser el factor derivado de la parte aérea para la AON (Sasaki et al., 2014).

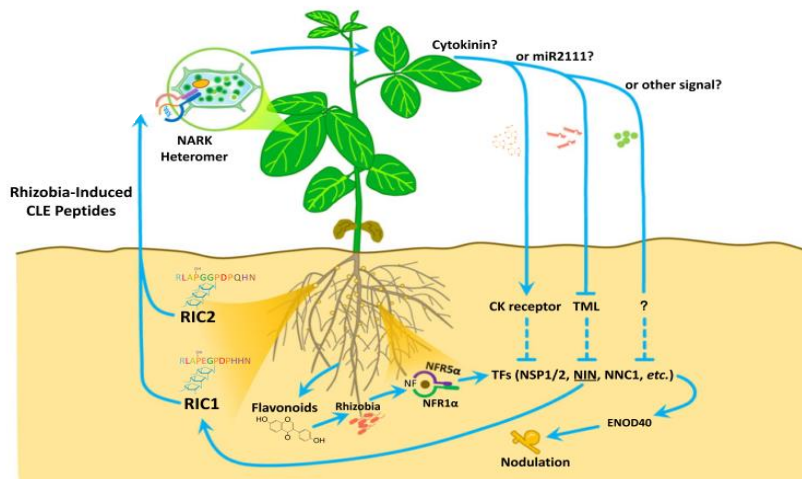


Figura I.8]. Vía de señalización molecular para la auto regulación de la nodulación (AON). Luego de los eventos iniciales producidos por la infección por rizobios los péptidos CLE producidos (RIC1 y RIC2) sufren modificaciones post-traduccionales y son transportados por el xilema hacia la parte aérea de la planta donde son percibidos por homodímeros del receptor cinasa (NARK) o un complejo heterodímero entre NARK y KLAVER (en el caso de *L.japonicus*). La unión de CLE al receptor provoca una autofosforilación del dominio cinasa que es defosforilado por las proteínas fosfatasas (KAPP1 y KAPP2) para retransmitir la percepción de los péptidos CLE. Esto regula la producción de un factor en la parte aérea (posiblemente citocinina, miRNA2111 u otro factor) que es transportado por el floema hacia la raíz, donde interactúa con otros factores, como es la proteína F-box Too Much Love (TML) y NIN los cuales controlan la expresión de CLE para regular eventos adicionales de nodulación. (Modificado de Ferguson et al., 2018).

Y como tercera vía que regula negativamente el número de nódulos, el tamaño y la actividad de fijación de nitrógeno, es aquella que se induce cuando hay suficiente nitrógeno disponible en el suelo. Los compuestos nitrogenados en la rizósfera estimulan la producción de un péptido CLE, llamado NIC1 el cual es percibido localmente en la raíz por el receptor cinasa GmNARK (Kinkema and Gresshoff, 2008) (Figura I.9). Este regula la producción de un nuevo factor en la raíz que inhibe eventos adicionales de nodulación, posiblemente en combinación con otros factores desconocidos (Figura I.9). De esta manera no hay necesidad de destinar recursos y energía para el proceso de simbiosis (Streeter and Wong, 1988) manteniéndose un balance óptimo entre el nitrógeno y el carbono (Voisin et al., 2010).

Los mutantes en soya, por la pérdida de función de GmNARK, muestran un fenotipo de supernodulación aún en presencia de altas concentraciones de nitrato. Como ya mencionamos, GmNARK actúa en la parte aérea percibiendo los péptidos CLE de la vía de

AON y en la raíz, percibiendo un péptido similar que suprime la nodulación, llamado péptido1 CLE inducido por nitrato (NIC1) (Liu et al., 2020b) (Figura I.9).

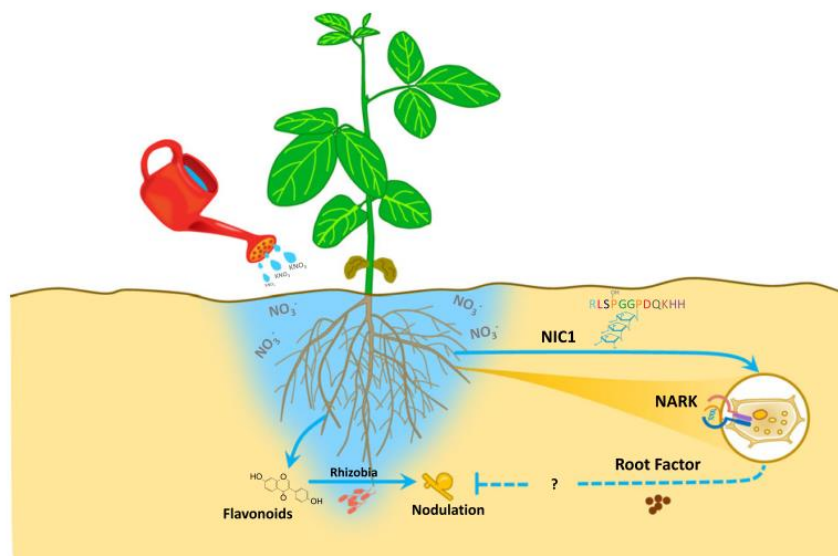


Figura I.9]. Nodulación regulada por fuentes exógenas de nitrato. Mecanismo de regulación que actúa a nivel local de la raíz. El exceso de fuentes nitrogenadas en el suelo estimula la producción del péptido NIC1, el cual es percibido por el receptor cinasa NARK y estimula la producción de un factor (no identificado) que inhibe los eventos de nodulación. (Tomado de Ferguson et al., 2018).

I.2.5 Factores transcripcionales de plantas relacionados a la simbiosis.

Los factores transcripcionales (FT) son proteínas que regulan la expresión génica de los organismos eucariotes al reconocer secuencias específicas del promotor y otras regiones reguladoras de los genes blancos, e interactúan con coactivadores específicos para reclutar o impedir el acceso de la RNA polimerasa al DNA (Libault et al., 2009).

Las tecnologías más recientes de secuenciación de genomas y transcriptomas han hecho posible la identificación completa y la clasificación de los FT en organismos eucariotas. De acuerdo con la secuencia y estructura conservada de los dominios en las proteínas, se han clasificado 94 familias de FT en 19 organismos estudiados, de las cuales 22 familias son específicas para plantas (Libault et al., 2009).

En *Arabidopsis* hay alrededor de 2000 genes que codifican para FT y que han sido clasificados en 72 familias génicas, lo cual representa más de un 7% de todos los genes que codifican proteínas (Mitsuda and Ohme-Takagi, 2009). También se ha reportado el número total de genes para FT en el genoma de leguminosas siendo en el caso de *M. truncatula* (1473), *L. japonicus* (1637) y en *G. max* (5557) (Libault et al., 2009). En el trabajo sobre transcriptómica (por RNA-seq) y el “atlas de genes de *P. vulgaris*” Pv_GEA (O'Rourke et al., 2014), se indicó la existencia de 3,726 genes de FT en esta planta. Los estudios con enfoques genéticos y de genómica comparativa y funcional han permitido determinar la función de algunos FT; sin embargo, aún son muy pocos los FT para los que se ha demostrado su función en las leguminosas.

Ya se conocen algunos FT que son reguladores relevantes del proceso simbiótico leguminosa-rizobios; sobre todo en las leguminosas modelo: *L. japonicus* y *M. truncatula*, que ofrecen ventajas para la demostración de la función de estos reguladores por enfoques genéticos (i.e. bancos de mutantes). Algunos de los FT esenciales para el control de la simbiosis son los siguientes:

En *Lotus* se identificó a *NODULE INCEPTION (NIN)* (Schauser et al., 1999) el cual es un regulador maestro en el proceso de simbiosis. Este FT juega un papel indispensable en los procesos de infección por los rizobios y en la organogénesis de los nódulos (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007; Liu and Bisseling, 2020). Recientemente se demostró que *NIN* también juega un papel importante en la transición de la infección a los nódulos funcionales, el desarrollo de simbiosomas y la senescencia de los nódulos (Liu et al., 2021).

Otro gen conocido en *Lotus* es el *LjBzf (ASTRAY)*, el cual codifica para un FT bZIP que regula negativamente el desarrollo del nódulo (Nishimura et al., 2002), pues los mutantes de este gen exhiben un fenotipo de supernodulación.

Por otro lado, los FT *Nodulation Signaling Pathway NSP1* y *NSP2*, son FT de la familia GRAS que transducen señales de los FN bacterianos. Ambos forman un complejo en el DNA para inducir cambios en la expresión de los genes que codifican nodulinas que se requieren para la simbiosis y el desarrollo de nódulos (Kaló et al., 2005; Smit et al., 2005).

En la iniciación y progresión del hilo infectivo se requieren los FT de la familia *NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y)* (Zanetti et al., 2010; Laporte et al., 2014; Hossain et al., 2016) que forman complejos triméricos compuestos por las subunidades A, B y C codificadas por

pequeñas familias multigénicas (Baudin et al., 2015). En el frijol las subunidades NF-YA1, B7 y C1 son las que más se inducen en la simbiosis con rizobios y forman un trímero que regula este proceso (Rípodas et al., 2015).

La familia *SHORT INTERNODES (SHI)/STYLISH (STY)/SHI RELATED SEQUENCE (SRS)* es exclusiva de plantas y contiene miembros altamente redundantes que regulan el crecimiento y el desarrollo prematuro de varios órganos (Zawaski et al., 2011) controlando la señalización o respuesta de giberelinas (GA) y auxinas (Fridborg et al., 2001). Estudios recientes en *L. japonicus* demostraron el papel de los *STY* y sus blancos *YUCCAI* y *YUCCAI1* en la formación y el desarrollo de nódulos radicales, al estar implicados en la cascada regulatoria dependiente de *NF-YA1* para la biosíntesis y acumulación local de auxinas en las células del primordio del nódulo (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021). En *M. truncatula* se han identificado varios FT relacionados a la simbiosis como: el FT de clase III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER (HDZipIII) que regula la actividad meristemática y la diferenciación vascular en raíces y nódulos (Boualem et al., 2008); el *Factor de Respuesta a Etileno requerido para la Diferenciación de Nódulos (EFD)*, el cual es un regulador negativo de la nodulación y está involucrado en los procesos de diferenciación del bacteroide que tienen lugar en el meristemo del nódulo (Vernié et al., 2008) y el FT HAP2-1 de la familia de unión a CCAAT, cuya expresión en la zona meristemática del nódulo es esencial para la diferenciación de las células (Combiér et al., 2006). Otros tres FT Ethylene Response Factor Required for Nodulation (ERN1-3) se asocian directamente al promotor de *Early Nodulin -11 (ENOD11)* (Andriankaja et al., 2007). Mientras que ERN1 y ERN2 funcionan como activadores transcripcionales en los pelos radicales después del tratamiento con FN; ERN3 reprime la activación transcripcional de *ENOD11* dependiente de ERN1/ERN2 (Andriankaja et al., 2007; Cerri et al., 2012).

En la familia de reguladores transcripcionales Auxin Response Factor (ARF), tres miembros denominados *ARF10*, *ARF16* y *ARF17*, alteran la sensibilidad a las auxinas y actúan como reguladores negativos de la formación de nódulos en soya (*G.max*) y *M. truncatula* (Bustos-Sanmamed et al., 2013; Turner et al., 2013; Nizampatnam et al., 2015).

Por otra parte, en *M. sativa* el gen *Mszpt2-1* codifica un FT de la familia C2H2 que se expresa en haces vasculares de la raíz y en nódulos. Empleando el RNA anti-sentido para este gen,

las plantas desarrollaron nódulos no funcionales, en los que se detuvo la diferenciación de la zona de fijación de nitrógeno y la invasión bacteriana (Frugier et al., 2000).

En el frijol común, el miR172c y su gen blanco *AP2-1* (Phvul.005G138300) que pertenece a la superfamilia de FT APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF), son reguladores esenciales de la infección por rizobios y la nodulación, modulando la expresión de nodulinas tempranas y genes del mecanismo de AON. Además, AP2-1 en nódulos maduros es silenciado por miR172c, al ser un regulador positivo de genes involucrados en la senescencia de nódulos (Nova-Franco et al., 2015).

Sin embargo, el conocimiento sobre los FT y otros elementos de las vías de señalización que operan en el control del desarrollo y de la función de los nódulos en el frijol, aún es insuficiente, por lo que es el tema principal de este trabajo de tesis.

I.2.6 Regulación postranscripcional mediada por miRNAs a FT de la simbiosis.

Los programas genéticos activados durante la simbiosis requieren la reprogramación de las células de la raíz, lo que implica regulación en múltiples niveles de la expresión génica como: la remodelación de la cromatina, la transcripción y el procesamiento de RNAs en el núcleo y la modulación de la traducción del RNAm en el citoplasma. Los estudios recientes han revelado que el control de la expresión génica a nivel postranscripcional les permite a las células de la raíz responder rápidamente y adaptarse a las señales simbióticas a partir de controlar la localización y el destino de los RNAm, así como la cantidad de proteína sintetizada (Zanetti et al., 2020).

Los microRNAs (miRNAs) y los RNAs pequeños interferentes (siRNAs) tienen alrededor de 20-24 nucleótidos (nt) y son reguladores esenciales de la expresión génica en eucariotes. Ellos se unen a sus transcritos blancos por complementariedad de bases, reprimiendo la expresión del gen a partir de los cortes endonucleolíticos en el RNAm diana, inhibición de la traducción o metilación del DNA dirigida por RNA y condensación de la cromatina en genes específicos (Axtell, 2013).

La biogénesis de los miRNA en plantas inicia con la transcripción de los genes (*MIR*) que codifican a los precursores o miRNA primarios (pri-miRNA) de hasta más de 1 kb de longitud (Jones-Rhoades et al., 2006) mediante la RNA polimerasa II (RNA Pol II) Figura I.10 A; (Yu et al., 2017).

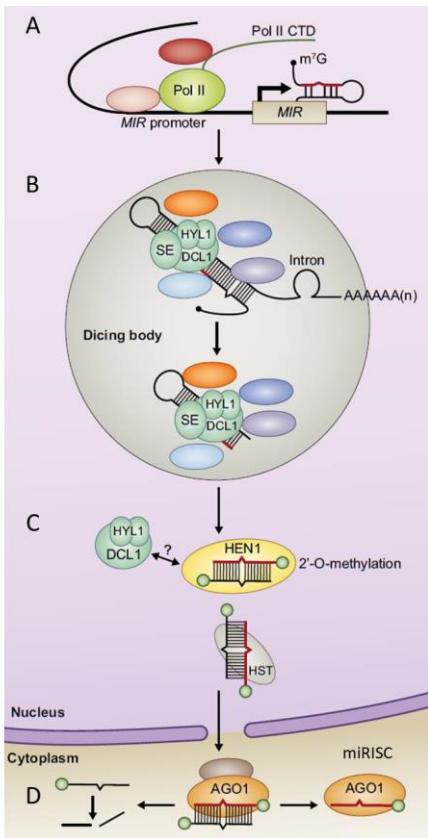


Figura I.10| Biogénesis de miRNA en plantas. A. Expresión de los pri-miRNA a partir de los genes *MIR*. B. Procesamiento del pri-miRNA para formar el pre-miRNA. C. Metilación de los extremos 3' del dúplex miRNA/miRNA* y exportación desde el núcleo hacia el citoplasma. D. Formación del miRISC en el citoplasma. (Tomado de Yu et al., 2017).

Los pri-miRNA tienen una estructura secundaria de tallo y asa la cual es reconocida por una enzima conocida como DICER-LIKE1 (DCL1) de la familia RNAasa III. Esta enzima forma un complejo proteico con HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) y SERRATO (SE) para procesar a los pri-miRNA cortando la región de poliadenilación y la caperuza (CAP) del transcrito, a 15-17 nucleótidos de distancia de la base del tallo (Figura I.10 B). El producto resultante se conoce como pre-miRNA que luego es cortado una vez más por DCL1 para producir un dúplex de miRNA/miRNA* de 21 nucleótidos (Yu et al., 2017), con unos extremos libres de dos nucleótidos en las terminales 3' (Figura I.10 C); (Jones-Rhoades et al., 2006; Yu et al., 2017).

En contraste a los miRNA animales, el corte y empalme de los precursores se llevan a cabo dentro del núcleo y en un solo paso de edición, mientras que en animales estos pasan por una edición dentro del núcleo mediada por Droscha y otra fuera del núcleo realizada por Dicer para completar su maduración (Carthew and Sontheimer, 2009).

Luego de los eventos de procesamiento en el precursor del miRNA para formar el dúplex miRNA/miRNA* se llega a un evento de estabilización y protección de estas secuencias contra los procesos de silenciamiento de RNA de la célula mediante la metilación de sus extremos 3' (Jones-Rhoades et al., 2006). Este evento de metilación se describe como 3'-terminal-2'-O-metilación y es catalizada por la HUA ENHANCER 1 (HEN1), una metiltransferasa específica para RNA pequeños (Figura I.10 C); (Yu et al., 2017)

Posteriormente, una de las dos cadenas del dúplex miRNA/miRNA* (generalmente la cadena guía) se incorpora en ARGONAUTE1 (AGO1) y forman el complejo de silenciamiento inducido por RNA (miRISC, del inglés miRNA-induced silencing complex) para silenciar al transcrito (o a los transcritos) blanco. La otra cadena es removida y se puede llevar a su degradación por nucleasas en el citoplasma (Figura I.10 D); (Yu et al., 2017).

En plantas, la mayoría de los genes que son blanco de los miRNAs son FT y en general, los sitios de unión de los miRNA en los transcritos se encuentran en los extremos 3' UTR, aunque también se pueden encontrar dentro de la región codificante del mRNA, a diferencia de los animales. (Carthew and Sontheimer, 2009)

Ejemplos de algunos miRNAs descritos en la literatura e implicados en la simbiosis fijadora de nitrógeno se muestran en la Tabla I.1 (modificada de Zanetti et al., 2020).

Tabla I.1 | miRNAs que funcionan como reguladores postranscripcionales asociados a la simbiosis, resaltando con letras negras, cuáles de los genes blanco son FT.

miRNA	Gen Blanco	Especie	Proceso
miR2111	<i>TML</i>	<i>L. japonicus</i>	AON (Tsikou et al., 2018)
miR172c	<i>AP2/NNC1</i>	<i>G. max</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo/ AON (Wang et al., 2019)
miR172c	<i>AP2</i>	<i>P. vulgaris</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo/ AON/ fijación de N/ desarrollo de raíces (Nova-Franco et al., 2015)
miR172c	<i>AP2</i>	<i>L. japonicus</i>	Infección del rizobio (Holt et al., 2015)
miR390b	<i>TAS3</i>	<i>M. truncatula</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo/ desarrollo de raíces (Hobecker and Reynoso, 2017)
miR393	<i>TIR1/AFB</i>	<i>M. truncatula</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo (Mao et al., 2013)
miR393	<i>TIR1/AFB</i>	<i>G. max</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo (Cai et al., 2017)
miR319d	<i>TCP</i>	<i>P. vulgaris</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo/ fijación de N (Martin-Rodriguez et al., 2018)
miR171h	<i>NSP2</i>	<i>M. truncatula</i>	Organogénesis del nódulo y mantenimiento del meristemo (Ariel et al., 2012; Hofferek et al., 2014)
miR169	<i>NFY-A1/2</i>	<i>M. truncatula</i>	Infección del rizobio/ organogénesis del nódulo y mantenimiento del meristemo (Combier et al., 2006)
miR160	<i>ARF10/16/17</i>	<i>G. max</i>	Formación y maduración del nódulo (Turner et al., 2013)
miR160	<i>ARF10/16/17</i>	<i>M. truncatula</i>	Formación del nódulo/ crecimiento de raíz (Bustos-Sanmamed et al., 2013)
miR167	<i>ARF8</i>	<i>G. max</i>	Organogénesis del nódulo/ crecimiento de raíz (Wang et al., 2015a)
miR164	<i>NAC</i>	<i>M. truncatula</i>	Organogénesis del nódulo (D'Haeseleer et al., 2011)
miR166	<i>HD-ZIPIII</i>	<i>M. truncatula</i>	Desarrollo de raíz y nódulos (Boualem et al., 2008)
miR156a	<i>SPL</i>	<i>L. japonicus</i>	Desarrollo de raíz y nódulos (Wang et al., 2015b)

Como se puede observar en la tabla anterior, en plantas, la mayoría de los genes que son blanco de los miRNAs son FT que a su vez regulan diferentes eventos en el proceso de simbiosis. El primer miRNA con una función asignada en la simbiosis de nódulos radicales fue el miR169d, el cual controla el desarrollo del nódulo y el mantenimiento del meristemo

en *M. truncatula*, regulando la expresión de su blanco que es el FT NFY-A1 (Combiere et al., 2006). El miRNA160 y el miRNA167, fueron los primeros miRNA ligados a auxinas e implicados en la simbiosis de los nódulos en la raíz en soya (Wang et al., 2015a). El miR160 reprime tres miembros de la familia de FT ARF (*ARF10*, *ARF16* y *ARF17*) que actúan como reguladores negativos en la formación de nódulos, en cambio el miR167 regula positivamente la formación de nódulos teniendo como diana el transcrito del FT ARF8 (Wang et al., 2015a).

En nuestro grupo de trabajo se caracterizó funcionalmente el papel del miRNA172c(miR172c) y su blanco que es el FT APETALA2 (AP2) en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli* (Nova-Franco et al., 2015). La sobreexpresión del miR172c resultó en un mayor crecimiento de la raíz, un aumento de la infección por rizobios, un aumento en los niveles de expresión de genes tempranos de la nodulación y de la auto regulación del número de nódulos y mejor fijación de nitrógeno. Además, estas plantas mostraron una disminución de la sensibilidad a la inhibición de la nodulación por nitratos (Nova-Franco et al., 2015).

Recientemente, nuestro grupo también caracterizó el nodo conformado por el miRNA319d (miR319d) y su blanco el FT TEOSINTE BRANCHED/ CYCLOIDEA/ PCF (TCP10) en la simbiosis del frijol común *P. vulgaris* con *R. tropici* (Martin-Rodríguez et al., 2018). El análisis fenotípico de plantas compuestas con raíces y nódulos transgénicos que sobre expresan la función del miR319d, resultó en una reducción de la relación longitud/ancho de la raíz, un aumento de la infección por rizobios evidenciada por más pelos radicales deformados e hilos de infección, disminuyendo el número de nódulos formados y la actividad de la enzima nitrogenasa por planta. Además, estas plantas con niveles más bajos de TCP10, mostraron una disminución en los niveles de expresión del gen *LOX2* que participa en la biosíntesis del ácido jasmónico (AJ). Con base a esto, Martin-Rodríguez et al., (2018) proponen que TCP10 pudiera ser un regulador transcripcional de *LOX2* y que el nodo miR319d/TCP10, afecta la nodulación a través de la señalización del AJ.

I.3 Factores transcripcionales con dominio MADS/AGL.

El nombre de la familia de FT MADS, es un acrónimo formado a partir de los nombres de los genes en cuya secuencia se identificó la caja MADS por primera vez: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1* (*MCMI*, en *Saccharomyces cerevisiae*);

AGAMOUS (*AG*, en *A. thaliana*); *DEFICIENS* (*DEF*, en *Antirrhinum majus*) y *SERUM RESPONSE FACTOR* (*SRF*, en *Homo sapiens*) (Shore and Sharrocks, 1995).

Esta familia de genes también se conoce con el nombre de *AGAMOUS-like proteins* (*AGL*), (Jibran et al., 2017) y los miembros de esta familia juegan un papel fundamental en el control del desarrollo tanto en plantas como animales (Messenguy and Dubois, 2003). Estos FT se han clasificado en 2 clases (Tipo I y Tipo II), con base en la relación entre secuencias y en las características estructurales de los dominios (Figura I.11) que derivaron a partir de una duplicación ancestral antes de la divergencia de plantas y animales (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Por lo tanto, en el linaje de plantas, las proteínas MADS Tipo I, están estrechamente relacionadas con el factor SRF de los MADS tipo I en el linaje de animales y hongos, mientras que las proteínas MADS Tipo II en el linaje de plantas, es más parecido al factor MEF en el linaje de animales y hongos (Figura 1.11).

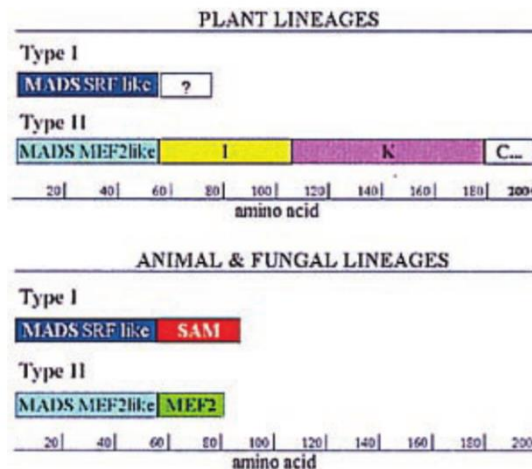


Figura I.11|. Representación esquemática de los dominios presentes en proteínas MADS de plantas, animales y hongos Tipo I (SRF-like) y Tipo II (MEF2-like). La escala indica el número de aminoácidos en toda la proteína. En las proteínas Tipo II de plantas, el dominio carboxilo terminal va más allá de los 200 aminoácidos. En las proteínas Tipo I de plantas, el signo de interrogación (?) indica que el dominio carboxilo terminal aún no está bien definido y es de longitud variable. (Tomado de Alvarez-Buylla et al., 2000b).

Las proteínas MADS Tipo II en plantas (denominadas MIKC, tienen 3 dominios (I, K, C) adicionales al dominio de unión al DNA (MADS): el dominio I que está moderadamente conservado, enlaza al dominio MADS con el dominio K (que interviene en la dimerización); el dominio carboxilo terminal variable (COOH) (Riechmann and Meyerowitz, 1997) junto

con el dominio K, intervienen en la formación de complejos proteicos (Alvarez-Buylla et al., 2000b; Smaczniak et al., 2012) (Figura 1.11).

En estas proteínas MADS tipo II se incluyen reguladores de la transición floral y de la identidad de órganos florales (Samach and Coupland, 2000; Ripoll et al., 2011) por lo que se estableció un modelo general en plantas superiores llamado ABCDE, donde las combinaciones de genes de clase A, B, C, D o E especifican la identidad del órgano floral (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Murai, 2013).

Actualmente se sabe que muchos de estos FT también se expresan en varios órganos y tejidos donde pueden tener funciones más específicas (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Arora et al., 2007). Se ha reportado que al menos 50 genes MADS se expresan en raíces de *Arabidopsis*, entre ellos los *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14* que regulan el crecimiento de la raíz primaria y *ANRI* que está involucrado en el desarrollo de raíces laterales (Gan et al., 2005; Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013).

En especies de leguminosas los estudios sobre la expresión y la función de genes *MADS* aún son escasos. Inicialmente se identificaron los genes *nmh7*, *ngl9* y *nmhC5* en nódulos de *M. sativa* (Heard et al., 1997; Zucchero et al., 2001). Un análisis evolutivo entre los miembros de la familia MADS mostró que *nmh7* y *ngl9* son ortólogos de la subfamilia floral representada por AP3 (DefA)/ PI (Glo) (Heard et al., 1997), mientras que *nmhC5* es ortólogo a las proteínas de la subfamilia AGL17 que se expresan en la raíz de *Arabidopsis* (Heard et al., 1997).

Análisis de expresión del gen *NMH7* de alfalfa reveló su expresión en flores y nódulos, así como en el parénquima de la punta de la raíz y en la zona de alargamiento de la raíz (Páez-Valencia et al., 2008). En soya, el gen *GmNMH7* se expresa en raíces y nódulos y ejerce un control negativo sobre la nodulación, probablemente al regular el contenido de giberelina (Ma et al., 2019). La función de *NMH7* y *NGL9* depende de su unión al DNA como heterodímeros (Zucchero et al., 2001).

El gen *NMHC5* de soya está altamente expresado en raíces y nódulos y su sobreexpresión promueve el desarrollo de raíces laterales y la nodulación (Liu et al., 2015). Su función la lleva a cabo formando homodímeros que reconocen la secuencia consenso CArG en el DNA (Heard et al., 1997).

Nuestro grupo de trabajo, en estudios con *P. vulgaris* reveló que, de los 93 miembros de la

familia MADS en el frijol común, 16 genes están altamente expresados en las raíces y los nódulos que se forman debido a la simbiosis con rizobios (Iñiguez et al., 2015). Basados en este resultado, este trabajo de tesis propone la siguiente hipótesis.

HIPÓTESIS

La simbiosis entre leguminosas y rizobios es muy compleja y aún no conocemos todos los reguladores globales involucrados en este proceso.

Los FT MADS/AGL que se expresan en raíz y nódulos formados por la simbiosis entre el frijol común con bacterias fijadoras de nitrógeno, ortólogos a los MADS/AGL que se expresan en la raíz de Arabidopsis, son reguladores relevantes para diferentes eventos de la simbiosis y el desarrollo de raíces.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS.

El conocimiento acerca de todos los elementos que participan en la regulación de la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno con frijol, cultivo de importancia económica, como ya se mencionó, es aún incipiente. Por tanto, en este trabajo consideramos valioso estudiar algunas de las familias de FT con elevada expresión en raíz y/o nódulos de frijol para dilucidar el papel que pudieran desempeñar en el proceso de SNF. Así, en este proyecto nos trazamos los siguientes objetivos.

II.1 Objetivo General.

Descubrir nuevos FT del frijol que sean relevantes para el control transcripcional del proceso de fijación simbiótica del N entre esta leguminosa con *R. etli*.

II.2 Objetivos particulares.

1. Investigar la participación de FT MADS/AGL en la regulación de la simbiosis frijol – *R. etli*.

1.a Realizar un análisis filogenético de las proteínas MADS/AGL de Arabidopsis y de leguminosas, para identificar clados monofiléticos que incluyan los genes altamente expresados en raíz y/o nódulos de estas especies.

1.b Validar experimentalmente el perfil de expresión de los genes *AGL* de frijol con expresión alta en raíz y/o nódulos según el Pv-GEA. Con base en esos resultados,

seleccionar el/los candidato(s) que continuaremos analizando funcionalmente en este proyecto.

1.c Diseñar y obtener las construcciones génicas idóneas para modular la expresión de los FT *AGL* seleccionado (s), en la raíz/nódulos transgénicos de “plantas compuestas” de frijol.

1.d Analizar el fenotipo simbiótico de las “plantas compuestas” que sobre expresen o tengan silenciado (s) el(los) gene(s) y elucidar su efecto en el desarrollo de la raíz y en la simbiosis con rizobios.

2. Investigar si el gen *FUL* de Arabidopsis que se expresa en raíz regula su arquitectura de manera similar al FT *AGL* de frijol denominado *PvFUL*-like el cual regula la arquitectura de la raíz tanto en las plantas de frijol fertilizadas como en las plantas que están en simbiosis con *R. etli* Ayra et al., (2021).

2.a Realizar ensayos de complementación genética de la mutante de Arabidopsis (*ful-1*) con pérdida de función del gene *AGL* denominado *FUL*, con el gen de frijol *PvFUL*-like (seleccionado a partir de los resultados obtenidos en el objetivo anterior) analizando el fenotipo de la raíz de Arabidopsis.

3. Investigar la participación de los FT *STY* de frijol en la regulación de la simbiosis con *R. etli*.

3.a Validar experimentalmente el perfil de expresión de los genes de la familia *STY* de frijol en raíz y nódulos en distintas etapas de la simbiosis. Con base en esos resultados, seleccionar uno o varios candidatos para los estudios posteriores sobre su papel en la simbiosis con rizobios.

3.b Realizar un análisis *in silico* de la región promotora del *PvSTY10* seleccionado, para identificar elementos regulatorios *cis* relacionados con el proceso de simbiosis y/o el desarrollo de raíz e inferir su posible participación en vías de señalización de la simbiosis.

CAPÍTULO III. Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-domain/ AGL Transcription Factors.

Este capítulo corresponde al trabajo científico que desarrollamos para darle cumplimiento al primer objetivo particular, relacionado con investigar la participación de los FT MADS/AGL en la regulación de la simbiosis entre el frijol y los rizobios.

Este trabajo fue publicado en Junio del 2021 en la revista *Frontiers in Plant Science*, bajo la autoría de Litzy Ayra, María del Rocío Reyero-Saavedra, Mariel C. Isidra-Arellano, Luis Lozano, Mario Ramirez, Alfonso Leija, Sara-Isabel Fuentes, Lourdes Girard, Oswaldo Valdés-López and Georgina Hernández.

El trabajo muestra la filogenia de 500 proteínas con dominio MADS de *Arabidopsis* y cuatro especies de leguminosas (*G. max*, *L. japonicus*, *P. vulgaris* y *M. truncatula*) identificándose cinco clados que agrupan genes con alta expresión en raíces y nódulos.

Se analizaron 16 genes de los 93 miembros que contiene la familia de FT MADS del frijol común, por presentar una expresión diferencial en los tejidos de raíces y nódulos formados en la simbiosis con *R. etli*. De este análisis, seleccionamos para los análisis fenotípicos al gen *Pv FUL-like* como candidato para la sobreexpresión o el silenciamiento en plantas “compuestas” que poseen raíces y nódulos transgénicos. Debido a la similitud entre la secuencia de DNA correspondiente a *PvFUL-like* que se empleó en la construcción de silenciamiento, con la secuencia de DNA de otros miembros con expresión alta en raíz y/o nódulos, fue posible obtener fenotipos drásticos al reducir los niveles de expresión de otros cinco genes en los tejidos transgénicos, evitando la posible redundancia funcional entre ellos. De manera contrastante a las plantas que expresaron la construcción de sobreexpresión del gen *Pv FUL-like*, las plantas que fueron transformadas con la construcción de silenciamiento *RNAi_AGL*, mostraron afectaciones en la generación y crecimiento de raíces transgénicas, tanto en la condición inoculada con rizobios como en la condición de no inoculadas (fertilizadas). Además, en las plantas con los FT MADS silenciados se afectó la infección por rizobios relacionado a los bajos niveles de expresión de genes simbióticos de respuesta temprana y formaron mayor cantidad de nódulos pequeños e inefectivos que indican alteraciones en la auto regulación de la nodulación durante la simbiosis.

En este artículo proponemos que el efecto positivo de los FT MADS en la simbiosis entre el frijol común-rizobios, resultan de la interacción potencial con NIN, el regulador maestro de la simbiosis, el cual contiene cajas CArG en su región promotora que son secuencias consenso conservadas y reconocidas por los FT MADS. Además, los niveles de expresión de NIN aumentaron o disminuyeron en las raíces de plantas no inoculadas, transformadas con las construcciones para la sobreexpresión (OE-PvFUL) o el silenciamiento (RNAi_AGL), respectivamente.

Este trabajo contribuye en la definición de nuevos reguladores transcripcionales de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre el frijol común con los rizobios.



Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-Domain/AGL Transcription Factors

Litzy Ayra¹, María del Rocio Reyero-Saavedra², Mariel C. Isidra-Arellano², Luis Lozano³, Mario Ramírez¹, Alfonso Leija¹, Sara-Isabel Fuentes¹, Lourdes Girard⁴, Oswaldo Valdés-López² and Georgina Hernández^{1*}

¹ Programa de Genómica Funcional de Eukaryotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ² Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla de Baz, Mexico, ³ Unidad de Análisis Bioinformáticos, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, ⁴ Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Juan Imperial,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain

Reviewed by:

Elena A. Dolgikh,
All-Russian Research Institute of
Agricultural Microbiology of the
Russian Academy of Agricultural
Sciences, Russia
Jesus Montiel,
Aarhus University, Denmark

*Correspondence:

Georgina Hernández
gina@ccg.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Symbiotic Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 11 March 2021

Accepted: 10 May 2021

Published: 07 June 2021

Citation:

Ayra L, Reyero-Saavedra MdR, Isidra-Arellano MC, Lozano L, Ramírez M, Leija A, Fuentes S-I, Girard L, Valdés-López O and Hernández G (2021) Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-Domain/AGL Transcription Factors. *Front. Plant Sci.* 12:679463. doi: 10.3389/fpls.2021.679463

Plants MADS-domain/AGL proteins constitute a large transcription factor (TF) family that controls the development of almost every plant organ. We performed a phylogeny of (ca. 500) MADS-domain proteins from Arabidopsis and four legume species. We identified clades with Arabidopsis MADS-domain proteins known to participate in root development that grouped legume MADS-proteins with similar high expression in roots and nodules. In this work, we analyzed the role of AGL transcription factors in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) – *Rhizobium etli* N-fixing symbiosis. Sixteen *P. vulgaris* AGL genes (*PvAGL*), out of 93 family members, are expressed – at different levels – in roots and nodules. From there, we selected the *PvAGL* gene denominated *PvFUL*-like for overexpression or silencing in composite plants, with transgenic roots and nodules, that were used for phenotypic analysis upon inoculation with *Rhizobium etli*. Because of sequence identity in the DNA sequence used for RNAi-*FUL*-like construct, roots, and nodules expressing this construct -referred to as RNAi-*AGL*- showed lower expression of other five *PvAGL* genes highly expressed in roots/nodules. Contrasting with *PvFUL*-like overexpressing plants, rhizobia-inoculated plants expressing the RNAi-*AGL* silencing construct presented affection in the generation and growth of transgenic roots from composite plants, both under non-inoculated or rhizobia-inoculated condition. Furthermore, the rhizobia-inoculated plants showed decreased rhizobial infection concomitant with the lower expression level of early symbiotic genes and increased number of small, ineffective nodules that indicate an alteration in the autoregulation of the nodulation symbiotic process. We propose that the positive effects of *PvAGL* TF in the rhizobia symbiotic processes result from its potential interplay with NIN, the master symbiotic TF regulator, that showed a CArG-box consensus DNA sequence recognized for DNA binding of AGL TF and presented an increased

or decreased expression level in roots from non-inoculated plants transformed with OE_FUL or RNAi_AGL construct, respectively. Our work contributes to defining novel transcriptional regulators for the common bean – rhizobia N-fixing symbiosis, a relevant process for sustainable agriculture.

Keywords: transcription factors, MADS, AGL, common bean, rhizobia, symbiotic nitrogen fixation, nodule

INTRODUCTION

Transcription factors (TFs) are master control proteins in all living cells, regulating gene expression in response to different stimuli. These exhibit one or more sequence-specific DNA-binding domains that bind to the promoter and/or enhancer regions of multiple target genes to activate or repress transcription. In this way, TF regulates essential biological processes such as development, growth, metabolism, cell cycle progression, and responses to the environment (Czechowski et al., 2004; Libault et al., 2009). An average of 5.7% plant genes code for TF has been distributed among 62 gene families (Libault et al., 2009).

The MADS-domain proteins constitute a eukaryotic family of TFs involved in various relevant functions. Its name derived from the initials of the four founding members of this family *MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1* (*MCM1*) from *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates mating type-specific genes, *AGAMOUS* (*AG*) from *Arabidopsis thaliana* (hereafter referred to as *Arabidopsis*) and *DEFICIENS* (*DEF*) from *Antirrhinum majus*, which act as homeotic factors that control flower development, and *SERUM RESPONSE FACTOR* (*SRF*) from *Homo sapiens* which controls serum inducible and muscle-specific gene expression (Schwarz-Sommer et al., 1990; Yanofsky et al., 1990; Pollock and Treisman, 1991; Mead et al., 2002). MADS TF recognizes a consensus DNA sequence called the CARG-box [CC(A/T)₆GG] (Riechmann et al., 1996).

In plants, the MADS-domain TFs family has expanded largely with 109 members in *Arabidopsis*, compared with just a few in mammals, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Caenorhabditis elegans* (Olson et al., 1995; Parenicova et al., 2003). This family of TFs can be divided into two main lineages, type I and type II, based on their protein structure. The best-studied MADS TFs from *Arabidopsis* and other plant species belong to the type II lineage. Plants type II MADS proteins have a modular domain structure, referred to as the MIKC structure, that contains the N-terminal located (~ 60 amino acids) conserved DNA-binding domain (M), followed by moderately conserved intervening (I) and keratin-like (K) domains, and a variable C-terminal domain (C) that, together with K, have roles for protein complex formation (Alvarez-Buylla et al., 2000b; Smaczniak et al., 2012). These MADS proteins include the regulators of floral transition and floral organ identity determination that, after over 20 years of intensive study, led to the establishment of a general model for flower organ identity in higher plants, the so-called ABCDE model in which floral whorl-specific combinations of class A, B, C, D, or E genes specify floral organ identity (Alvarez-Buylla et al., 2000b; Murai, 2013).

Although initially, MADS-box genes were relevant for floral organ speciation, more recent studies have revealed that these genes are relevant for the morphogenesis of almost all plant organs. The role of MADS TF in root development has received relatively less attention, but recently it was comprehensively reviewed by Alvarez-Buylla et al. (2019). About 41 *Arabidopsis* MADS-box genes that show high and intermediate expression levels in different root tissues and zones have been identified (Alvarez-Buylla et al., 2019). *Arabidopsis* research using genetic, molecular, biochemical approaches has contributed to understanding the role of root-expressed MADS-box genes, from different clades, in primary or lateral root development. The latter include *XAL1* (*XAANTAL1*), *XAL2* (*XAANTAL2*), *ANR1* (*Arabidopsis* *NITRATE REGULATED1*), and *AGL21* (*AGAMOUS-Like21*) (Gan et al., 2005; Garay-Arroyo et al., 2013; Garcia-Cruz et al., 2016). In addition, orthologs of *Arabidopsis* root MADS-box genes from different plant species show similar expression patterns and potential functional conservation. These include MADS-box genes from rice (*Oryza sativa*), sweet potato (*Ipomoea batatas*), and *Chrysanthemum morifolium* (Ku et al., 2008; Puig et al., 2013; Sun et al., 2018; Alvarez-Buylla et al., 2019). Studies regarding the expression/function of MADS-box genes in legume species are yet scant. *XAL-1* and *XAL-2* genes have been identified from soybean (*Glycine max*) and alfalfa (*Medicago sativa*). These show a high level of expression in the root in soybean, but expression data from alfalfa genes are not available (Alvarez-Buylla et al., 2019). Also, high expression in roots and root hairs has been documented for *AGL21* soybean ortholog (Alvarez-Buylla et al., 2019). Previous work from our group identified orthologs of *Arabidopsis* root MADS-box genes from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean that are expressed in root tissues (Íñiguez et al., 2015).

Legumes can establish two types of endosymbiotic associations, with arbuscular mycorrhiza fungi and nitrogen-fixing bacteria, collectively called rhizobia (Olah et al., 2005; Oldroyd, 2013). These associations facilitate the plant acquisition of nutrients such as phosphorus and nitrogen (Oldroyd, 2013; Venkateshwaran et al., 2013).

An efficient symbiotic association with rhizobia results in the formation of root nodules where rhizobia are allocated and fix atmospheric nitrogen (N₂) informs that the legume host can assimilate in exchange for a carbon source. Symbiotic nitrogen fixation (SNF) is ecologically and economically important for sustainable agriculture because it reduces synthetic fertilizers and the cost of legume cultivation (Venkateshwaran et al., 2013; Castro-Guerrero et al., 2016). The infection of rhizobia to the root tissue is a complex process that involves communication between rhizobia and legumes through molecular signals, such

as flavonoids released by the plant root to the rhizosphere that is sensed by compatible rhizobia that, in turn, produce the lipochitooligosaccharides, known as nodulation factors (NF). NF perception by the plant triggers a series of molecular responses essential for rhizobial infection and nodule development (Roy et al., 2020). These responses include the rhizobia-induced root hair deformations or curling required to entrap the rhizobia into an infection chamber and initiate the formation of an infection thread -an invasive invagination of the plant cells- and the infection of the cortical root cells (Suzaki et al., 2015). After rhizobia infection, legumes activate intricate signaling pathways that include finely regulated nodulin genes to develop mature nodules with functionally differentiated bacteroids. Research from the last 20 years has identified a suite of *ca.* 200 legume genes relevant for establishing an effective symbiosis with rhizobia (Roy et al., 2020). The NODULE INCEPTION (NIN) TF gene is a master regulator for the rhizobia symbiosis. It plays an indispensable role in the rhizobial infection and nodule organogenesis symbiotic processes (Schauser et al., 1999; Marsh et al., 2007; Liu and Bisseling, 2020). Recently, it was shown that NIN also plays a major role in the transition from infection into functional nodules, the development of symbiosomes, and nodule senescence (Liu et al., 2021).

Because of the high carbon demand, SNF is an energy-demanding process for the legume host; therefore, the number of infections and the number of nodules per plant is tightly regulated by a systemic feedback regulatory mechanism termed autoregulation of nodulation (AON, Reid et al., 2011; Ferguson et al., 2019). Upon infection, rhizobia induce the root production of CLAVATA3/endosperm surrounding region-related (CLE) peptides, encoded by the *RIC1* and *RIC2* genes in soybean and common bean (Reid et al., 2011; Ferguson et al., 2014). These CLE peptides are transported from the root to the shoot, where they are detected by the nodule autoregulation receptor kinase (NARK) to activate the generation of a shoot-derived signal (i.e., miR2111 and cytokinin) (Tsikou and Yan, 2018; Ferguson et al., 2019). The shoot signals are transported to the root to inhibit further nodule development through the participation of the negative regulator TML (Too Much Love), a kelch repeat-containing F-box protein (Takahara et al., 2013). By interplay with other regulators, the NIN TF plays a relevant role in the AON process through the transcriptional activation of the CLE peptides (Soyano et al., 2014; Roy et al., 2020).

The information about legume MADS-box genes as regulators of the legume -rhizobia symbiosis is scarce. Three MADS-box genes from alfalfa (*Medicago sativa*) from the *AGL17* subfamily with high expression in nodules were cloned (*nmh7*, *nmhC5*, *ngl9*) (Heard et al., 1997; Zuccheri et al., 2001). Expression analysis of the alfalfa *NMH7* gene revealed its expression in flowers and nodules and the parenchyma or the root tip and the root elongation zone from seedlings (Páez-Valencia et al., 2008). The soybean *GmNMHC5* gene is highly expressed in roots and nodules, and its overexpression promotes lateral root development and nodulation (Liu et al., 2015). Contrastingly, the *GmNMH7*, MADS-box gene, highly expressed in roots and nodules, exerts negative control to nodulation, probably through regulating the content of gibberellin (Ma et al., 2019).

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is the most important crop legume for human consumption and the principal source of non-animal protein for human consumption in the developing world (Broughton et al., 2003). Research from our group focused on the common bean - rhizobia symbiosis has contributed to identifying microRNAs/TF target gene nodes that play a relevant role in the regulation of the SNF, such as miR172c/AP2-1 and miR319d/TCP10 (Nova-Franco et al., 2015; Martin-Rodriguez et al., 2018). We have also identified common bean and soybean MADS-box genes expressed in roots, similar to their Arabidopsis orthologs (Íñiguez et al., 2015). This work aimed to analyze the role of MADS-box genes from *P. vulgaris*, hereafter denominated *PvAGL* genes, in the common bean - rhizobia symbiosis that, to our knowledge, have not been studied in this legume. We performed a phylogenetic analysis of MADS-box genes for Arabidopsis and four legume species that identified clades, including root-expressed MADS-box genes from Arabidopsis and legumes. Expression analysis revealed that *PvAGL* genes are highly expressed in both rhizobia-inoculated roots and nodules. The functional analysis of composite *Rhizobium etli*-inoculated common bean plants with a modulated expression of *PvAGL* genes revealed the participation of TF from this gene family in rhizobial infection, expression of early symbiotic genes, root architecture, nodulation, nitrogenase activity, and the AON symbiotic process. Our work contributes to the knowledge of the participation of members from the MADS-box/AGL TF family in the legume - rhizobia SNF, a relevant process for sustainable agriculture.

MATERIALS AND METHODS

Phylogenetic Analysis

Gene sequences and the RNA-seq gene expression data for the MADS-box TFs genes for each plant species were retrieved from the following databases. For Arabidopsis, The Arabidopsis Information Resource TAIR (<https://www.arabidopsis.org>); for *P. vulgaris* the Gene Expression Atlas (GEA), *Pv* GEA (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>) (O'Rourke et al., 2014); for *G. max* the ePlant BAR page (http://bar.utoronto.ca/eplant_soybean/) (Waese et al., 2017), for *Medicago truncatula* the MtGEA (<https://mtgea.noble.org/v3/>) and *Lotus japonicus* the Lotus Base (<https://lotus.au.dk/>).

The translated protein sequences from the MADS-box genes were analyzed in Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) to confirm the presence of the characteristic domain IPR002100 from this gene family. Next, the protein sequences were analyzed with blast v2.6.0 and aligned with clustalw v2.1 (Thompson et al., 1994) to confirm that proteins share a stereotypical MIKC structure with four domains characteristic of type II MADS-box genes of the plant (Alvarez-Buylla et al., 2000b; Smaczniak et al., 2012). Finally, the proteins with MIKC structure were re-analyzed by multiple alignments to verify the integrity of the MADS domain (~60 amino acidic region). Some protein sequences from each species were excluded for phylogenetic analysis because these did not have a complete MADS domain sequence. The whole set of 511 MADS protein sequences from

Arabidopsis and four legume species used for phylogenetic analysis are listed in the **Supplementary Table 1**.

The best evolutionary model (JTT+G) was determined with Prottest3 v3.4.2, and a maximum likelihood phylogeny was made with PhyML v3.0 using approximate likelihood-ratio test SH-like as a statistical test for branch support. Finally, the Interactive Tree of Life (iTOL5) (Letunic and Bork, 2019) was used for displaying the phylogenetic tree.

Plant Material and Growth Conditions

The common bean (*P. vulgaris*) Mesoamerican cv BAT93 was used in this work (Vlasova et al., 2016). Seeds were surface sterilized in 10% (V/V) commercial sodium hypochlorite for 10 min and finally rinsed three to four times in sterile distilled water. Then seeds were germinated on sterile moistened filter paper at 30°C in darkness for 2 days. Germinated seedlings were planted in pots with wet sterile vermiculite. For SNF conditions, plantlets were inoculated with 1 ml saturated liquid culture of the *Rhizobium etli* CE3 strain per plant. Plants were grown in growth chambers under controlled environmental conditions (25–28°C, 16 h photoperiod) and were watered every 3 days with N-free B&D nutrient solution (Broughton and Dilworth, 1971). For non-inoculated conditions, a full nutrient B&D solution (5 mM N-content) was used to water the plants. Common bean composite plants with transgenic roots were generated as described below and grown in sterile pots with perlite to prevent harming the transgenic root/nodules when taking these out of the pot at harvest time. The growth conditions of composite plants were similar to those described for wild-type plants.

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA was isolated from frozen tissues collected directly into liquid nitrogen and stored at –80°C. The wet weight used for RNA isolation from each tissue was: 100 mg for nodules detached from roots, 250 mg for roots, and 200 mg for leaves. Trizol™ Reagent (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) was used, following the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Inc.). For quantification of transcripts levels, total RNA (2 µg) was treated with DNaseI RNase-free (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) to remove genomic DNA. First, strand cDNA was synthesized using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). The resulting cDNAs were then diluted and used to perform qRT-PCR assays using SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fischer Scientific, Inc.), following the manufacturer's instructions. The sequences of oligonucleotide primers used for qRT-PCR of each gene are provided (**Supplementary Table 2**). Assays were run in 96-well plates using the 7300 Real-Time PCR System and 7300 System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with settings of 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 57°C for 60 s. Relative expression for each sample was calculated using the “comparative Ct method” and normalized with the geometrical mean of three housekeeping genes (HSP, MDH, and UBQ9) (Vandesompele et al., 2002). Student's *t*-test

was performed to evaluate the significance of the differential expression using the mean values from three biological replicates for each condition, using the GraphPad Prism v8.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Plasmid Construction, Plant Transformation, and Generation of Composite Plants

For overexpression of the Phvul.008G027800.1 *P. vulgaris* MADS-box gene, hereafter denominated *PvFUL*-like (Phvul.008G027800) based on its ortholog Arabidopsis *FUL* (*FRUITFULL*), was PCR-amplified using as template cDNA from common bean roots and the specific primers Up_ *FUL* 5'-CCCTCGAGCTTTTCCACAATTGCC-3' and Lw_ *FUL* 5'-GCCCGGATCCTAACTAGTAAGTAG-3'. The purified PCR product (767 bp) was cloned into the pTOPO2.1 intermediate vector and confirmed by sequencing. To construct the OE_ *FUL* plasmid, the *PvFUL*-like DNA region was excised using XhoI/BamHI sites and cloned into the pTDTO plasmid (Aparicio-Fabre et al., 2013). This expression plasmid contains the 35S cauliflower mosaic virus (35SCaMV) promoter and the tdTomato (red fluorescent protein) gene as a visible reporter gene. For silencing *PvAGL* genes, by RNAi strategy, specific primers flanking a DNA region coding for the MADS-domain from the *PvFUL*-like gene (Up_ RNAi 5'-TCAGCTCAAGCGGATCG-3' and Lw_ RNAi 5'-CACCACGTTCCAAGACATCTT-3') were used to amplify a 194 bp fragment using as template cDNA from common bean roots. This DNA fragment, that share homology among *PvAGL* genes highly expressed in roots/nodules, was cloned by the Gateway system into the intermediate vector pENTR and finally in the pTDT-DC-RNAi plasmid (Valdes-Lopez et al., 2008), which also contains the 35S cauliflower mosaic virus (35SCaMV) promoter and the tdT (tandem double Tomato, red fluorescent protein) gene as a visible reporter gene.

The empty vectors pTDTO and pTDT-DC-RNAi, hereafter denominated EV, and the resulting plasmids OE_ *FUL* and RNAi_ *AGL* were introduced by electroporation into *Agrobacterium rhizogenes* K599, which was then used for plant transformation as described (Estrada-Navarrete et al., 2007) with minor modifications (Aparicio-Fabre et al., 2013). In addition, the presence of red fluorescence from the tdTomato reporter gene was routinely checked in the putative transgenic roots/nodules using a fluorescence stereomicroscope.

Identification of Putative *Cis*-Regulatory Elements in *P. vulgaris* Genes

DNA sequences from the region upstream of the initiation codon were retrieved from Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). The length of the intergenic 5'-upstream sequences analyzed was 20 kbp or shorter depending on the position of the next contiguous gene. For *PvFUL*-like gene 7.3-kb sequence was analyzed using the New PLACE tool (A Database of Plant *Cis*-acting Regulatory Elements; <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (Higo et al., 1999) to identify putative *cis*-regulatory elements related to nodulation or root development; these are shown in **Supplementary Figure 2**.

Upstream sequences of *P. vulgaris* early symbiotic genes were analyzed using SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA; available at snapgene.com) to identify the consensus CARG-box sequence that is recognized by AGL TF (Riechmann et al., 1996).

Root Hair Deformation Analysis

Common bean composite plants, expressing the empty vectors (EV) or OE_*FUL*/RNAi_*AGL* plasmids and growing in 25 cm × 25 cm Petri dishes containing nitrogen-free Fahræus medium (Catoira et al., 2000), were inoculated with 1 mL of saturated *Rhizobium etli* CE3 culture (OD₆₀₀ = 1). Five days after inoculation, tomato-positive transgenic roots were collected. The root-susceptible zone for rhizobial infection covered around 2 cm was stained with methylene blue for 1 h to maximize contrast and washed three times with double-distilled water. The quantification of the number of rhizobia-induced root hair deformations was determined from 1 cm root segments from the susceptible zone. Deformation events were observed with a bright-field microscope equipped with an 18 MP Digital Camera with Aptina CMOS Sensor (Cientifica Vela Quin, Iztapalapa, Mexico city, Mexico). A total of 20 independent biological replicates were generated, each one including 10 plants.

Phenotypic Analysis and Nodule Histology

For root length, root area, and nodule perimeter evaluations, pictures from root or nodule tissues of composite plants (18 or 28 dpi) were processed with SmartRoot software (Lobet et al., 2011).

Determination of the Nase-enzyme activity was determined in nodulated roots (28 dpi) by acetylene reduction assay (ARA) described by Hardy et al. (1968). Specific activity is expressed as nmol ethylene h⁻¹/plant.

For histological analysis, nodules (28 dpi) were collected from composite plants transformed with EV or OE_*FUL*/RNAi_*AGL* plasmids and were treated with the procedure described by Reyero-Saavedra et al. (2017). In addition, representative images from safranin-stained sections (25 μm) were taken with a NIKON camera coupled to a bright-field microscope.

Statistical Analyses

The graphs and statistical analysis were made with the R software 3.0.1 or the GraphPad Prism v8.0. The specific statistical tests performed are indicated in the legend of the corresponding figures.

RESULTS

Phylogeny of the MADS-Domain TF From Arabidopsis and Legume Plants

In plants, the MADS-box is a large gene family of TF. The number of family members varies in different plant species. In this work, we identified MADS-box genes for four legume species. For *P. vulgaris* (common bean), we identified 93 AGL genes, for *G. max* (soybean) 183, for *M. truncatula* (Medicago) 143, and *L. japonicus* (Lotus) 79. For the phylogenetic analysis of MADS TF from Arabidopsis and four legume species, those MADS protein sequences that did not show a complete MADS domain sequence

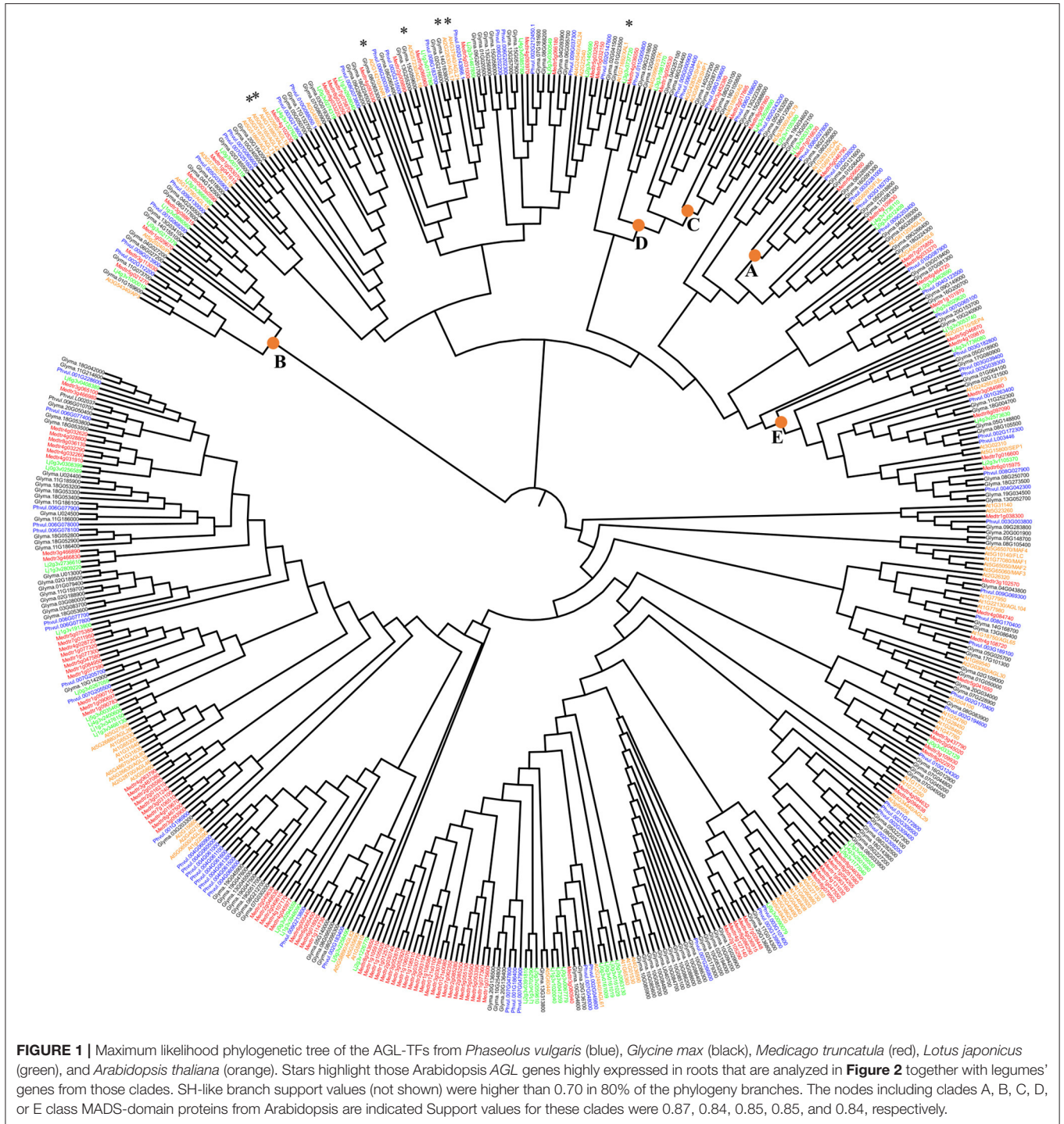
were excluded. Thus, a 511 MADS-domain protein sequences set (**Supplementary Table 1**) was used for the maximum likelihood phylogenetic tree shown in **Figure 1**.

The majority of clades from the phylogenetic tree (**Figure 1**) group MADS from Arabidopsis and the four legumes species analyzed, suggesting that MADS TF from the same clade share their tissue expression and their participation in regulatory networks from a certain vegetative tissue. In **Figure 1**, we indicated seven Arabidopsis root-expressed MADS-box genes from five different clades involved in regulating root development (Alvarez-Buylla et al., 2019). We assessed if the legume MADS-box genes grouped in these monophyletic clades were also expressed in root and if, additionally, these were expressed in root-nodules elicited by rhizobia. The clade from **Figure 2A** includes *ANR1* (*ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1*; (Gan et al., 2005) and six legume MADS-box genes with high expression in root tissues, and five of these also showed expression in nodules. The Arabidopsis *XAL1* (Garcia-Cruz et al., 2016) clade (**Figure 2B**) groups five legume genes that showed enhanced expression in roots, and three of these also showed expression in nodules. The clade depicted in **Figure 2C** includes *XAL2* and *AGL19* (Alvarez-Buylla et al., 2000a, 2019; Garay-Arroyo et al., 2013) as well as five legume MADS-box genes that were expressed in root and nodules. **Figure 2D** shows the clade with *AGL17/21* genes (Burgeff et al., 2002; Alvarez-Buylla et al., 2019) grouped with five legume genes that showed expression in roots, and four of these were also expressed in nodules. The clade from **Figure 2E** includes the *AGL16* (Nawy et al., 2005) and five legume genes whose expression in roots or nodules was >50%, compared with the expression level from other organs.

Expression Analysis of PvAGL Genes in Root/Nodule

Previous work from our group identified the MADS-box genes from common bean and soybean, an ortholog of root-expressed Arabidopsis MADS-box genes that are expressed in roots and nodules (Íñiguez et al., 2015). Our previous report (Íñiguez et al., 2015) and data presented in **Figures 1, 2** prompted us to propose that *P. vulgaris* AGL genes highly expressed in roots/nodules participate as regulators of the common bean - rhizobia symbiosis. In this work, we updated the analysis of *PvAGL* genes based on the recent annotation of the *P. vulgaris* genome sequence (www.phytozome.net/commonbean.php) and the identification of the total number of *PvAGL* genes from this work (**Figure 1**). RNA-seq data analysis revealed 16 *PvAGL* genes, out of 93 gene family members, with expression in root and nodule tissues compared with their expression in the stem, leaf, pod, and seed tissues (**Supplementary Figure 1**). To assess the reliability of the RNA-seq data, we performed qRT-PCR gene expression analysis from root, nodules, and leaves tissues and confirmed that these *PvAGL* genes are expressed in root/nodules, albeit at different levels (**Supplementary Figure 1**).

We pursued the expression analysis of six *PvAGL* genes that showed the highest expression in root/nodule tissues (**Supplementary Figure 1**) by assaying their transcript levels



from these tissues of *R. elti*-inoculated plants as well as from root of non-inoculated plants at different developmental stages. According to our phylogenetic analysis, the name we assigned to each PvAGL gene corresponds to its *Arabidopsis* ortholog (**Figure 1**). **Figure 3** shows expression level values for PvAGL16-like, PvSVP-like (*SHORT VEGETATIVE PHASE*), PvXAL1-like, PvSOCI-like (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF*

CONSTANS 1), PvAGL24-like, and PvFUL-like (*FRUITFULL*). The six genes analyzed showed significantly lower expression in young roots compared with increased levels in roots from later developmental stages, except for PvXAL1-like that showed high expression in 12-h roots (**Figure 3**). These genes were also expressed in immature (10–15 dpi), mature (22 dpi), and senescent (35 dpi) nodules, albeit at a lower level than

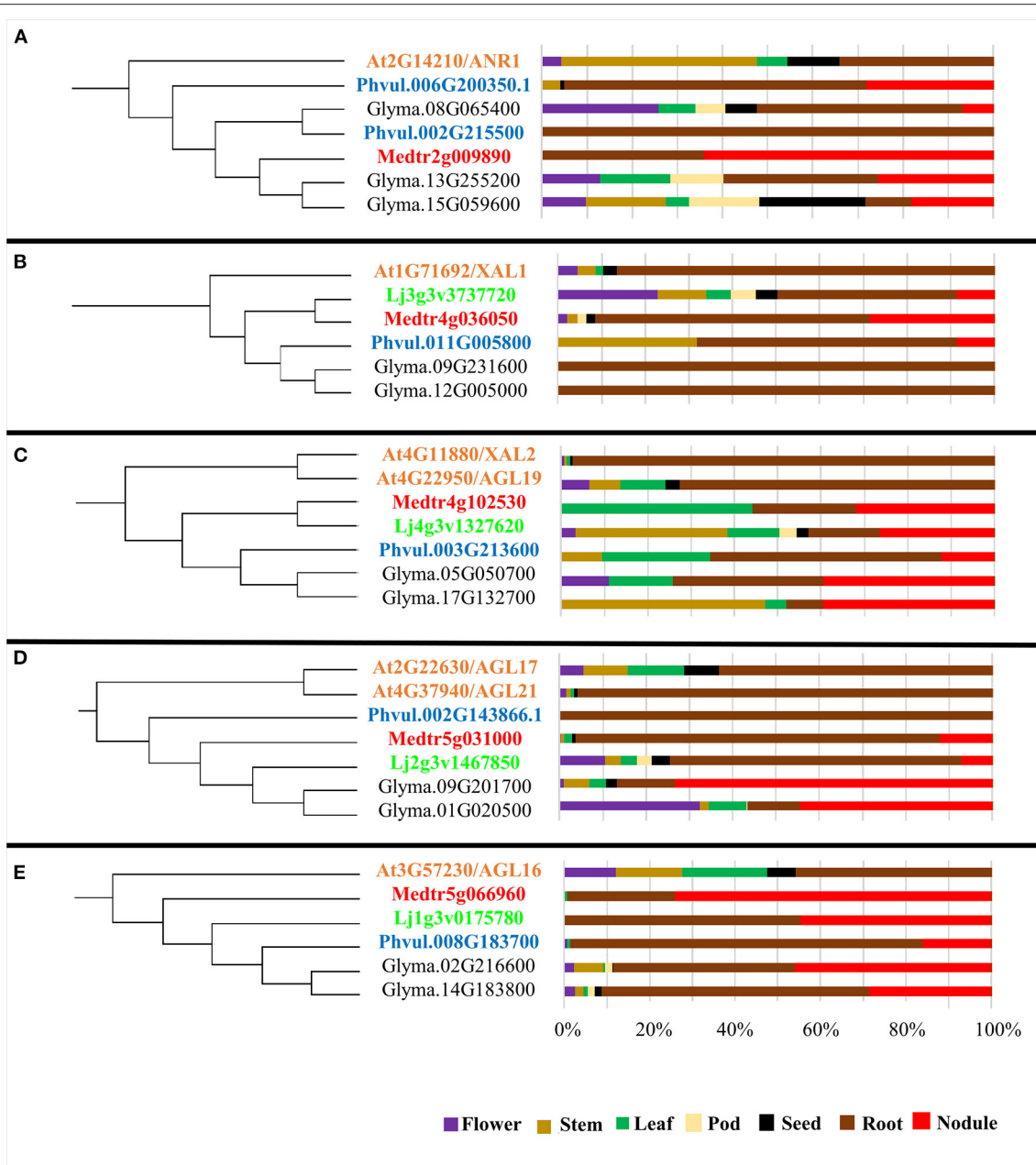
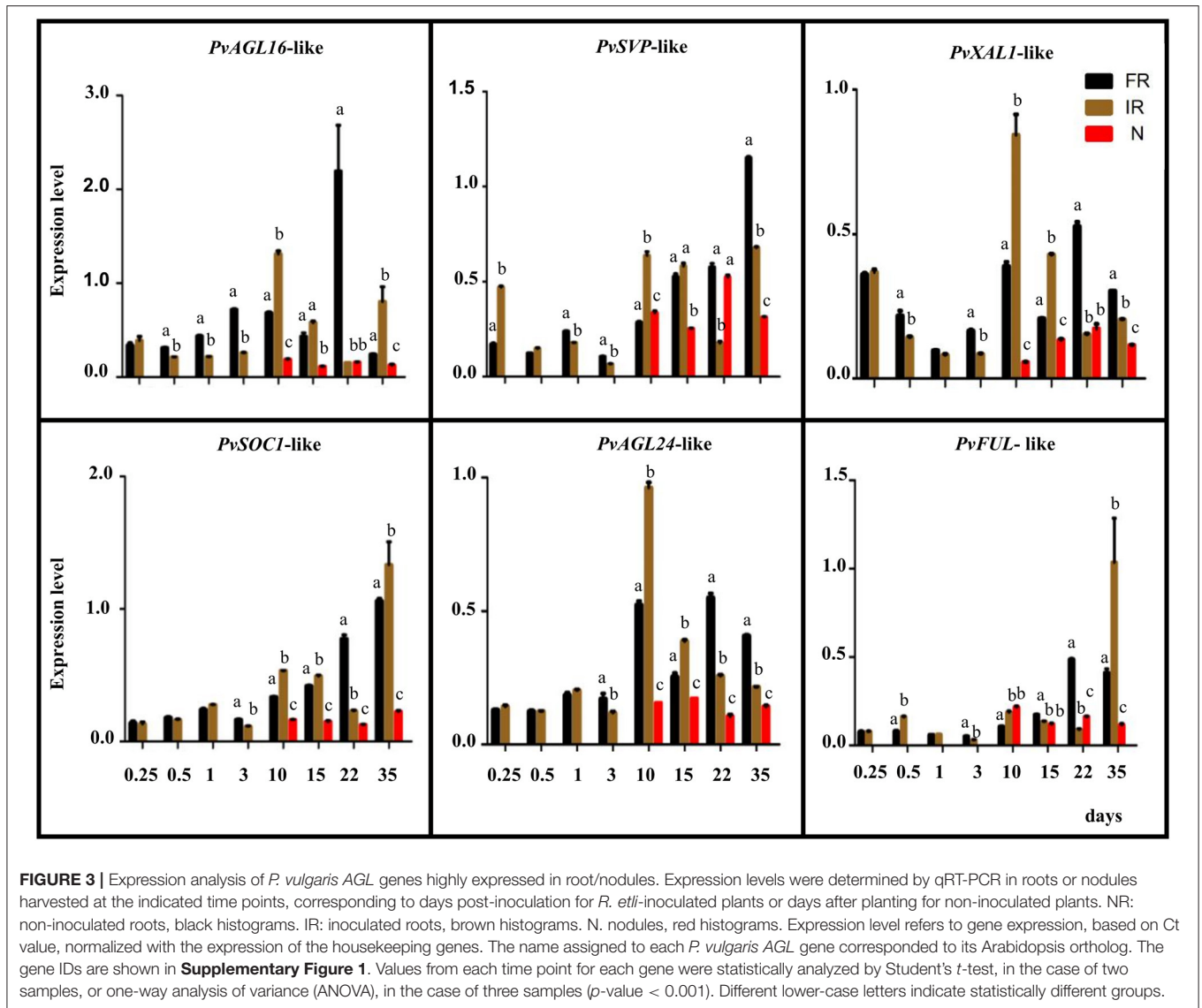


FIGURE 2 | Expression profile by tissue of AGL genes from different plant species grouped in clades including Arabidopsis AGLs highly expressed in roots. **(A–E)** The left side of each panel shows one selected clade (highlighted in **Figure 1**); the color code used for genes from each species is the same as in **Figure 1**. The right side of each panel shows the % expression level in each tissue (flower, purple; stem, ocher; leaf, green; pod, beige; seed, black; root, brown and nodule, red) of the corresponding AGL gene. As indicated in the Material and methods section, expression level values were extracted from the Gene Expression Atlas for each species.

in non-inoculated or inoculated roots, except for *PvFUL*-like (**Figure 3**).

Interestingly, the transcript level of the *PvFUL*-like gene in rhizobia-inoculated plants was similar in roots compared with immature nodules and was higher in mature nodules compared with roots. In contrast, at nodule senescence, the expression in roots was highly increased (**Figure 3**). Furthermore, the *cis*-elements *in*

silico analysis of *PvFUL*-like gene promoter sequence (**Supplementary Figure 2**) revealed the presence of the organ-specific elements OSE1ROOTNODULE (Vieweg et al., 2004) and OSE2ROOTNODULE (Fehlberg et al., 2005) with characteristic consensus sequences motifs of the promoters activated in infected cells of root nodules. These were repeated 9 and 18 times, respectively, among the analyzed sequence (**Supplementary Figure 2**). In addition, one *cis*-element related



to root development, repeated 39 times, was also identified (**Supplementary Figure 2**).

Effect of PvAGL TF in Rhizobia-Infection of *R. etli*-inoculated Common Bean Plants

To further investigate the regulatory role of root/nodule-expressed *PvAGL* TF genes in the common bean-rhizobia N-fixing symbiosis, we aimed to modulate their expression in common bean composite plants – with transgenic root/nodules and untransformed aerial organs – generated through *A. rhizogenes*-mediated transformation (Estrada-Navarrete et al., 2007).

The *PvFUL*-like gene was selected for the over-expression construct (OE_*FUL*) and the silencing construct (RNAi_*AGL*) driven by the 35SCaMV promoter. These constructs and the empty control vector (EV) contained the tdTomato (red fluorescent protein) reporter gene (Valdes-Lopez et al., 2008;

Aparicio-Fabre et al., 2013). As expected, a very high *PvFUL*-like transcript level was expressed in transgenic roots and nodules from composite plants transformed with OE_*FUL* (**Supplementary Figure 3**). The (194 bp) cDNA fragment from the *PvFUL*-like gene used for the RNAi construct (**Supplementary Figure 4**) codes for the MDS-box sequence. Multiple sequence alignment analysis of this *PvFUL*-like gene sequence with a corresponding sequence of *PvAGL* genes showed similar sequence identity, ranging from ca. 50–70% (**Supplementary Figure 4**). Gene expression level from the six *PvAGL* genes highly expressed in root/nodules (**Figure 3**) was determined from transgenic roots and nodules expressing the EV or the RNAi constructs (**Supplementary Figure 5A**). Compared with control EV tissues, the roots and nodules expressing the silencing construct have a significantly decreased expression level of *PvFUL*-like gene and *PvXALI*-like, *PvSVP*-like, *PvSOC1*-like and *PvAGL16*-like, and *PvAGL24*-like. Gene silencing

in nodules was high, showing a very low expression level; generally, the silencing effect in roots was lower than in nodules (**Supplementary Figure 5A**). In agreement with published GEA data (O'Rourke et al., 2014; Íñiguez et al., 2015) and data from **Supplementary Figure 1**, we confirmed very low, negligible, expression of other 10 *PvAGL* genes in EV and RNAi_*AGL* roots/nodules (**Supplementary Figure 5B**). The simultaneous silencing of several *PvAGL* genes in transgenic roots/nodules interpreted as a result of the homology among *MADS*-box cDNA sequence cloned for the RNAi silencing strategy would avoid functional redundancy among these genes. It may result in highly altered phenotypes of RNAi_*AGL* plants (see below).

Common bean plantlets transformed with *A. rhizogenes* bearing the RNAi_*AGL* developed fewer and shorter hairy roots, emerging from the infection site, instead of those transformed with OE_*FUL* or EV that showed numerous and longer hairy roots (**Figure 4A**). In addition, the RNAi-*AGL* composite plants grown under non-inoculated conditions showed reduced root growth (**Figure 4D**).

To assess if the negative effect of *PvAGL* silencing in hairy root formation/growth also affects the common bean symbiosis with rhizobia, we first analyzed rhizobial infection to young transgenic roots inoculated with *R. etli* CE3. No significant differences in root hair development nor root hair density were observed in control (EV) plants than roots with modulation of *PvAGL*-gene expression (**Supplementary Figure 6**). Next, we quantified the root hair deformation upon rhizobia infection (**Figure 5**). Notably, inoculated roots expressing the RNAi_*AGL* construct showed significantly fewer effective deformed or curled roots hairs (**Figures 5A,B**) that form an infection chamber, where rhizobia are trapped would allow the formation of the infection thread (Fournier et al., 2015). In addition, *PvAGL*-silenced roots showed an increased number of non-effective or spatula-like (Reyero-Saavedra et al., 2017) root hair deformations (**Figures 5C,D**). The inoculated roots overexpressing the *PvFUL*-like gene showed a similar number of curled root hair than control EV inoculated roots (**Figure 5B**).

The fact that the silencing of *PvAGL* genes negatively affected the rhizobia infection process led us to hypothesize that the *PvAGL* TFs regulate, either directly or indirectly, the expression of key symbiosis-related genes. To test this hypothesis, we evaluated the expression level of *PvENOD93* (*EARLY NODULIN 93*), *PvENOD40* (*EARLY NODULIN 40*), *PvNIN*, *PvNSP2* (*NODULATION SIGNALING PATHWAY 2*), *PvFNSII* (*FLAVONE SYNTHASE II*), and *PvFLOT2* (*FLOTILLIN 2*) genes from RNAi_*AGL*, OE_*FUL* and EV roots inoculated with *R. etli* for 2 days. The data presented in **Figure 6** showed that, compared with gene expression level in EV control roots, every gene evaluated showed reduced transcript level in RNAi-*AGL* roots but an increased transcript level in OE_*FUL* roots. Thus, there was a correlation between altered root hair deformation and the expression of early symbiotic genes essential for rhizobial infection (**Figures 5, 6**). Furthermore, to infer if these *P. vulgaris* early symbiotic genes could be direct targets of *PvAGL* transcriptional regulation, we searched for the consensus DNA sequence recognized by AGL TFs, the so-called CARG-box,

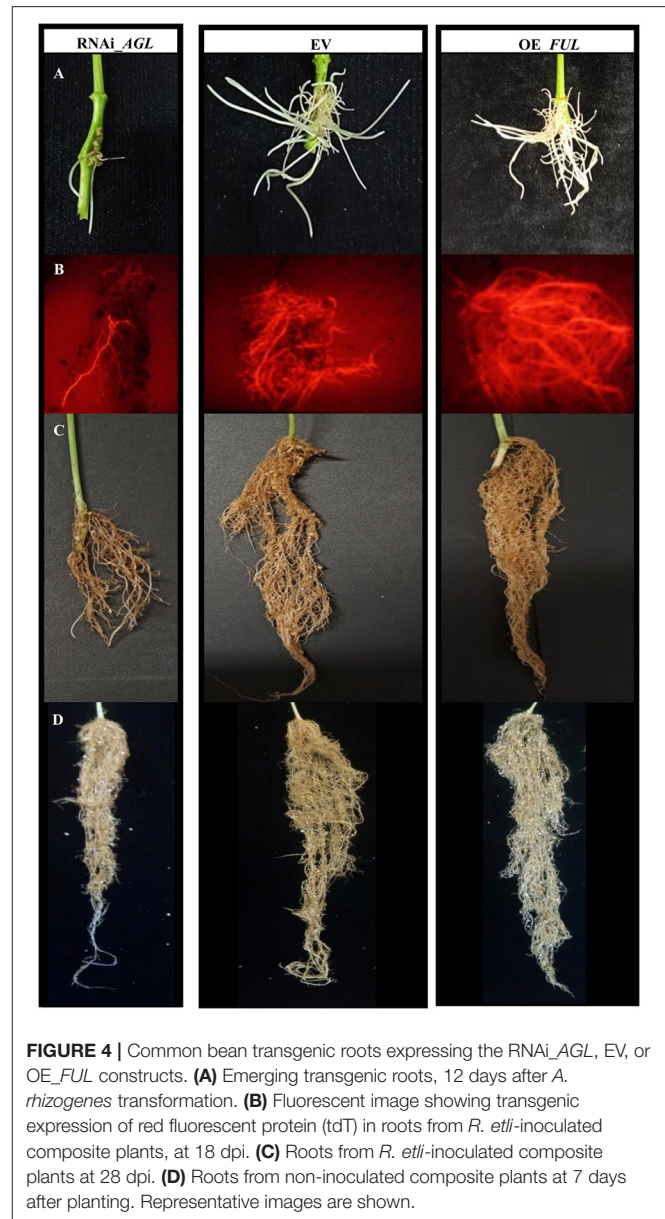


FIGURE 4 | Common bean transgenic roots expressing the RNAi_*AGL*, EV, or OE_*FUL* constructs. **(A)** Emerging transgenic roots, 12 days after *A. rhizogenes* transformation. **(B)** Fluorescent image showing transgenic expression of red fluorescent protein (tdT) in roots from *R. etli*-inoculated composite plants, at 18 dpi. **(C)** Roots from *R. etli*-inoculated composite plants at 28 dpi. **(D)** Roots from non-inoculated composite plants at 7 days after planting. Representative images are shown.

in their promoter region. As a result, we identified a CARG-box in the promoter region of *PvNIN* and *PvNSP2* (**Table 1**). We then determined the expression level of these two genes in 2-day-old non-inoculated transgenic roots. Our data indicated that the basal expression level of *PvNSP2* was similar in the control (EV) and modulated (RNAi_*AGL* or OE_*FUL* roots). However, the gene expression level of *PvNIN* in non-inoculated control EV roots (0.023 ± 0.003) was significantly decreased in RNAi_*AGL* roots ($0.001 \pm 7 - 0.0001$) while it significantly increased in OE-*FUL* roots (0.052 ± 0.003). This data supported our hypothesis proposing that *PvAGL* TF might be implicated in *PvNIN* regulation.

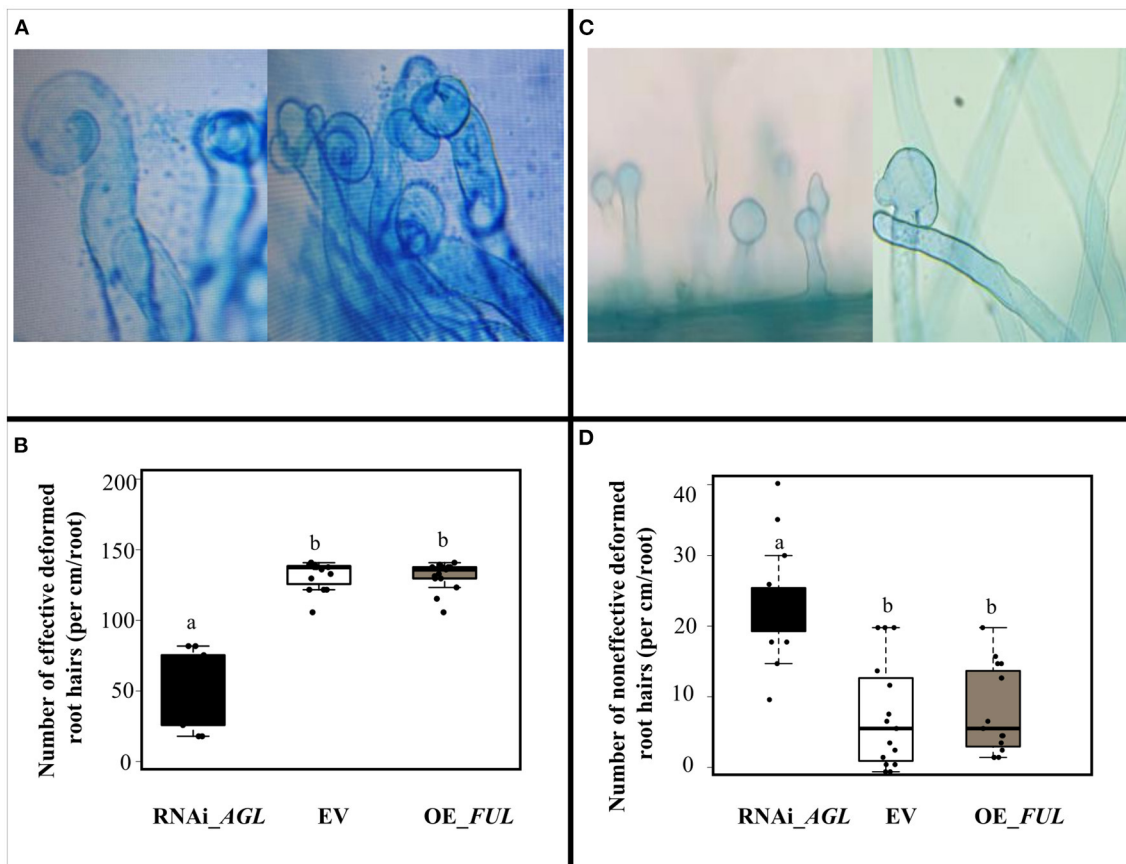


FIGURE 5 | Response to rhizobial infection of transgenic roots expressing the RNAi_AGL, or OE_FUL construct compared with the control vector (EV). **(A)** Representative images of characteristic rhizobia-induced root hair deformation in common bean transgenic roots. **(B)** The number of effective rhizobia-induced root hair deformation in transgenic roots expressing each construct. **(C)** Representative images of spatula-like deformed root hair observed in RNAi_AGL silenced roots. **(D)** The number of aberrant rhizobia-induced root hair deformations in transgenic roots expressing each construct. Data shown were obtained from 5-days old seedlings and inoculated with *R. etli* as described in the Material and Methods section. The number of rhizobia-induced root hair deformation events were quantified per cm/root from the susceptible zone from 20 different common bean roots. The horizontal box side represents the first and third quartile in box plots while the outside whiskers the minimum and maximum values. Different lower-case letters indicate a significant difference according to one-way analysis of variance (ANOVA) (p -value < 0.001).

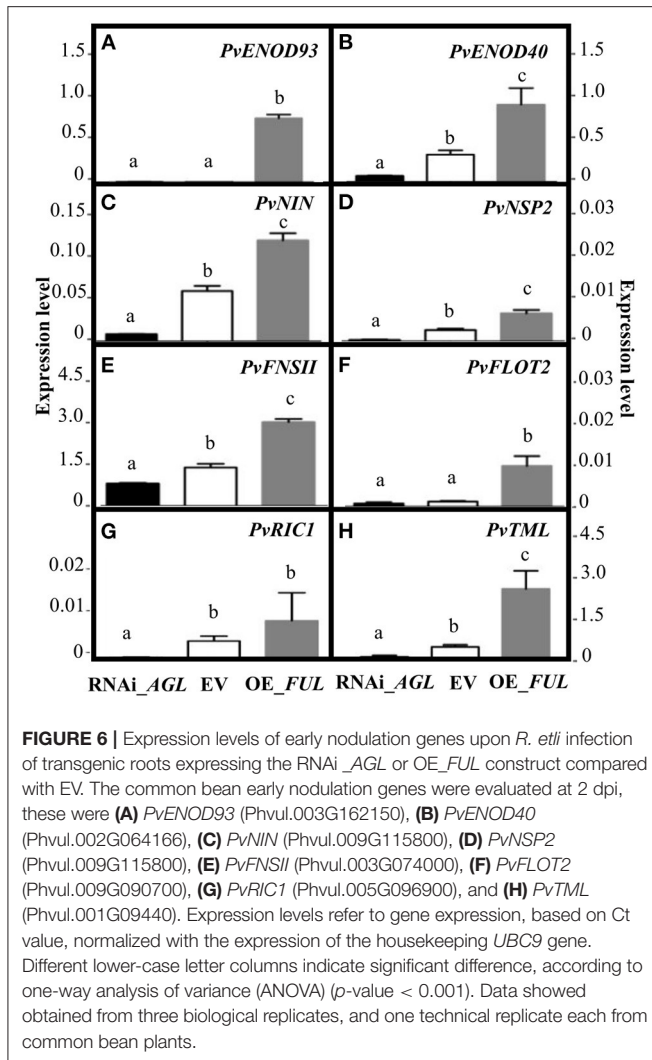
Effect of PvAGL TF in Root and Nodule Development of Common Bean in Symbiosis With *R. etli*

We assessed if the affection of rhizobia-infection and early symbiotic gene expression in composite plants with modulation in *PvAGL*-gene expression results in altered root and nodulation phenotype.

An evident decrease in the transgenic roots formed, and the root growth was observed in *PvAGL*-silenced composite plants (Figures 4B,C). Analysis of root architecture revealed decreased root length, area, and biomass of RNAi_AGL roots compared with control (EV) roots, both at 18 and 28 dpi (Figures 7A–C). In agreement, the foliage/root ratio was increased in RNAi_AGL composite plants (Figure 7D). Contrastingly, plants transformed with OE_FUL showed an adequate formation and root architecture of transgenic roots (Figures 4B,C). In addition, the roots overexpressing *PvFUL*-like

showed increased root length, area, and biomass compared with EV roots at 28 dpi (Figures 7B,C).

Regarding the nodule phenotype, we observed that compared with EV plants, RNAi_AGL composite plants formed fewer nodules at 18 dpi, but at a later stage (28 dpi), their nodule number increased (Figure 8A). A high proportion of small nodules were observed in RNAi_AGL transgenic roots at 28 dpi (Figures 8B,C). However, each plant's nodule dry weight per root system was similar among the RNAi_AGL, OE_FUL, and EV plants. Microscopic image of RNAi_AGL nodule sections revealed defective, small nodules with decreased number of infected cells (Figure 9). By contrast, compared with EV plants, OE_FUL forms fewer nodules but with increased size (Figures 8A,B). A high proportion of medium and large size nodules was observed in OE_FUL plants (Figures 8C, 9). The OE_FUL healthy nodules showed a full infected zone (Figure 9).



Nodule function was then evaluated by determining nitrogenase activity through ARA. In agreement with their smaller size and fewer infected cells (Figures 8, 9), RNAi_AGL nodules displayed a significantly lower nitrogenase activity compared with that from EV or OE_FUL nodules (Figure 8D).

Effect of PvAGL TF in the AON of the Common Bean – *R. etli* Symbiosis

Knock-out mutants from different legume species, defective in the shoot nodule autoregulation receptor kinase (*NARK*, in common bean and soybean) present a characteristic hypernodulation or supernodulation phenotype; but the nodules formed, in higher number, are ineffective, white and small (Reid et al., 2011). This phenotype resembles the one observed in composite common bean plants silenced in *PvAGL* genes (Figures 8, 9). Thus, we analyzed if RNAi_AGL composite plants are altered in the root components of the AON. As shown in Figure 6G, the expression level of the *PvRIC1* gene was very low

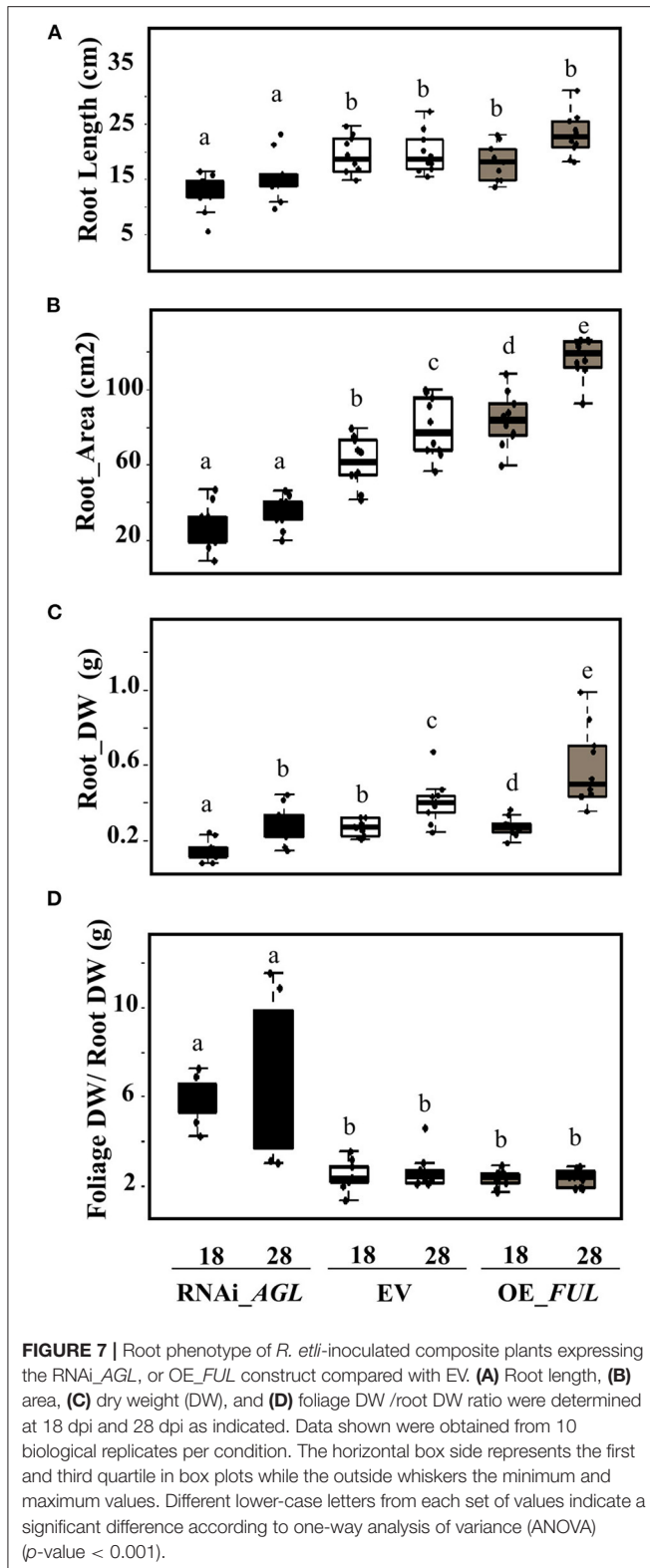
TABLE 1 | Identification of CARG-box sequences in *P. vulgaris* early symbiotic genes.

Gene name	Gene ID	CARG sequence	Position relative to the initiation codon
<i>PvNIN</i>	Phvul.009G115800	CCTTTATAGG	–9166/–9157
<i>PvNSP2</i>	Phvul.009G122700	CCATATATGG	–3736/–3727
<i>PvRIC1</i>	Phvul.005G096901	CCAAAAAAGG	–16998/–16989
<i>PvTML</i>	Phvul.001G094400	CCATTTATGG	–718/–709
		CCAAATTTGG	–7715/–7706
		CCATTTAAAGG	–8099/–8090

in *R. etli*-inoculated roots expressing the RNAi_AGL construct. This correlates with the low expression of *PvNIN* (Figure 6C), known to be the transcriptional regulator of *RIC* genes (Soyano et al., 2019; Roy et al., 2020). In addition, the *TML* gene, encoding an AON negative regulator of further nodule formation, also shows diminished expression in RNAi_AGL transgenic roots (Figure 6H). By contrast, the roots overexpressing *PvFUL*-like formed a lower number of medium or large nodules compared with EV (control) plants (Figures 8, 9) and showed higher expression of *PvNIN* and *PvTML* (Figures 6C,H). Furthermore, we identified CARG-box sequences repeated three times in the *PvTML* promoter region (Table 1); however, the expression level of *PvTML* in non-inoculated transgenic roots was similar to EV silenced and overexpressing roots. Taken together, these results indicate a positive effect of *PvAGL* genes in the AON process of the rhizobia N-fixing symbiosis, possibly exerted through the interaction with *PvNIN*, relevant for the regulation of this process.

DISCUSSION

In plants, the *MADS*-box/*AGL* genes constitute a large TF family with diverse and essential biological functions to regulate the development of almost every plant organ. Phylogenies of plant *MADS*-box genes have provided information for studies of evolution and developmental genetic pathways (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Liljegren et al., 2000). In this work, we present a phylogeny of *MADS*-box genes from Arabidopsis and the legumes: common bean, soybean, Medicago, and Lotus. Initial research of Arabidopsis *MADS*-box genes focused on floral development, and it gave rise to the so-called ABCDE model of floral organ specification (Smaczniak et al., 2012). The phylogenetic tree (Figure 1) indicates the clades of Arabidopsis homeotic genes from A, B, C, D, or E classes that group *MADS*-box genes from the four legumes analyzed. Data from legume GEAs generally indicated a high expression of such legume genes in flowers. For example, the clade, including the class A *API* gene from Arabidopsis, involved in specifying sepals and petals (Mandel et al., 1992), also includes genes from the four legume species highly expressed in flowers. However, its expression in specific flower tissues, i.e., sepals and petals, has not been documented. This agrees with previous knowledge indicating



that Arabidopsis MADS-box genes that form a monophyletic clade share similar tissue expression and likely share regulatory function (Alvarez-Buylla et al., 2000a).

On the other hand, the phylogenetic analysis suggested that the evolution of the MADS-domain family has involved a simultaneous functional diversification in vegetative and reproductive structures (Alvarez-Buylla et al., 2000a; Liljegren et al., 2000). Examples of such diversification were found in the class B genes represented by the AP3 and PISTILLATA (PI) gene clades (Jack et al., 1992; Goto and Meyerowitz, 1994). The legume genes grouped in the AP3 clade include the soybean genes Glyma04G245500 that, according to GEA data, is expressed in flowers and root; and Glyma.06G027200 (NMF7) gene that is highly expressed in roots and nodules (Ma et al., 2019). According to the GEA data, the PI clade includes the Medicago Medtr1g029670 gene that, in addition to flower, is highly expressed in nodules.

Based on data from Arabidopsis and legumes gene expression atlas, we analyzed the expression pattern of seven genes from five clades that include seven Arabidopsis MADS-box genes known to be important regulators of root development (Alvarez-Buylla et al., 2019; **Figure 1**). These genes are: ANR1 that is a key determinant for developmental root plasticity and has a regulatory role in nutrient response through controlling lateral root elongation in response to nitrate (Gan et al., 2005); XAL1 that plays a principal role during root development, possibly regulating the expression of genes that are components of the cell cycle (Garcia-Cruz et al., 2016); XAL2, another relevant gene for Arabidopsis root development, that controls auxin transport via PIN (Garay-Arroyo et al., 2013; Alvarez-Buylla et al., 2019); AGL19 that is expressed in the columella, lateral root cap and epidermal cells of the meristematic region of the primary and lateral root tips (Alvarez-Buylla et al., 2000a); AGL17 gene that seems to be a lateral root cap marker in the root tip (Burgeff et al., 2002); AGL21, which is highly expressed in lateral root primordia and it has a punctual expression in the primary root meristem (Alvarez-Buylla et al., 2019) and AGL16 gene that is expressed at relatively high levels in the Arabidopsis root quiescent center (Nawy et al., 2005) and shows an intermediate expression level in phloem, xylem and procambium of the root mature zone (Alvarez-Buylla et al., 2019). Evident variations in the expression pattern from seven plant organs were observed among Arabidopsis and the legume MADS-box genes grouped in each clade (**Figure 2**). Such variations may be related to the different ages/conditions of the different organs from the consulted database from each plant species. For example, data for AGL genes expression in leaf were from 21-day-old common bean leaves, Gm, 28 days old for Medicago, 42 days old for Lotus, and young leaves for Arabidopsis consulted gene expression atlas. However, all the legume MADS-box genes from analyzed clades showed expression in roots, ranging from 9 to 100% compared with the level of expression in other organs. Notably, all the legume genes, except *P. vulgaris* (Phvul.002G143866, **Figure 2D**), were also expressed in legume nodules (7 to 74%), developed from roots inoculated with rhizobia.

Recent research in Lotus and Medicago has demonstrated that legumes co-opted a lateral root developmental program, from Arabidopsis, to control nodule organogenesis (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019). The case of study in these reports are the legume orthologs of the Arabidopsis ASYMMETRIC

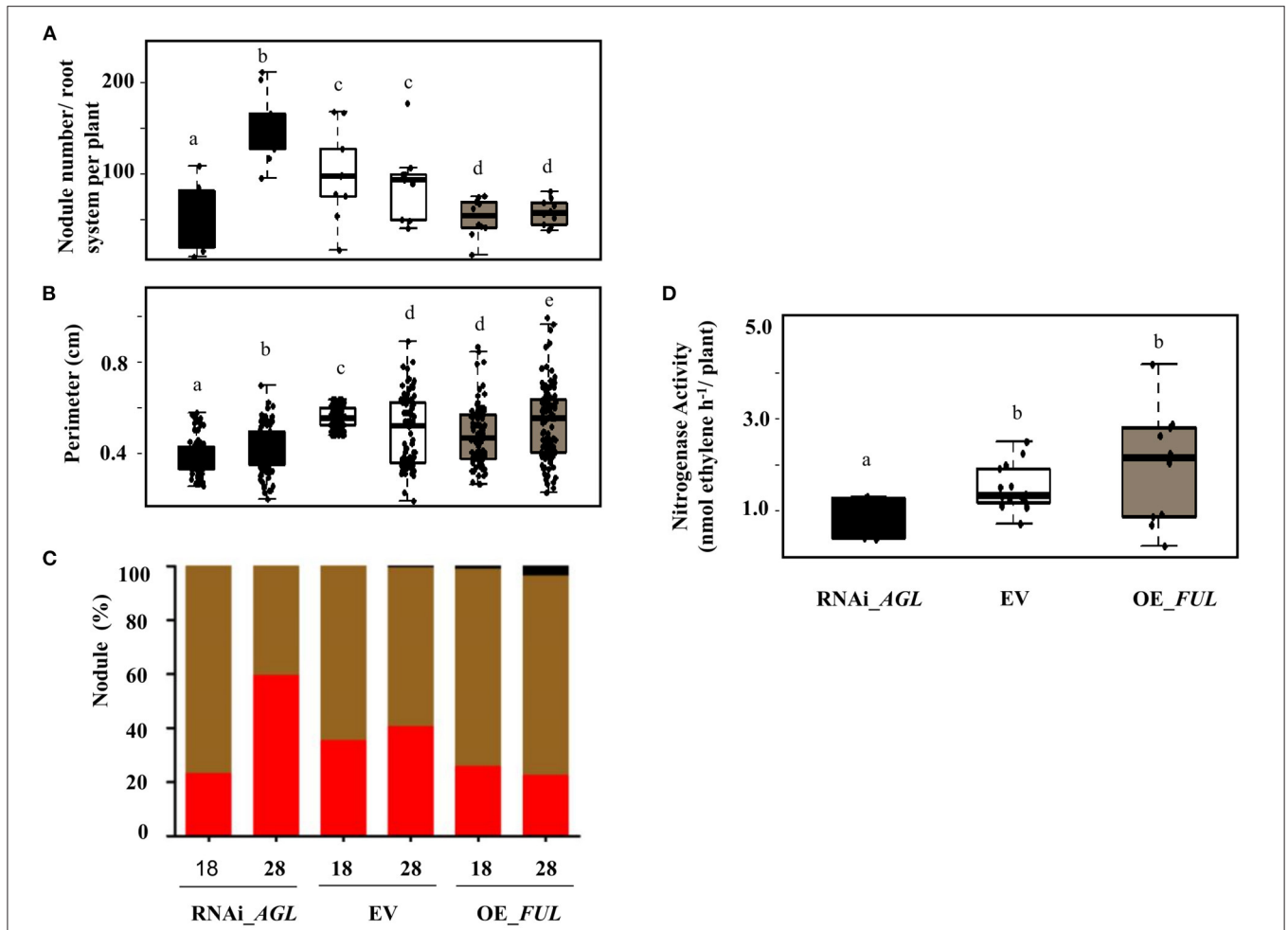
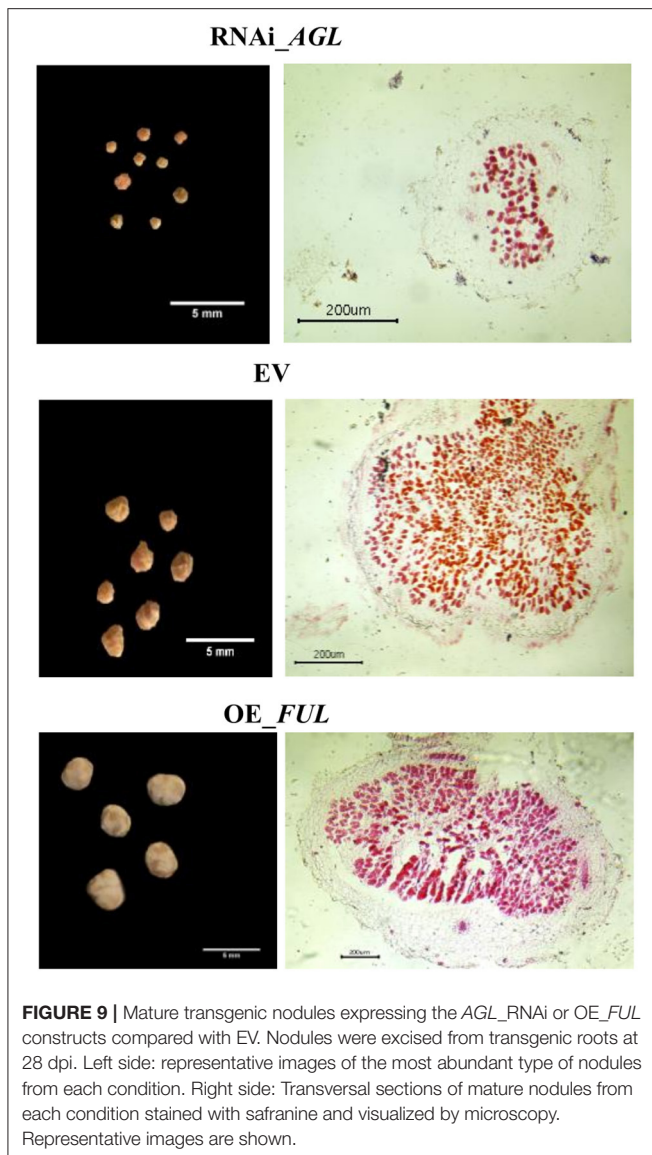


FIGURE 8 | Nodulation phenotype of *R. etli*-inoculated composite plants expressing the RNAi_AGL, or OE_FUL construct compared with EV. Nodule parameters were determined at the indicated dpi. **(A)** Nodule number from the whole root system per plant was obtained from 10 biological replicates per condition. **(B)** Nodule perimeter was calculated using the ImageJ program from 50 different nodules obtained from three to five plants per condition. **(C)** Based on their perimeter values, nodules were classified as small (0.2–0.5 cm; red bar), medium (0.51–0.75 cm; brown bar), or large (>0.76; black bar), the percentage of nodules from each category is shown for each condition. **(D)** Nitrogenase activity was determined at 28 dpi using the acetylene reduction assay (ARA). Data were obtained from 10 biological replicates per condition. Different lower-case letter columns indicate a significant difference according to one-way analysis of variance (ANOVA) (p -value < 0.001).

LEAVES 2-LIKE 18/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16a (*ASL18/LBD16a*) gene. In Arabidopsis, the *ASL18/LBD16a* TF is involved in establishing the asymmetry required for divisions of the pericycle founder cells that produce lateral root primordia (Goh et al., 2012). In legumes, the nodules are lateral root organs that initiate from the inner root layers in response to rhizobial perception. In contrast, lateral roots emerge from predefined founder cells as an adaptive response to external stimuli. Thus, despite differential induction, lateral roots and nodules share developmental programs through *ASL18/LBD16a* (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019; Shahan and Benfey, 2020). Thus, the master regulator for legume symbioses, the *NIN* TF, is essential for recruiting the lateral root and nodule organogenesis developmental programs. In Medicago, cytokinin-induction of *NIN* allows induction of this program during nodulation through activation of *ASL18/LBD16a* that promotes

induction of auxin-responsive gene and auxin biosynthesis (Schiessl et al., 2019). In Lotus, *NIN* regulates the *ASL18/LBD16a* and *NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y)* genes that genetically interact during nodule development (Soyano et al., 2019). On this basis, research presented in this work about root/nodules *PvAGL* TF genes (namely, *PvFUL*-like, *PvXAL1*-like, *PvAGL24*-like, *PvSOC1*-like, *PvSVP*-like, and *PvAGL16*-like) led us to propose that Arabidopsis *AGL* TF that regulate root development have been co-opted by legumes to control, both, root and nodule development. However, further experimentation is needed to confirm this hypothesis.

The negative effect of *PvAGL* gene silencing in root development was evident in non-inoculated and *R. etli* inoculated plants. These roots showed delayed transgenic roots after *A. rhizogenes* infection and reduced root growth (Figure 4). Furthermore, the inoculated RNAi_AGL plants showed altered



root architecture evidenced by diminished root length, area, and biomass (Figures 4, 7). Thus, orthologs of Arabidopsis *AGL* genes that regulate root development have a similar function in common beans.

The gene silencing of root/nodule *PvAGL* genes did not affect the root hair development or density (Supplementary Figure 6). However, it negatively affected rhizobial infection of common bean roots, perhaps because due to ineffective chemical communication between the symbionts, something that was evidenced by a significant reduction in the rhizobia-induced effective deformed root hairs that was concomitant with a significant decrease in the expression level of early symbiotic genes essential for rhizobial infection (Figures 5, 6). The genes analyzed include *PvFNSII* involved in the synthesis of flavones, the chemical signal of the plant sensed by compatible rhizobia, and genes involved in the infection thread initiation and progression (*PvFLOT2*, *PvENOD40*, and *PvENOD93*) that act

downstream of the TF NSP2 and NIN (Roy et al., 2020). Thus, the effect of *PvAGL* TF in the transcriptional regulation of early symbiotic genes (Figure 6) could be direct or indirect. In addition, several other genes are known to be involved in the rhizobial infection process, and infection thread formation and progression (Roy et al., 2020) could be down-regulated in *RNAi_AGL* roots and would negatively affect initial symbiotic stages. Future experiments based on transcriptomic approaches would provide evidence about this proposition.

Research in different legumes indicates that a delay in the rhizobial infection process results in a defective activation of the nodule organogenesis program (Oldroyd, 2013; Roy et al., 2020). In agreement, a defective nodulation phenotype (Figures 8, 9) was evident in *PvAGL*-silenced plants affected by a rhizobial infection. The nodule-specific NIN TF is an essential symbiosis regulator expressed in the epidermis and controls rhizobial infection (Schauser et al., 1999; Liu and Bisseling, 2020). NIN is also expressed in the pericycle and is essential for regulating nodule primordia formation in *Medicago* (Liu et al., 2019). The complex pattern of spatiotemporal regulation exerted by NIN in *Medicago* requires different upstream *cis*-regulatory sequences. These include a remote (-18 kb) *cis*-element with cytokinin-response elements essential for nodule organogenesis (Liu et al., 2019). In addition, recently, it was shown that NIN is expressed in the proximal part of the infection zone in nodules and plays an essential role in the transition from infection to fixation zones for establishing a functional symbiosis (Liu et al., 2021). Our *in silico* analysis of the *PvNIN* promoter region revealed a CARG-box *cis*-element at -9166 bp upstream of the initiation codon (Table 1). It is noteworthy that *PvNIN* expression was reduced in *PvAGL* silenced root as opposite to *PvFUL*-like overexpressing roots both from inoculated and non-inoculated plants, something that supports the hypothesis of its possible direct transcriptional regulation by AGL TF acting as an essential regulator of rhizobial infection and nodule organogenesis in common bean. However, further work is required to identify the *P. vulgaris* gene targets of *PvAGL* transcription regulation in common bean roots and nodules. Experimental approaches demonstrate their specific binding to CARG-box present in gene promoter regions.

The observed increased nodule number with altered nodule morphology and function in *RNAi_AGL* plants (Figures 8, 9) led us to propose that the downregulation of *PvAGL* genes results in an alteration of the AON symbiotic process. Recently it was shown that gibberellins signaling is a key regulator of the AON process in *Lotus* (Akamatsu et al., 2020). The endogenous gibberellins from *Lotus* nodules induce NIN expression via its gibberellin-responsive *cis*-acting region. NIN directly induces *CLE-RS* genes (*RIC* genes in the common bean) to activate the AON process (Soyano et al., 2014; Akamatsu et al., 2020). We showed a significantly low expression of *PvRIC1* and *PvTML* (Figure 6), a negative regulator of AON, in *PvAGL*-silenced roots/nodules. In addition, we showed that the expression level of *PvNIN*, with CARG-box *cis*-elements in its promoter region (Table 1), is up- or down-regulated both in inoculated as well as in non-inoculated roots, with increased or silenced *PvAGL* expression, respectively. Thus, we propose that *PvAGL* TF

positively regulates *PvNIN* that, in turn, positively regulates *PvRIC1* via gibberellins. The AON is a complex process that includes almost 20 different genes (Roy et al., 2020). Therefore, the down-regulation of the expression of other genes relevant to regulating the AON process in RNAi *AGL* roots/nodules could not be excluded. Taken together, our results indicate that the downregulation of *PvAGLs* in roots/nodules negatively affects the AON resulting in a higher number of small, ineffective nodules formed.

The possible contribution of legume AGL TF as regulators of the rhizobia symbiosis is scarcely documented. In alfalfa, three MADS-box genes expressed in roots and nodules have been reported, though their functional analysis is lacking (Heard et al., 1997; Zuccherro et al., 2001; Pérez-Valencia et al., 2008). In soybean, one report characterizes the *GmNMHC5*, MADS-box gene that acts as a positive regulator of root development and nodulation, while the study of *GmNMH7* revealed its negative regulation of nodulation (Liu et al., 2015; Ma et al., 2019). Future in-depth studies are needed to find the commonalities and differences among MADS/AGL TF roles from different legumes as regulators of the N-fixing symbiosis.

CONCLUSIONS

This is the first report about the participation of *PvAGL* TF as positive regulators of the common bean – rhizobia symbiosis. The data presented in this study attest to the relevance of *PvAGL* TF as positive regulators of several processes of the common bean – rhizobia symbioses such as root development, rhizobial infection, nodule organogenesis/function, and the autoregulation of nodulation. Furthermore, we propose that *PvAGL* control be exerted via interplay with *PvNIN*, the master symbiosis regulator. Certainly, the knowledge of AGL TF as regulators of N-fixing symbiosis in different legume species would be relevant for a future improvement of this relevant process for ecological and economic reasons.

REFERENCES

- Akamatsu, A., Nagae, M., Nishimura, Y., Romero Montero, D., Ninomiya, S., Kojima, M., et al. (2020). Endogenous gibberellins affect root nodule symbiosis via transcriptional regulation of NODULE INCEPTION in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 105, 1507–1520. doi: 10.1111/tj.15128
- Alvarez-Buylla, E. R., Garcia-Ponce, B., Sanchez, M. P., Espinosa-Soto, C., Garcia-Gomez, M. L., Pineyro-Nelson, A., et al. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. *New Phytol.* 223, 1143–1158. doi: 10.1111/nph.15793
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., et al. (2000a). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24, 457–466. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00891.x
- Alvarez-Buylla, E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., et al. (2000b). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5328–5333. doi: 10.1073/pnas.97.10.5328
- Aparicio-Fabre, R., Guillen, G., Loredó, M., Arellano, J., Valdes-Lopez, O., Ramirez, M., et al. (2013). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *PvTIFY* orchestrates global changes in transcript profile response to jasmonate and phosphorus deficiency. *BMC Plant Biol.* 13:26. doi: 10.1186/1471-2229-13-26
- Broughton, W. J., and Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* 125, 1075–1080. doi: 10.1042/bj1251075
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil* 252, 55–128. doi: 10.1023/A:1024146710611
- Burgeff, C., Liljegren, S. J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M. F., and Alvarez-Buylla, E. R. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214, 365–372. doi: 10.1007/s004250100637
- Castro-Guerrero, N. A., Isidra-Arellano, M. C., Mendoza-Cozatl, D. G., and Valdés-López, O. (2016). Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Front. Plant Sci.* 7:600. doi: 10.3389/fpls.2016.00600
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R. V., Journet, E. P., Maillat, F., et al. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12, 1647–1666. doi: 10.1105/tpc.12.9.1647

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GH and LA conceived and designed the study. LA, MI-A, MR-S, MR, AL, and S-IF performed the experiments. LA and LL performed *in silico* analyses. LA, OV-L, LG, and GH advised experiments and analyzed data. LA and GH wrote the manuscript. All authors contributed to the critical revision of the manuscript, read, and approved the submitted version.

FUNDING

Partial financial support for this work was provided by grants A1-S-22570 to GH and A1-S-9454 to OV-L from CONACyT; IN201320 to OV-L, IN204320 to LG, and IN203819 to GH from DGAPA, UNAM. LA is doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas - UNAM and she received the Fellowship 582722 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and from DGAPA, UNAM (IN203819).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ma. de la Paz Eelizabeth Salas, Víctor Bustos, and Joel Gómez Espíndola for technical assistance and to Damien Formey and Luis P. Frínguez for advice in data bases and bioinformatic analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.679463/full#supplementary-material>

- Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R., and Udvardi, M. K. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* 38, 366–379. doi: 10.1111/j.1365-3113.2004.02051.x
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., et al. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat. Protoc.* 2, 1819–1824. doi: 10.1038/nprot.2007.259
- Fehlberg, V., Vieweg, M. F., Dohmann, E. M., Hohnjec, N., Puhler, A., Perlick, A. M., et al. (2005). The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J. Exp. Bot.* 56, 799–806. doi: 10.1093/jxb/eri074
- Ferguson, B. J., Li, D., Hastwell, A. H., Reid, D. E., Li, Y., Jackson, S. A., et al. (2014). The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnol. J.* 12, 1085–1097. doi: 10.1111/pbi.12216
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., et al. (2019). Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42, 41–51. doi: 10.1111/pce.13348
- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., et al. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* 167, 1233–1242. doi: 10.1104/pp.114.253302
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., and Forde, B. G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in Arabidopsis thaliana. *Planta* 222, 730–742. doi: 10.1007/s00425-005-0020-3
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sanchez, M., Murphy, A. S., Garcia-Ponce, B., Marsch-Martinez, N., et al. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* 32, 2884–2895. doi: 10.1038/emboj.2013.216
- Garcia-Cruz, K. V., Garcia-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M. P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoyes, B., et al. (2016). The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Ann. Bot.* 118, 787–796. doi: 10.1093/aob/mcw126
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., and Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* 139, 883–893. doi: 10.1242/dev.071928
- Goto, K., and Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev.* 8, 1548–1560. doi: 10.1101/gad.8.13.1548
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185–1207. doi: 10.1104/pp.43.8.1185
- Heard, J., Caspi, M., and Dunn, K. (1997). Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of nmhC5, a member of a novel subfamily. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 665–676. doi: 10.1094/MPMI.1997.10.5.665
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 297–300. doi: 10.1093/nar/27.1.297
- Íñiguez, L. P., Nova-Franco, B., and Hernandez, G. (2015). Novel players in the AP2-miR172 regulatory network for common bean nodulation. *Plant Signal Behav.* 10:e1062957. doi: 10.1080/15592324.2015.1062957
- Jack, T., Brockman, L. L., and Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68, 683–697. doi: 10.1016/0092-8674(92)90144-2
- Ku, A. T., Huang, Y. S., Wang, Y. S., Ma, D., and Yeh, K. W. (2008). IbMADS1 (Ipomoea batatas MADS-box 1 gene) is involved in tuberous root initiation in sweet potato (Ipomoea batatas). *Ann. Bot.* 102, 57–67. doi: 10.1093/aob/mcn067
- Letunic, I., and Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47, W256–W259. doi: 10.1093/nar/gkz239
- Libault, M., Joshi, T., Benedito, V. A., Xu, D., Udvardi, M. K., and Stacey, G. (2009). Legume transcription factor genes: what makes legumes so special? *Plant Physiol.* 151, 991–1001. doi: 10.1104/pp.109.144105
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., and Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404, 766–770. doi: 10.1038/35008089
- Liu, J., and Bisseling, T. (2020). Evolution of NIN and NIN-like genes in relation to nodule symbiosis. *Genes* 11:777. doi: 10.3390/genes11070777
- Liu, J., Rasing, M., Zeng, T., Klein, J., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2021). NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in Medicago truncatula nodules. *New Phytol.* 230, 290–303. doi: 10.1111/nph.17215
- Liu, J., Rutten, L., Limpens, E., van der Molen, T., van Velzen, R., Chen, R., et al. (2019). A remote cis-regulatory region is required for NIN expression in the pericycle to initiate nodule primordium formation in medicago truncatula. *Plant Cell* 31, 68–83. doi: 10.1105/tpc.18.00478
- Liu, W., Han, X., Zhan, G., Zhao, Z., Feng, Y., and Wu, C. (2015). A novel sucrose-regulatory MADS-box transcription factor GmNMHC5 promotes root development and nodulation in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int. J. Mol. Sci.* 16, 20657–20673. doi: 10.3390/ijms160920657
- Lobet, G., Pages, L., and Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol.* 157, 29–39. doi: 10.1104/pp.111.179895
- Ma, W.-y., Liu, W., Hou, W.-s., Sun, S., Jiang, B.-j., Han, T.-f., et al. (2019). GmNMH7, a MADS-box transcription factor, inhibits root development and nodulation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *J. Integr. Agric.* 18, 553–562. doi: 10.1016/S2095-3119(18)61992-6
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature* 360, 273–277. doi: 10.1038/360273a0
- Marsh, J. F., Rakocevic, A., Mitra, R. M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., et al. (2007). Medicago truncatula NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144, 324–335. doi: 10.1104/pp.106.093021
- Martin-Rodriguez, J. A., Leija, A., Formey, D., and Hernandez, G. (2018). The MicroRNA319d/TCP10 node regulates the common bean - rhizobia nitrogen-fixing symbiosis. *Front. Plant Sci.* 9:1175. doi: 10.3389/fpls.2018.011175
- Mead, J., Bruning, A. R., Gill, M. K., Steiner, A. M., Acton, T. B., and Vershon, A. K. (2002). Interactions of the Mcm1 MADS box protein with cofactors that regulate mating in yeast. *Mol. Cell Biol.* 22, 4607–4621. doi: 10.1128/MCB.22.13.4607-4621.2002
- Murai, K. (2013). Homeotic genes and the ABCDE model for floral organ formation in wheat. *Plants* 2, 379–395. doi: 10.3390/plants2030379
- Nawy, T., Lee, J. Y., Colinas, J., Wang, J. Y., Thongrod, S. C., Malamy, J. E., et al. (2005). Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* 17, 1908–1925. doi: 10.1105/tpc.105.031724
- Nova-Franco, B., Iniguez, L. P., Valdes-Lopez, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., et al. (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol.* 168, 273–291. doi: 10.1104/pp.114.255547
- Olah, B., Briere, C., Becard, G., Denarie, J., and 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. doi: 10.1111/j.1365-3113.2005.02522.x
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Olson, E. N., Perry, M., and Schulz, R. A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 172, 2–14. doi: 10.1006/dbio.1995.0002
- O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., et al. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics* 15:866. doi: 10.1186/1471-2164-15-866
- Páez-Valencia, J., Sánchez-Gómez, C., Valencia-Mayoral, P., Contreras-Ramos, A., Hernández-Lucas, I., Orozco-Segovia, A., et al. (2008). Localization of the MADS domain transcriptional factor NMH7 during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. *Plant Sci.* 175, 596–603. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.06.008

- Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., et al. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15, 1538–1551. doi: 10.1105/tpc.011544
- Pollock, R., and Treisman, R. (1991). Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev.* 5, 2327–2341. doi: 10.1101/gad.5.12a.2327
- Puig, J., Meynard, D., Khong, G. N., Pauluzzi, G., Guiderdoni, E., and Gantet, P. (2013). Analysis of the expression of the AGL17-like clade of MADS-box transcription factors in rice. *Gene Expr. Patterns* 13, 160–170. doi: 10.1016/j.gep.2013.02.004
- Reid, D. E., Ferguson, B. J., Hayashi, S., Lin, Y. H., and Gresshoff, P. M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann. Bot.* 108, 789–795. doi: 10.1093/aob/mcr205
- Reyero-Saavedra, M. D. R., Qiao, Z., Sanchez-Corraea, M. D. S., Diaz-Pineda, M. E., Reyes, J. L., Covarrubias, A. A., et al. (2017). Gene silencing of Argonaute5 negatively affects the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Genes* 8:352. doi: 10.3390/genes8120352
- Riechmann, J. L., Wang, M., and Meyerowitz, E. M. (1996). DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res.* 24, 3134–3141. doi: 10.1093/nar/24.16.3134
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., et al. (2020). Celebrating 20 Years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 32, 15–41. doi: 10.1105/tpc.19.00279
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191–195. doi: 10.1038/46058
- Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., et al. (2019). NODULE INCEPTION recruits the lateral root developmental program for symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr. Biol.* 29, 3657–3668. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.005
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., and Sommer, H. (1990). Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250, 931–936. doi: 10.1126/science.250.4983.931
- Shahan, R., and Benfey, P. N. (2020). A co-opted regulator of lateral root development controls nodule organogenesis in lotus. *Dev. Cell* 52, 6–7. doi: 10.1016/j.devcel.2019.12.009
- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., and Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139, 3081–3098. doi: 10.1242/dev.074674
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., and Kawaguchi, M. (2014). Nodule Inception creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 14607–14612. doi: 10.1073/pnas.1412716111
- Soyano, T., Shimoda, Y., Kawaguchi, M., and Hayashi, M. (2019). A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus. *Science* 366, 1021–1023. doi: 10.1126/science.aax2153
- Sun, C. H., Yu, J. Q., Duan, X., Wang, J. H., Zhang, Q. Y., Gu, K. D., et al. (2018). The MADS transcription factor CmANR1 positively modulates root system development by directly regulating CmPIN2 in chrysanthemum. *Hortic. Res.* 5:52. doi: 10.1038/s41438-018-0061-y
- Suzuki, T., Yoro, E., and Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316, 111–158. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.004
- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., et al. (2013). Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 54, 433–447. doi: 10.1093/pcp/pct022
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Tsikou, D., and Yan, Z. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science* 362, 233–236. doi: 10.1126/science.aat6907
- Valdes-Lopez, O., Arenas-Huertero, C., Ramirez, M., Girard, L., Sanchez, F., Vance, C. P., et al. (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ.* 31, 1834–1843. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01883.x
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paep, A., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Venkateswaran, M., Volkening, J. D., Sussman, M. R., and Ane, J. M. (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 118–127. doi: 10.1016/j.pbi.2012.11.007
- Vieweg, M. F., Frühling, M., Quandt, H. J., Heim, U., Bäumlein, H., Pühler, A., et al. (2004). The promoter of the Vicia faba L. leghemoglobin gene Vflb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 62–69. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.1.62
- Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Rendon-Anaya, M., Hernandez-Onate, M., Minoche, A. E., Erb, I., et al. (2016). Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biol.* 17:32. doi: 10.1186/s13059-016-0883-6
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., et al. (2017). ePlant: visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell* 29, 1806–1821. doi: 10.1105/tpc.17.00073
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene agamous resembles transcription factors. *Nature* 346, 35–39. doi: 10.1038/346035a0
- Zuccherro, J. C., Caspi, M., and Dunn, K. (2001). ngl9: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1463–1467. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1463

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Ayra, Reyero-Saavedra, Isidra-Arellano, Lozano, Ramírez, Leija, Fuentes, Girard, Valdés-López and Hernández. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO IV Papel de *PvFUL*-like en el desarrollo de raíz de *Arabidopsis*.

IV.1 Antecedentes del Capítulo IV.

El gen *FRUITFULL (FUL)/AGL8* de *Arabidopsis* codifica para una proteína con dominio MADS que se requiere para el desarrollo de carpelos y frutos (Mandel and Yanofsky, 1995; Gu et al., 1998). Mediante la mutagénesis mediada por transposones (Springer et al., 1995; Sundaresan et al., 1995), se aisló al mutante que se le llamó *fruitfull (ful-1)* y su caracterización molecular reveló que se producía una pérdida de función del gen *AGL8* y esto afectaba el patrón de división celular, la expansión y la diferenciación durante la morfogénesis de la silicua después de la fertilización (Mandel and Yanofsky, 1995; Gu et al., 1998).

Además del papel durante el desarrollo de carpelos y frutos, *FUL* actúa como un gen que regula el tiempo de floración y la identidad del meristemo del brote (SAM, siglas en inglés) (Hempel et al., 1997; Gu et al., 1998; Ferrandiz et al., 1999). La pérdida de función de *FUL* provocó un retraso en la floración tanto en las condiciones de días largos como en días cortos, mientras que la sobreexpresión de *FUL* produjo un fenotipo de floración temprana (Ferrándiz et al., 2000; Melzer et al., 2008). En cambio, la mutación en el gen *FUL* combinado con mutaciones en los genes de identidad del meristemo *API* y *CAL*, resulta en la obtención de plantas con un fenotipo de no floración, las cuales producen continuamente hojas en lugar de flores, lo que sugiere que estos tres genes actúan redundantemente en el control de la arquitectura de la inflorescencia (Ferrándiz et al., 2000).

El papel de *FUL* en regular la transición de la identidad del meristemo es cooperativa y parcialmente dependiente de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* a través de la activación de *LEAFY (LFY)* (Balanzá et al., 2014). Tanto *FUL* como *SOC1* son genes de respuesta temprana a las señales fotoinductivas (Hempel et al., 1997; Schmid et al., 2003), mientras que el papel de *FUL* en la transición reproductiva puede estar dada por interferir en la formación del dímero *FLOWERING LOCUS C (FLC)-SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* y de esta manera reducir el efecto represivo que ejerce *FLC-SVP* en la floración al regular los blancos *FLOWERING LOCUS T (FT)* o *SOC1* (Balanzá et al., 2014).

Además, se demostró que *FUL* también promueve la floración en respuesta a la temperatura ambiente a través de la acción del miR156 y su gen blanco *SQUAMOSA PROMOTER*

BINDING (SPL3). La sobreexpresión del miR156 demoró la floración en plantas a temperatura ambiente por debajo de los 16°C lo cual estaba asociado con la expresión reducida de *FT* y de *FUL* (Kim et al., 2012).

El papel que ejercen los FT de la familia *MADS* en otros tejidos durante todo el ciclo de vida de la planta ha sido poco estudiado, pero trabajos de investigación recientes demuestran el papel regulatorio de los *MADS* por ejemplo en el desarrollo de raíces en *Arabidopsis* (Alvarez-Buylla et al., 2019). Se han identificado 41 genes *MADS* en *Arabidopsis* que tienen expresión alta y/o intermedia en diferentes zonas y tejidos de la raíz (Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Garcia-Cruz et al., 2016; Alvarez-Buylla et al., 2019). Entre ellos se reporta a *FUL* con un nivel alto de expresión en el procambium (Alvarez-Buylla et al., 2019). Sin embargo, no hay reportes de la posible función de *FUL* en regular el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*. Para inferir esa posible función de *FUL*, decidimos analizar el fenotipo de la mutante *ful-1* en cuanto a la arquitectura de la raíz, determinando la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales en la mutante en comparación con el genotipo silvestre progenitor (Ler).

En el capítulo anterior, mostramos resultados donde se moduló la expresión de genes *MADS* (por sobreexpresión o el silenciamiento por RNAi) para el análisis funcional de esta familia en el frijol común y demostramos que genes *PvAGL*, incluyendo el *PvFUL*-like son reguladores positivos de la simbiosis con rizobios. Además la modulación de la expresión del gene *PvFUL*-like (silenciamiento y sobreexpresión) en plantas compuestas fertilizadas (no en simbiosis) mostraron una alteración en la arquitectura de la raíz (Ayra et al., 2021). Nuestros resultados (no mostrados en el artículo Ayra et al. 2021) indican que la raíz fertilizada de plantas control -transformadas con EV- tienen un área de 125.18 cm² y su longitud es de 41.11cm. Sin embargo, el área de la raíz fertilizada de plantas silenciadas (transformadas con RNAi-*AGL*) es de 38.32 cm² y su longitud de 30 cm. En contraste, la raíz fertilizada de plantas sobre-expresando *PvFUL* muestran un área de 176.34cm² y una longitud de 45.01cm. Estos resultados revelan al FT *PvFUL* como regulador positivo del desarrollo de la raíz en plantas fertilizadas. Estos resultados de frijol apoyan la hipótesis de que el gen *FUL* de *Arabidopsis* interviene en el desarrollo y modificación de la arquitectura de raíz, por lo que planteamos investigar este asunto que no se ha reportado para *Arabidopsis*.

Para esto, nos resultó interesante crear una colaboración con el Dr. Luis Cañas del Laboratorio Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo en el Instituto de Biología Celular y Molecular de Plantas (IBMCP) en Valencia, España. Se concretó una estancia de 5 meses en este grupo de investigación, donde conté también con la asesoría de la Dra. Concepción Mena y de la Dra. Rim Hamza, cuyos aportes contribuyeron a profundizar en la caracterización del gen *PvFUL*-like con relación a su posible función en la arquitectura y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.

IV.2 Objetivo del Capítulo IV.

1. Investigar el fenotipo de raíz de la mutante de pérdida de función de *Arabidopsis* (*ful-1*) en cuanto al crecimiento de la raíz primaria y el número de raíces laterales.
2. Si se observa una alteración del fenotipo de raíz en la mutante *ful-1*, con semejanza a lo observado en las raíces de frijol fertilizadas con silenciamiento de *PvFUL*-like, realizar ensayos de complementación genética de *ful-1* con el gen *PvFUL*-like, con el fin de demostrar si hay complementación funcional de este gen de frijol en la arquitectura y desarrollo de raíz de *Arabidopsis*, además de en el fenotipo de la parte aérea caracterizado por la longitud de las silicuas (Gu et al., 1998).

IV.3 Materiales y Métodos del Capítulo IV.

IV.3.1 Material vegetal, construcción genética y condiciones de crecimiento.

Las plantas de *A. thaliana* con el genotipo silvestre y la mutante *ful-1* usadas en este estudio tienen como fondo genético a Ler (*Landsberg erecta*). La línea mutante para el gen *FUL/AGL8* se obtuvo del banco NASC de Nottingham Stock: CS3759 (*ful-1*).

Para todos los experimentos, las semillas se desinfectaron mediante el lavado con etanol al 70% durante 30 s, se lavaron una vez con agua estéril y se incubaron por 10 min en una solución al 20% de Cloralex. Se enjuagaron con agua estéril hasta 3 veces y para germinarlas se esparcieron en cajas con medio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con vitaminas y sacarosa 1%, además de agar 0.6%. Se sellaron las cajas con cinta 3M micropore para evitar la contaminación y sincronizar la germinación, se pusieron a vernalizar por 3-5 días a 4°C en total oscuridad. Las plántulas se crecieron en cámaras climáticas a 22°C bajo un fotoperíodo de días largos correspondiente a 16h de luz seguidas de 8h de oscuridad.

Para corroborar que la línea enviada era homocigota extrajimos el DNA genómico de hojas jóvenes usando el GeneJet Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), éste se diluyó 1/50 e hicimos reacciones de PCR empleando el NZYTaQ II 2x Green Master Mix (nzytech) con el programa: 95°C por 3 min, 25 ciclos de 95°C por 15 s, 57°C por 15 s y 72°C por 10 min más un paso de extensión final a 72°C por 1 min. En la línea mutante *ful-1*, el T-DNA tiene además insertado un gen GUS como reportero, por lo tanto, los homocigotos de *ful-1* se identificaron por la detección de un producto de amplificación de 700 bp con los oligonucleótidos descritos por Ferrándiz et al., (2000).

El vector binario obtenido en México, donde el plásmido pTDTO (Aparicio-Fabre et al., 2013) contiene clonado en los sitios XhoI/BamHI el gen *PvFUL*-like bajo un promotor constitutivo 35SCaMV (ver capítulo III), y es portador del gen reportero *tdTomato* que codifica para una proteína roja fluorescente, se utilizó para la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 de las plantas mutantes de Arabidopsis por el método “Floral dip” (Clough and Bent, 1998).

Colectamos las semillas generadas por las mutantes *ful-1* transformadas con *PvFUL*-like, se germinaron y seleccionamos las plántulas transgénicas por la fluorescencia roja emitida por los cotiledones y las raíces al ser observadas en una lupa Leica con un filtro DSR (545/30 Excitación). Las plántulas así seleccionadas se sembraron en el invernadero para generar nuevas semillas transgénicas y poder caracterizar la próxima generación (T2).

IV.3.2 Caracterización fenotípica de la raíz.

Las mediciones en la raíz primaria, así como la cuantificación de raíces laterales se realizó con el programa SmartRoot (Lobet et al., 2011) a partir de imágenes obtenidas con cámara digital NIKON de 10 Mega-Pixeles de las raíces de las plántulas silvestres y de la línea mutante, a los 10 días de ser cultivadas en placas verticales (12 cm x 12 cm) conteniendo el medio MS bajo las condiciones de crecimiento descritas anteriormente.

IV.3.3 Microscopía.

Las imágenes confocales se adquirieron utilizando un microscopio invertido Zeiss (Carl Zeiss, Alemania) con un objetivo 40X de inmersión en agua después de teñir el tejido de la raíz con 10 μgml^{-1} de yoduro de propidio.

IV.4 Resultados y Discusión del Capítulo IV.

IV.4.1 Fenotipo de raíz en la mutante *ful-1*.

Como ya se mencionó, no se ha reportado el posible papel del TF FUL-1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*; aunque se conoce que este gen se expresa de manera elevada en el procambium de la raíz de *Arabidopsis* (Alvarez-Buylla et al., 2019). Por tanto, en este trabajo, decidimos evaluar la longitud de la raíz primaria y cuantificar el número de raíces laterales de la mutante *ful-1* en comparación con el genotipo silvestre Ler. Esto se realizó utilizando el programa SmartRoot (Lobet et al., 2011) (Figura IV.1A).

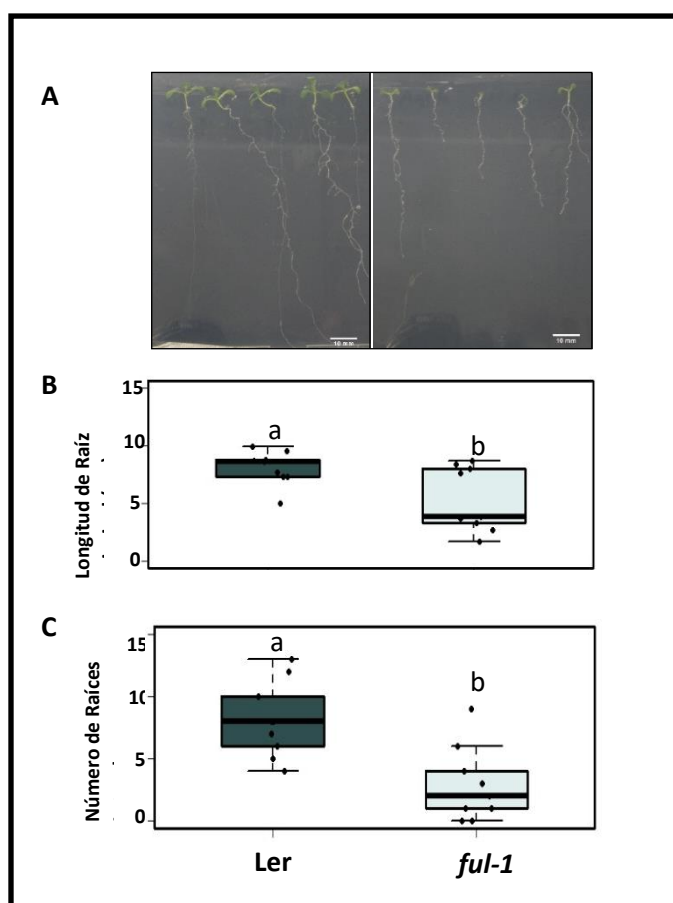


Figura IV.1| Fenotipo de la raíz en el genotipo silvestre Ler y la línea mutante *ful-1* de *Arabidopsis*. (A) Imágenes de las raíces crecidas en medio MS. La escala de la barra =10 mm (B) Longitud de raíz primaria y (C) Número de raíces laterales. Los datos mostrados se obtuvieron de raíces (N= 30) con 10 días de crecimiento en medio MS. En los diagramas de caja, el lado horizontal de la caja representa el primer y tercer cuartil, mientras que el exterior marca los valores mínimo y máximo. Diferentes letras minúsculas de cada conjunto de valores indican una diferencia significativa de acuerdo con el análisis estadístico *t*-Test ($p < 0.05$) con el programa GraphPad Prism.

De este análisis podemos concluir que la mutante *ful-1* generó una raíz primaria más pequeña (Figura IV.1B) y menor cantidad de raíces laterales (Figura IV.1C), con diferencias significativas con respecto al genotipo silvestre Ler.

La raíz de *A.thaliana* es un sistema útil para estudiar los componentes genéticos y las redes de regulación que modulan la proliferación y diferenciación celular durante su desarrollo (Moubayidin et al., 2010; Lozano-Elena et al., 2018). En el nicho de células madre de la raíz (SCN, siglas en inglés), las células iniciales que rodean al centro organizador o quiescente (QC, siglas en inglés), eventualmente dan lugar a las células de los tejidos diferenciados de la raíz (Figura IV.2 A), los cuales desde la capa más externa hacia la interna son: epidermis, corteza, endodermis, periciclo y haces vasculares (van den Berg et al., 1997). Además, las células de la columela formadas en el ápice de la raíz se diferencian a partir de las células iniciales por debajo del QC (Figura IV:2 A) (Dolan et al., 1993). Apicalmente y a medida que las células iniciales se dividen, las células hijas son desplazadas fuera del SCN, formando un dominio de proliferación en el meristemo apical de la raíz (RAM, siglas en inglés) donde las células alcanzan la máxima velocidad de división (Ivanov and Dubrovsky, 2013). Después de varios ciclos de división, las células comienzan a dividirse a una velocidad más lenta en el dominio de transición dentro del meristemo de la raíz hasta que en la zona de elongación se detiene la división y comienzan a alargarse. Progresivamente en la zona de diferenciación las células adquieren su tamaño final y los rasgos diferenciados que son característicos de cada capa de tejido de la raíz (Dolan et al., 1993; Dello Ioio et al., 2007; Ivanov and Dubrovsky, 2013).

Los factores transcripcionales con el dominio MADS juegan un papel importante en modular la proliferación y diferenciación celular de las células madre durante el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis* (Garcia-Cruz et al., 2016). Estudios previos de los genes *XAANTAL1* (*XAL1/AGL12*) y *XAANTAL2* (*XAL2/AGL14*), demostraron que son necesarios para el desarrollo normal de la raíz y controlar la proliferación celular (Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Garcia-Cruz et al., 2016). La mutante *xal1-2* presentó raíces más cortas que las plantas silvestres, produjo menos células meristemáticas que tenían mayor duración del ciclo celular y como consecuencia alcanzaron menor velocidad en la producción celular. Además, las células diferenciadas de *xal1-2* fueron más pequeñas en comparación

con las plantas silvestres (Tapia-Lopez et al., 2008). Por otro lado, la mutante en *xal2-2* mostró alteraciones en el patrón de las células madre, en el tamaño del meristemo y en el crecimiento de la raíz. Este gen *XAL2* es necesario para controlar el transporte y la concentración de auxina dentro de la raíz regulando la expresión de genes *PIN* que codifican para proteínas de membrana para el eflujo de auxinas (Garay-Arroyo et al., 2013).

Teniendo en cuenta el fenotipo que observamos en el crecimiento de raíz de la mutante *ful-1*, hicimos tinciones con yoduro de propidio (10 μgml^{-1}) para observar las capas celulares de la raíz y la disposición del meristemo radical. Estos análisis revelaron como resultados preliminares, que en la mutante *ful-1* hay alteraciones en el tamaño de las células de las capas de la corteza y la endodermis, siendo más pequeñas y aplanadas en comparación con las plantas silvestres del genotipo Ler (Figura IV.2B). Para definir si esto realmente ocurre, nos queda pendiente realizar mediciones en las células del córtex.

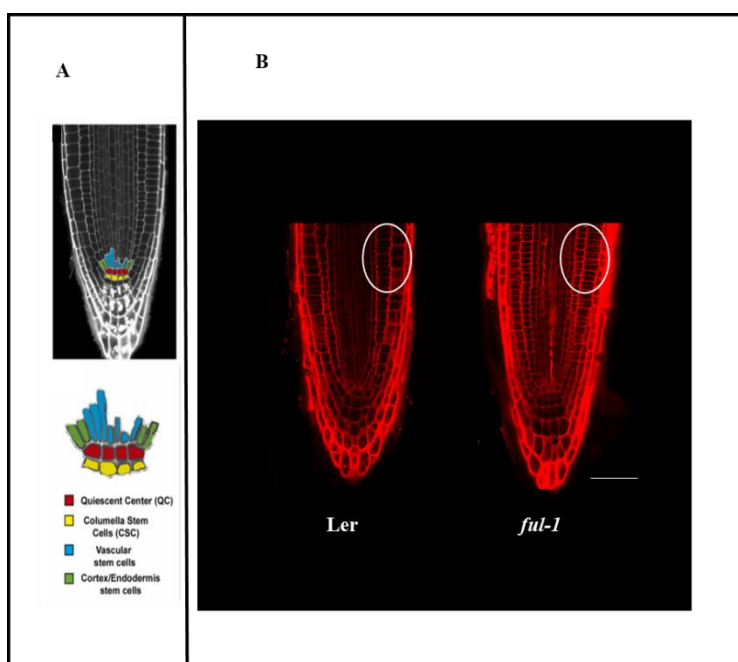


Figure IV.2| Distribución de las células del meristemo de la raíz de Arabidopsis. (A) Representación de las células iniciales en el meristemo de la raíz de Arabidopsis, tomado de Lozano-Elena et al., (2018). (B) Imágenes confocales en la sección longitudinal del meristemo de raíces con cuatro días de crecimiento en medio MS. El óvalo blanco señala las diferencias aparentes en cuanto al tamaño de las células en la corteza y endodermis de la raíz, entre las plantas silvestres Ler y la mutante *ful-1*. El color rojo que se observa en las imágenes es emitido por el yoduro de propidio que se utilizó para la tinción de las paredes celulares. La barra de la escala = 50 μm .

IV.4.2 Transformación genética de *ful-1* con *PvFUL*-like y caracterización de las plantas transgénicas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores que indican un papel del FUL-1 en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* y también los resultados reportados en el capítulo III, en cuanto al análisis de la arquitectura de raíz en las plantas compuestas de frijol fertilizadas, con modulación en la expresión de *PvFUL*-like, nos resultó interesante utilizar el vector binario OE-*FUL* (Ayra et al., 2021), para transformar la mutante *ful-1* de *Arabidopsis* con el fin de demostrar si hay conservación funcional del gen *PvFUL*-like en la arquitectura y desarrollo de la raíz.

Las semillas obtenidas de las plantas de *ful-1* transformadas, se desinfectaron y germinaron bajo las condiciones descritas previamente. El vector binario utilizado para la transformación genética porta el gen *tdT*, esto nos permitió la selección de plántulas transgénicas por la fluorescencia roja emitida por cotiledones y raíces al ser observadas en una lupa Leica con un filtro DSR (545/30 Excitación) (Figura IV.3).

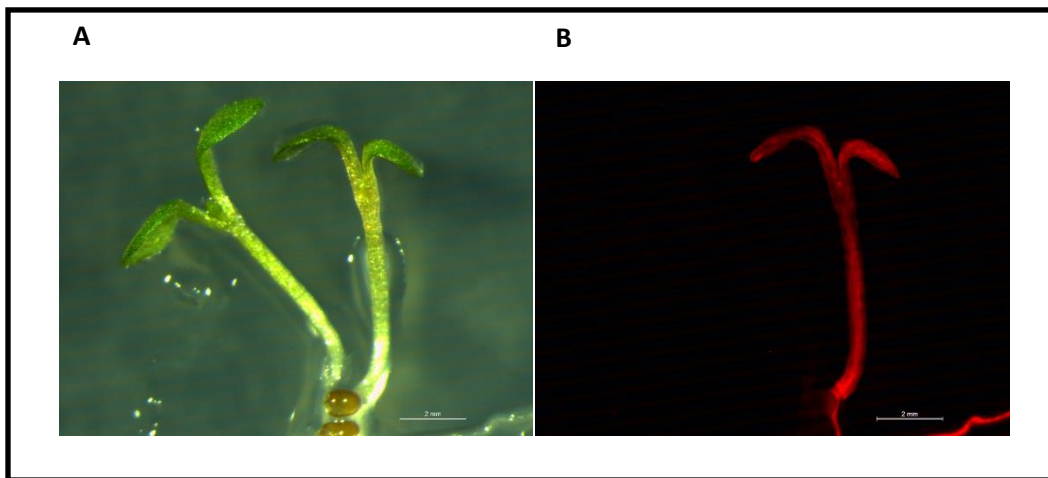


Figura IV.3| Selección de plántulas transgénicas por la fluorescencia roja emitida por el gen reportero *tdTomato*. (A) campo claro (B) campo fluorescente con un filtro DSR (545/30 excitación). La escala de la barra = 2 mm.

Las plántulas transgénicas se crecieron bajo condiciones descritas previamente para generar semillas y caracterizar posteriormente las siguientes generaciones hasta obtener la progenie homocigota.

Las plantas transgénicas *ful-1* que sobreexpresan *PvFUL-like*, muestran una complementación parcial en cuanto al fenotipo de desarrollo de las silicuas (Figura IV.4 A, B), éstas dejan de ser pequeñas, aunque no llegan a alcanzar el tamaño descrito para el genotipo silvestre Ler por Gu et al., (1998) que es, en promedio, de unos 15 mm. Este resultado sugiere que el gen *PvFUL-like* pudiera estar complementando la función del gen *FUL* de Arabidopsis, lo cual está pendiente de confirmar.

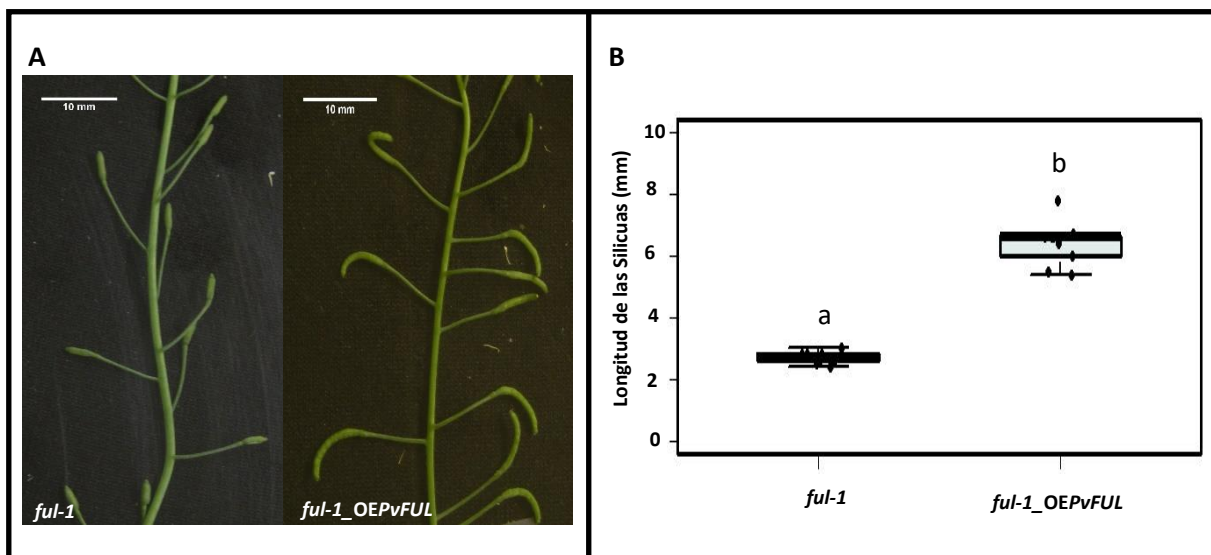


Figura IV.4| Caracterización fenotípica del desarrollo de las silicuas en la planta mutante *ful-1* y en la complementación con el gen de frijol (*ful-1_OEPvFUL*). (A) Imágenes de las inflorescencias formadas tanto en la mutante *ful-1* como por las plantas *ful-1* que sobreexpresan *PvFUL-like*. La barra de la escala = 10mm. (B) Longitud de las silicuas. Los datos mostrados se obtuvieron en mediciones de 20 silicuas en cada condición. En los diagramas de caja, el lado horizontal de la caja representa el primer y tercer cuartil, mientras que el exterior marca los valores mínimo y máximo. Diferentes letras minúsculas de cada conjunto de valores indican una diferencia significativa de acuerdo con el análisis estadístico *t*-de Student ($p < 0.05$) con el programa GraphPad Prism.

IV.5 Perspectivas del capítulo IV.

La función que pudiera tener el gen *FUL* de Arabidopsis en el desarrollo de raíz, no ha sido descrita a la fecha. Nuestros resultados iniciales sobre el fenotipo de raíz en genotipo silvestre Ler vs. el de la mutante *ful-1*, realizados durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Luis Cañas (IBMCP, Valencia, España) indican que *FUL* juega un papel en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis. Con base en esto, decidimos proseguir el análisis de la caracterización del fenotipo radical tanto de la mutante *ful-1*, como de mutantes de Arabidopsis para otros dos

alelos (*ful-2* y *ful-7*), para lo cual establecimos una colaboración con la Dra. Adriana Garay-Arroyo del Instituto de Ecología de la UNAM. Debido a la pandemia COVID19, no pudimos continuar dicho análisis. Nos parece interesante poder continuarlo en el futuro ya que sería trabajo pionero en cuanto a la identificación de una nueva función de este gen en el desarrollo radical de *Arabidopsis*.

En el frijol común, Ayra et al., (2021) detalla específicamente la regulación de PvFUL-like durante la simbiosis con *R. etli*. Pero es importante recalcar que también el PvFUL-like regula positivamente la arquitectura de raíz de plantas fertilizadas (regadas con nitrato y no inoculadas). Los resultados presentados antes (Antecedentes de este capítulo) sobre la alteración del área y la longitud de la raíz de plantas fertilizadas de frijol, silenciadas para PvFUL-like y otros PvAGLs muestran semejanza con los resultados obtenidos sobre la alteración del fenotipo de raíz en la mutante *ful-1* de *Arabidopsis* que generó raíces primarias de menor tamaño y menor cantidad de raíces laterales en comparación con el genotipo silvestre Ler (Figura 1).

Aunque la complementación con proteínas heterólogas en *Arabidopsis* utilizando promotores constitutivos tiene sus limitaciones, los resultados obtenidos sobre la complementación funcional de PvFUL-like en la mutante de *Arabidopsis ful-1* apoyan el papel relevante de FUL en el desarrollo de la raíz, en dos especies vegetales distantes evolutivamente, como son el frijol y *Arabidopsis*. Para continuar con este análisis proponemos investigar a detalle el fenotipo radical en plantas transgénicas *ful-1* sobreexpresantes del gen PvFUL-like. Con este objetivo, se analizarán los segmentos de cada una de las capas de la raíz, se determinará su velocidad de replicación y se harán análisis histológicos. Dichos resultados serían una contribución novedosa y relevante sobre funciones semejantes de los factores de transcripción MADS, como el FUL, en el desarrollo de la raíz en diferentes especies y cabría preguntarse y explorar que tan conservada está la función de FUL en plantas de diferentes géneros y familias.

Como se describe ampliamente por Ayra et al., (2021), en frijol el FT PvFUL-like tiene un papel relevante en la regulación del desarrollo de raíz y nódulos en plantas en simbiosis con *R. etli*. Aunque, desde luego, no se puede explorar si existe similitud de dicha regulación en *Arabidopsis*, sería interesante considerar si FUL u otros FT MADS/AGL pudieran ser relevantes para la regulación de simbiosis con hongos que son ampliamente extendidas en

plantas, y ocurren tanto en el frijol, en *Arabidopsis* y otras plantas de diferentes géneros/familias/tribus.

Aparte de los rizobios, las leguminosas pueden establecer simbiosis con hongos endofíticos del suelo como las micorrizas arbusculares (siglas en inglés, AMF), *Trichoderma* spp (TR) o con bacterias promotoras del crecimiento que colonizan sus raíces (Mantelin and Touraine, 2004; Liu et al., 2020a). En la simbiosis con AMF, se establece de igual manera un diálogo molecular al liberar las plantas estrigolactonas que estimulan la liberación de factores micorrízicos (MYC) en estos hongos (Akiyama and Hayashi, 2006). La manera en que la planta reconoce las etapas de señalización temprana como la amplitud, la duración, la frecuencia y localización de las oscilaciones de Ca^{2+} es crucial para distinguir si la interacción es beneficiosa o patogénica (Vadassery and Oelmüller, 2009).

El mayor rendimiento de la raíz debido a la simbiosis con AMF se ha demostrado en *G. max* (Wang et al., 2011), *V. faba* (Jia et al., 2004), *M. sativa* (Jansa et al., 2011) y *P. vulgaris* (Tajini et al., 2012). Los AMF colonizan la raíz e influyen positivamente en el crecimiento de la planta en suelos pobres en nutrientes, aumentando el transporte particularmente de P, Zn y Cu (Govindarajulu et al., 2005). Además, los nódulos formados por la simbiosis con rizobios normalmente tienen una alta demanda de fosfato inorgánico (Pi) ya que la nitrogenasa en el bacteroide consume mucho ATP (Liu et al., 2018) y en tales casos las AMF tienen la capacidad de acelerar la absorción de Pi (Sharma et al., 2020). Por otra parte, la simbiosis de rizobios y de las AMF puede actuar sinérgicamente promoviendo la producción de trehalosa como una respuesta inducida para conferir tolerancia a un estrés abiótico (Sharma et al., 2020).

El hongo endofítico *Piriformospora indica*, un basidiomiceto de la familia Sebacinaceae, coloniza las raíces de *Arabidopsis* promoviendo el crecimiento y la producción de semillas (Camehl et al., 2010). Uno de los primeros eventos de señalización durante el reconocimiento de estos dos simbiontes es una inducción rápida del Ca^{2+} citoplasmático que es seguida por una respuesta de Ca^{2+} en el núcleo (Vadassery and Oelmüller, 2009). En esta interacción beneficiosa, el hongo promueve la producción de biomasa y le confiere resistencia a varios estreses bióticos y abióticos (Sahay and Varma, 1999).

Con base a esto, sería interesante considerar si FUL u otros FT MADS/AGL pudieran ser relevantes para la regulación de simbiosis con hongos. Para dicho análisis en frijol se podría

utilizar el enfoque de genética reversa, usado por Ayra et al., (2021), para modular la expresión de genes *PvAGL* en raíces transgénicas, inoculadas con AMF y se analizaría el fenotipo simbiótico de las plantas expresando las diferentes construcciones ya existentes (Ayra et al. 2021). Para *Arabidopsis* se podría analizar el fenotipo de plantas silvestres en comparación con el de la mutante *ful-1* y de una planta transgénica que sobre exprese el gen *FUL* (construcción 35S-*FUL*), estas plantas se inocularían con *P. indica* y se analizaría de manera comparativa su fenotipo simbiótico.

Además, se podría analizar en el frijol, el nivel de expresión génica de genes que actúan río debajo de las oscilaciones de Ca^{2+} , que forman parte de la ruta común de simbiosis, por ejemplo el ortólogo a *MtDMI*, pues ya existen reportes de que mutaciones en este gen en *M. truncatula*, no permitió la formación de nódulos ni la entrada del hongo micorrízico a la corteza de la raíz (Catoira et al., 2000), o en ortólogos a *CASTOR* y a *POLLUX* que también se requieren para la entrada tanto de MAF como de rizobios (Imaizumi-Anraku et al., 2005). Como la proteína DMI en *Arabidopsis* no se requiere para la interacción con *P. indica* (Shahollari et al., 2007) se podría analizar la expresión del gen *At1G13230* y del gen *At5G16590*, que codifican proteínas de la familia LRR, por presentar dominios con repeticiones ricas en leucina y se ha demostrado que ambas están implicadas en promover el crecimiento y aumentar la producción de semillas inducido por *P. indica* (Shahollari et al., 2007).

CAPÍTULO V Factores transcripcionales del frijol pertenecientes a la familia *SHI/STY/SRS* como reguladores claves para el desarrollo y funcionamiento de nódulos en la asociación simbiótica con *R. etli*.

V.1 Antecedentes del Capítulo V.

Los FT de la familia SHORT INTERNODES (SHI)/STYLISH (STY)/ SHI RELATED SEQUENCE (SRS) son exclusivos de plantas y juegan un papel fundamental en varios procesos del desarrollo, controlando la señalización o respuesta a giberelinas y auxinas (Fridborg et al., 2001; Ståldal et al., 2012). Todos los miembros de esta familia comparten dos dominios altamente conservados: un dominio de dedo de zinc C3HC3H y un motivo IGGH que parece ser específico de esta familia (Fridborg et al., 2001; Gomariz-Fernández et al., 2017). En esta familia de proteínas se incluyen reguladores del crecimiento importantes para *Arabidopsis* como son los LATERAL ROOT PRIMORDIA1 (LRP1), STY1, STY2 y SRS7 (Singh et al., 2020).

En *L. japonicus* se identificaron nueve miembros dentro de esta familia (Shrestha et al., 2021). Estudios recientes demostraron que los *STY* y sus genes blancos (*YUC1/YUC11*) que codifican para flavinas monooxigenasas que participan en la biosíntesis de auxinas, están implicados en la cascada regulatoria dependiente de NF-YA1 para la acumulación local de auxinas en las células del primordio del nódulo (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021) garantizando la formación y el desarrollo de estos. En respuesta a la inoculación con *M. loti*, el factor de transcripción inducible por citocininas NODULE INCEPTION (NIN) recluta el programa de desarrollo de raíces laterales por la activación transcripcional de *ASYMMETRIC LEAVES 2-LIKE 18/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16a (ASL18/LBD16a)* además de regular la transcripción de *NFYA1* para promover la biosíntesis de auxinas y activar la transcripción de los genes *STY* y *YUCCA* garantizando la división de las células corticales de la raíz en la organogénesis del nódulo (Schiessl et al., 2019).

Un nodo regulatorio similar NF-YA1/STY se ha reportado en *M. truncatula* para el desarrollo de nódulos indeterminados.

En nuestro grupo de trabajo, los estudios previos sobre el transcriptoma de frijol (O'Rourke et al., 2014), reveló que los transcritos de los 10 genes de la familia *STY* del frijol común, se expresan significativamente en diferentes etapas del desarrollo de los nódulos y no en otros

órganos de la planta, por lo que consideramos que pudieran jugar un papel relevante en la asociación simbiótica entre *P.vulgaris-R.etli*. En una colaboración con el Dr. Krzysztof Szczyglowski y la Dra. Arina Shrestha del Agriculture and Agri-Food Canada, London Research and Development Centre, Ontario, Canadá, se hizo una filogenia con las secuencias proteicas de los miembros de la familia *STY* en *L. japonicus* y en *P. vulgaris* (Figura V.1).

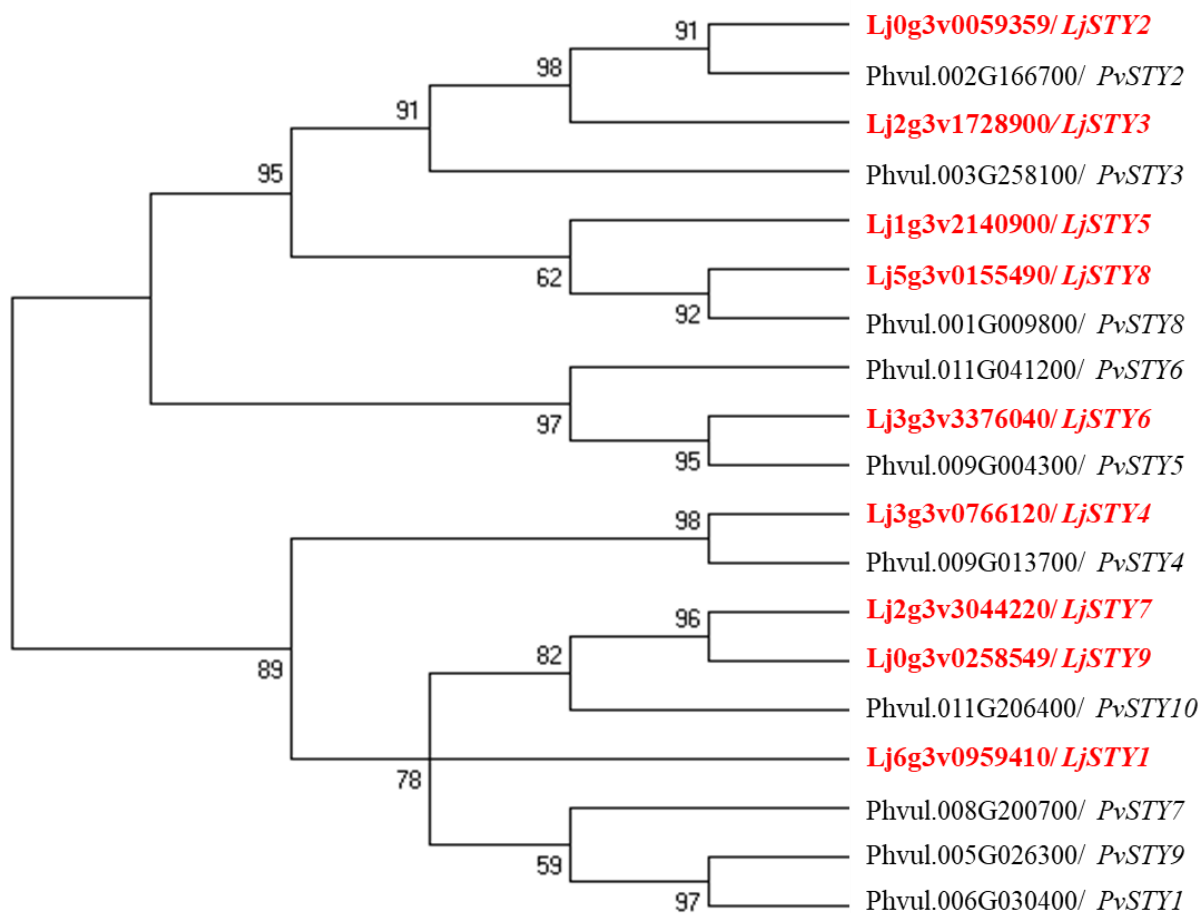


Figura V.1| Árbol filogenético de la familia *STY* obtenida por el método de Neighbor joining. *L. japonicus* (color rojo; 9 miembros identificados en www.kazusa.or.jp/lotus/; <https://lotus.au.dk/>) (Shrestha et al., 2021) y *P. vulgaris* (color negro; 10 miembros identificados en PvGEA (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>)) (O'Rourke et al., 2014). El nombre del gen en *P. vulgaris* se asignó teniendo en cuenta el posible ortólogo en *L.japonicus* de acuerdo a la relación filogenética y al análisis por BLAST de la secuencia de las proteínas STY de Lotus con respecto al proteoma del frijol común en Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>).

V.2 Objetivo del capítulo V.

Investigar el papel de los FT de la familia SHI/STY/SRS de frijol como reguladores claves de la asociación simbiótica con *R. etli*.

V.3 Materiales y Métodos del Capítulo V.

En este trabajo se utilizó como material vegetal el frijol común (*P. vulgaris*) Mesoamericano cv BAT93 (Vlasova et al., 2016) y se inoculó con diferentes cepas de *R. etli* como la CE3 (Quinto et al., 1982) y la GR14 (Herrera-Cervera et al., 1999) (que son de origen Mesoamericano y fueron facilitadas por la Dra. Susana Brom (CCG-UNAM, México) y la cepa 152N3 de origen Andino (Aguilar et al., 2004; Zanetti et al., 2010) (facilitada por los Dres. Mario Aguilar y Eugenia Zanetti, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

Para establecer la condición de simbiosis y realizar ensayos de nodulación, se siguió el mismo protocolo para la germinación de semillas, el crecimiento de las plantas y la extracción de RNA a partir de tres réplicas biológicas, reportado por Ayra et al., (2021).

Para la cinética de nodulación entre el frijol y las cepas de *R. etli* GR14 y 152N3 se empleó el sistema de crecimiento en bolsas de germinación o “growth pouches” (Figura V.5A) (Weaver and Frederick, 1972) y el conteo de los nódulos formados en cada planta se realizó desde los 7 hasta los 15 días post-inoculación (dpi).

Para identificar elementos *cis* regulatorios en la región promotora del gene *PvSTY10*, se realizó un análisis *in silico*. Con este objetivo, se extrajo la secuencia de DNA de 11,200 pb correspondiente a la región río arriba del codón de iniciación ATG para el gen *PvSTY10* hasta topar con el gen contiguo y el análisis incluyó la identificación de elementos *cis* relacionados con la nodulación o el desarrollo de raíces, así como secuencias consenso CARG y CCAAT que son reconocidas por FT-MADS y FT-NFY respectivamente (Riechmann et al., 1996; Mantovani, 1999) como se describió previamente en Ayra et al., (2021). Para este análisis se utilizó la base de datos NEW PLACE (Higo et al., 1999).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el análisis cuantitativo por qRT-PCR de cada gen de la familia *STY* y de otros genes reguladores como *PvNIN* (Phvul.009G115800); *PvNFYA1* (Phvul.001G196800); *PvNFYB7* (Phvul.003G086800) y *PvNFYCI* (Phvul.001G224400) empleando como genes de referencia (*UBQ9*, *MDH* y *HSP*), se provee en la Tabla V.1.

Tabla V.1 Oligonucleótidos utilizados en los análisis de expresión por qRT-PCR.

Nombre del Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>PvSTY1</i>	TCAGTTATGGCAAGAGCACG	AATCCTTTTTTCGCCTGGTTT
<i>PvSTY2</i>	CACGCCAACAATCAGAGAGA	GAGCGAAGCAACAATCACAA
<i>PvSTY3</i>	AACATTGGGGGACATGTGTT	CCAGAAGAAGAGACAACGCC
<i>PvSTY4</i>	ACACTCAACTCGTCTCCGCT	CTGTTTCATCTGAAGCGTCCA
<i>PvSTY5</i>	CCCGGTATGCCATATTTTAC	TGTTTCTAGGTGCACTTGCG
<i>PvSTY6</i>	TGCAAGTGCAACTATGCCTC	ATTCTCTTCTTTCCCCGCAT
<i>PvSTY7</i>	GGGGTGGAGAATAGGGATGT	CCAAGTAACCCTCCACCAGA
<i>PvSTY8</i>	CTTGCGCTCCACTTCCTATC	ACACGTGCCCTCCTATGTTC
<i>PvSTY9</i>	AAGGGACGTGGATACGACTG	GGCATTGGAGTTGGAAGTGT
<i>PvSTY10</i>	ATCAGTGGCCATGTGTTCAA	GAACCCCAATTGCAGAAGAA
<i>PvNFYA1</i>	TCATTTTGGATCTTCTGTGCACAC	GCTTCTTCATCTGGTCTCATAAAGG
<i>PvNFYB7</i>	GATGGAAGGGGAGAAAAGTGC	CCCTATGTGCATCCACAATTACC
<i>PvNFYC1</i>	GCAGGGCTATATCGGTCTTTTC	GAGTAACATTTTGGATTCAATG
<i>PvNIN</i>	GGGAGAAGAGGCGTACGAAG	GTTGTGGGACACACTCCGAT
<i>UBQ9</i>	CGCTTCCTCCTTTGTTTCGTT	ATGTATGTGGGCAACACCTAT
<i>MDH</i>	AGGCATGGAGAGGAAAGATGT	TGGGTTAGCAACAACCAGAAC
<i>HSP</i>	CGGGGAGAGAAAGAGAGAAGA	AACACAAACTTCCGCATGAAC

V.4 Resultados y Discusión del Capítulo V.

V.4.1 Análisis de la expresión de los genes *PvSTY* en raíces y nódulos de plantas de frijol común en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Con los datos de RNA-seq reportados en el PvGEA (O'Rourke et al., 2014) se hizo un mapa de calor (Figura V.2), donde se visualiza el patrón de expresión génica de los 10 miembros de la familia *STY* en las diferentes librerías de raíz y nódulos en *P. vulgaris* cv. *Negro jamapa* inoculado con *Rhizobium tropici*. Como se indica con el color rojo en el mapa de calor, 7 de los 10 genes de esta familia tuvieron un aumento en la expresión en las bibliotecas de nódulos.

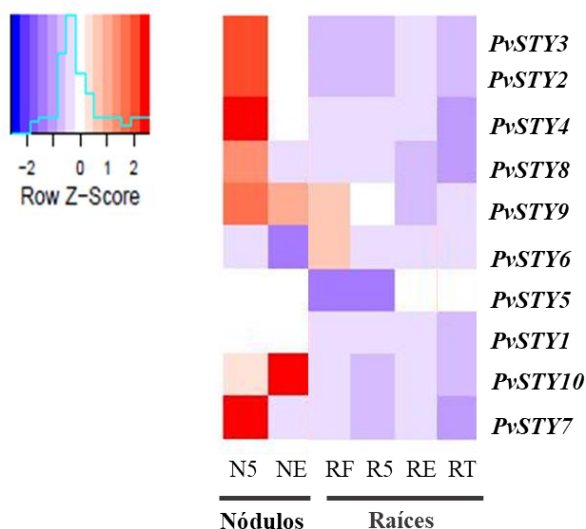


Figura V.2| Mapa de calor con los datos de RNA-seq de los genes de la familia *STY* del frijol en raíces y nódulos formados en la simbiosis entre *P. vulgaris* cv. *N. jamapa* y *R. tropici*. Los datos de expresión se obtuvieron del PvGEA (O'Rourke et al., 2014); N5: Nódulos inmaduros, 5 días post-inoculación (dpi); NE: Nódulos efectivos 21 dpi; RF: Raíces enteras de plantas fertilizadas recolectadas a los 21 días; R5: raíz completa separada de los nódulos inmaduros de 5dpi; RE: Raíz completa separada de nódulos efectivos de 21 dpi; RT: Extremo de la raíz (0.5 cm) colectada de plantas fertilizadas en la etapa de desarrollo del 2do trifolio. La puntuación Z indica la expresión comparativa entre las bibliotecas para cada gen: rojo =alta, azul= baja.

Con base a los datos de RNA-seq, quisimos ver si en el genotipo de frijol utilizado en nuestro trabajo, BAT93, en simbiosis con *R.etli*, se asemejan estos patrones de expresión tanto en raíz como en nódulos, por lo que realizamos el análisis de expresión génica por qRT-PCR a

partir de raíces inoculadas y nódulos en diferentes etapas de la simbiosis que abarcó nódulos inmaduros (10 y 15 dpi), nódulos efectivos (22 dpi) y nódulos senescentes (35 dpi) (Figura V.3).

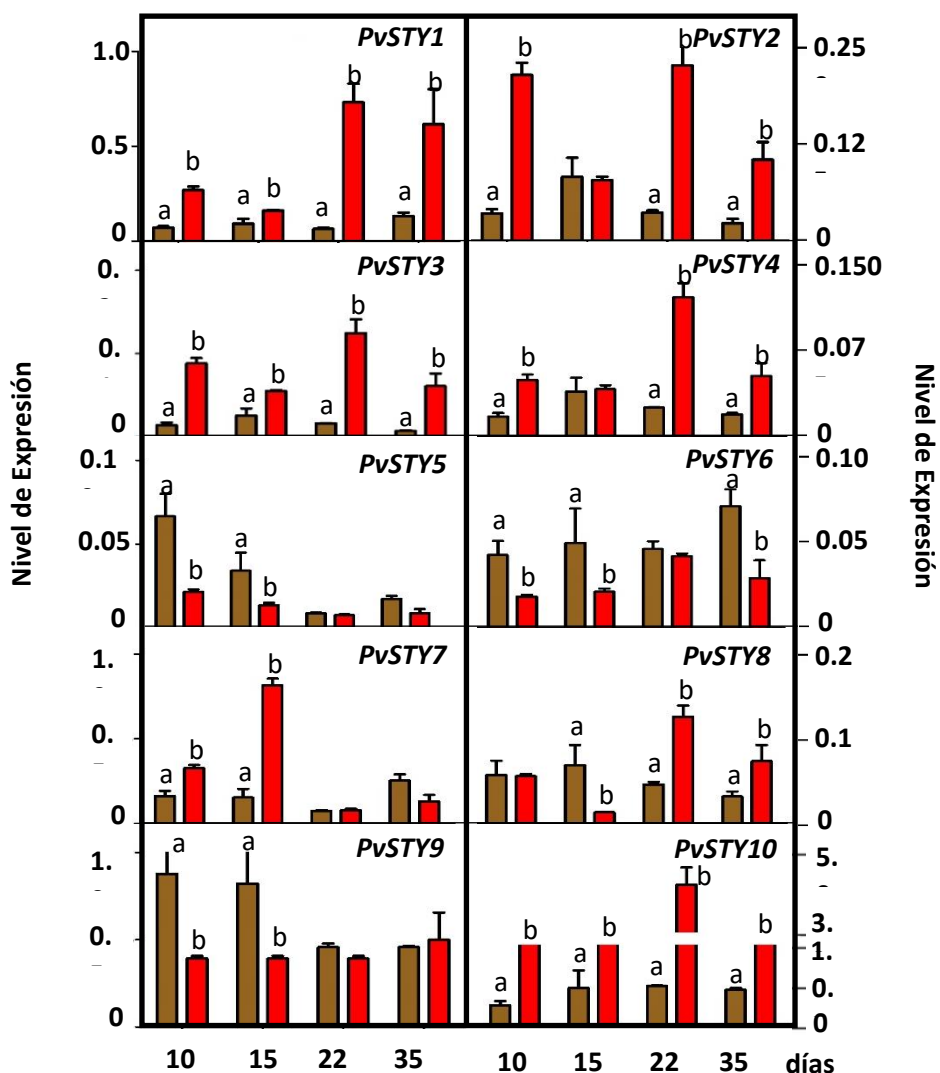


Figura V.3| Análisis de expresión de 10 miembros de la familia *PvSTY* en raíces y nódulos formados en diferentes etapas de la simbiosis entre *P. vulgaris* BAT93-*R. etli*. Los niveles de expresión se determinaron por qRT-PCR a partir de raíces inoculadas (barras cafés) y nódulos (barras rojas). El nivel de expresión se refiere a la expresión génica basado en el valor de Ct, normalizado con la expresión de los genes de referencia (*UBQ9*, *HSP* y *MDH*). Para cada uno de los genes se realizó una prueba *t* de Student en cada tiempo evaluado, comparando seis valores de expresión obtenidos a partir de tres réplicas biológicas

y tres réplicas técnicas en las raíces inoculadas contra los seis valores de expresión obtenidos en nódulos. Los valores de ($p < 0.05$) se consideraron significativos indicándose con diferentes letras minúsculas en el extremo superior de las barras.

De esta familia, 5 genes (*PvSTY1*, *PvSTY2*, *PvSTY3*, *PvSTY4* y el *PvSTY10*) se expresan tanto en los nódulos inmaduros de 10 y 15 días post-inoculación (dpi) como en los nódulos maduros y senescentes (de 22 y 35 dpi respectivamente), con diferencias significativas en relación con la expresión en raíces, por lo que su función pudiera estar relacionada tanto con el desarrollo como con el funcionamiento de los nódulos.

El gen *PvSTY7* se expresa en nódulos inmaduros con diferencias significativas respecto a los valores de expresión en raíz, por lo que pudiera estar más relacionado con la organogénesis de los nódulos; mientras que, los genes *PvSTY5* y *PvSTY6* se expresan en las raíces inoculadas desde tiempos tempranos, con diferencias significativas en relación con la expresión en nódulos, por lo que pudieran estar más involucrados en la infección por rizobios o en el desarrollo de raíz.

En los análisis de expresión por qRT-PCR, el gen *PvSTY9* alcanzó mayor expresión en las raíces inoculadas de tiempos tempranos (10 y 15 dpi) que, en los nódulos, a diferencia de los resultados obtenidos por RNA-seq (O'Rourke et al., 2014). Esto puede deberse a que el genotipo de frijol y la especie de rizobio utilizada en cada uno de los trabajos es diferente; además son diferentes los tiempos del desarrollo de los nódulos analizados en ambos trabajos, pero a pesar de estas diferencias, en general si existe similitud en cuanto a la expresión de los *PvSTY*, tanto en raíz como en nódulos.

Estos resultados son consistentes con los publicados por Shrestha et al., (2021), que confirman los niveles de expresión elevados de los genes *STY* durante etapas tempranas de la simbiosis entre *L. japonicus* y *M. loti*. También demostraron, a través de fusiones de promotores de genes *STY* con el gene reportero *GUS*, que los genes *STY* de *L. japonicus* se expresan en primordios de raíces laterales, raíces laterales ya emergidas, primordios de nódulos y nódulos maduros (Shrestha et al., 2021).

De manera interesante, *PvSTY10* alcanza el valor máximo de expresión en nódulos maduros (22 dpi) siendo hasta 8 veces superior al valor de expresión en las raíces inoculadas (Figura V.3).

Con base en estos resultados, podemos proponer que la familia de genes *STY* en el frijol común está involucrada en el desarrollo de raíces y en la regulación del proceso de simbiosis con *R. etli* que pudiera ser en diferentes etapas de este proceso, ya sea en la etapa de infección temprana, en la organogénesis o funcionamiento de nódulos garantizando la formación de haces vasculares, la división de células corticales previo a la diferenciación de los nódulos, en la expresión de transportadores hacia el simbiosoma, entre otros elementos o en la etapa de senescencia. Sería oportuno darle continuidad a este tema de investigación para definir las(s) etapa(s) de la simbiosis en las que, específicamente, actúen de manera relevante cada uno de los FT *STY* de frijol.

V.4.2 Identificación de elementos *cis* reguladores en el promotor *PvSTY10*.

Para inferir posibles reguladores transcripcionales de *PvSTY10*, que de todos los miembros de la familia fue el que alcanzó mayor expresión en nódulos maduros, realizamos un análisis *in silico* de la región promotora para identificar elementos regulatorios *cis* relacionados con el proceso de simbiosis y el desarrollo de raíces. La relevancia de analizar regiones tan grandes río arriba del codón de iniciación ATG se fundamenta con el trabajo de Liu et al., (2019), quienes reportaron que las secuencias regulatorias necesarias para la expresión de *NIN* en *M. truncatula* y garantizar los procesos de infección epidérmica durante la simbiosis, se encuentran dentro de los 5 kb río arriba al codón de inicio del gen. Sin embargo, también identificaron regiones *cis* río arriba al codón de inicio de *NIN* en posiciones más remotas (ca. 20kb) que se requieren para la expresión de *NIN* en el periciclo y esta región es esencial para la organogénesis de los nódulos ya que contiene elementos respuesta a citocininas que están conservados en ocho especies de leguminosas (Liu et al., 2019).

Por lo tanto, analizamos una región de 11.2 kb río arriba del codón de iniciación ATG de *PvSTY10*, que corresponde a la región intergénica hasta topar con el gen contiguo (Figura V.4).

El análisis de los elementos *cis* reveló la presencia de elementos específicos de órganos OSE1ROOTNODULE (Vieweg et al., 2004) y OSE2ROOTNODULE (Fehlberg et al., 2005) hasta 8 y 17 veces respectivamente en la región del promotor analizada (Figura V.4A), las cuales son secuencias consenso características de los promotores activados en células de nódulos radicales infectados. Otro elemento *cis* que nos llamó la atención fue

ROOTMOTIFTAPOX1 (Elmayan and Tepfer, 1995) que está relacionado con el desarrollo de raíces y se repite hasta 11 veces en las primeras 2 kb del promotor de *PvSTY10* (Figura V.4A). Decidimos analizar si este elemento *cis* estaba conservado en genes ortólogos a *PvSTY10* en otras leguminosas y encontramos que en 2 kb corriente arriba del codón de iniciación se repite para *G.max* (Glyma.15G235000.1/ 8 veces), en *M.truncatula* (Medtr8g039110.1/ 18 veces) y en *L.japonicus* (Lj3g0008866.1/ 8 veces). Sin embargo, el mismo análisis, pero en gramíneas como *Zea mays* (PHB47.08G247600.1/ 1 vez) y *Oryza sativa* (LOC_Os05g32070.1/ 3 veces). Esto demuestra que la presencia de este elemento ROOTMOTIFTAPOX1 en las leguminosas no es una casualidad y que está conservado evolutivamente. Aunque posiblemente el espacio entre las cajas de este elemento sea un parámetro importante en el mecanismo molecular para que las proteínas puedan interactuar y tener especificidad por el gen diana, como se requiere para las cajas CArG reconocidas por FT MADS (Melzer et al., 2009).

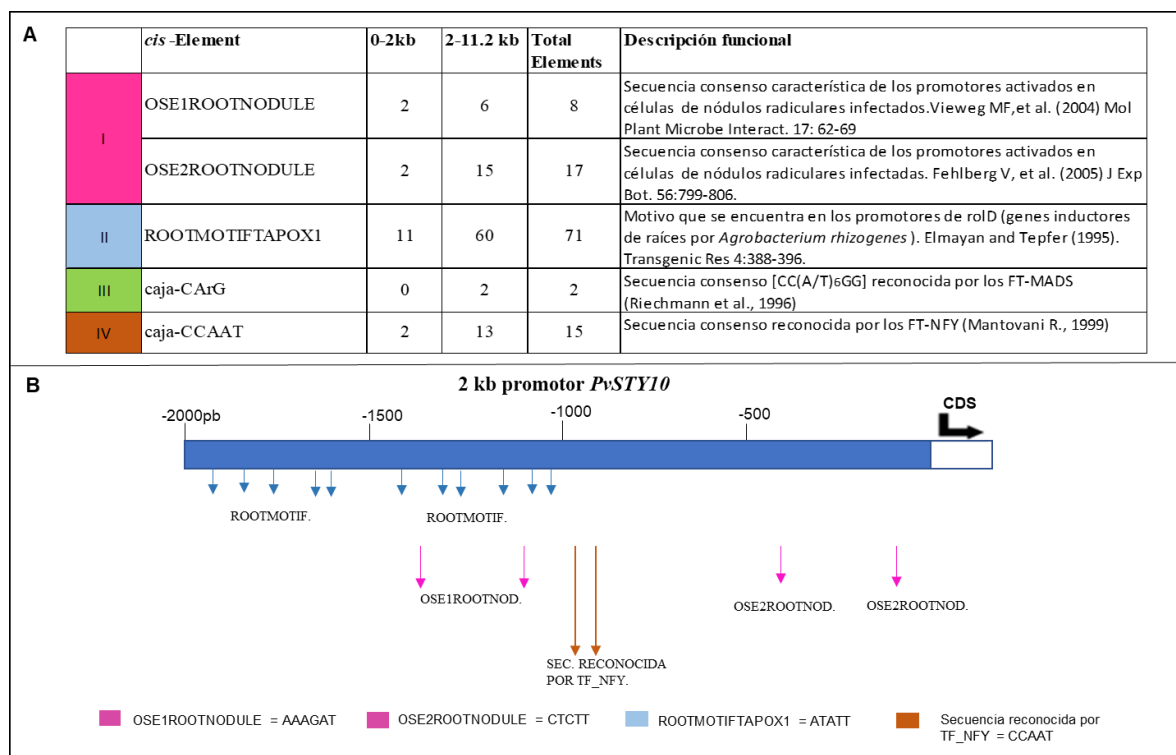


Figura V.4| Identificación de elementos *cis* río arriba del codón de iniciación en el gen *PvSTY10* (Phvul.011G206400.1). (A) Elementos *cis* relacionados a la simbiosis (rosa), el desarrollo de raíz (azul), sitio de unión para TF-MADS (verde) y sitios de unión para TF-NFY (café) presentes en la región analizada del promotor de *PvSTY10*. (B) Esquema para señalar

con flechas la posición de cada elemento *cis* en las primeras 2 kb de la región promotora analizada.

Con base en el artículo “Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-domain / AGL Transcription Factors” (Ayra et al., 2021) presentado en el Capítulo III, decidimos analizar si el gen *PvSTY10* pudiera ser un blanco directo de estos factores de transcripción. Por tanto, analizamos si la secuencia promotora de *PvSTY10* contiene los elementos *cis* (cajas CArG) que son reconocidos por los FT MADS. Identificamos 2 de estas cajas CArG: (CCATTATAGG/ en la posición -3243-3252) y (CCTTTATTGG/ en la posición -4670-4679) (Figura V.4A). Estas secuencias, que se encuentran río arriba de los primeros 2 kb representados en la Figura V.4B, pudieran funcionar como “enhancer” que al ser reconocidos por proteínas de la familia MADS, se potencian los niveles de transcripción del *PvSTY10* y forman parte de la cascada regulatoria que garantiza el proceso de infección por rizobios y la organogénesis de nódulos en el frijol común (Ayra et al., 2021).

En las leguminosas, otros reguladores de etapas claves del proceso de simbiosis con rizobios (como es la etapa de infección y desarrollo del hilo infectivo) son los FT de la familia NF-Y. Estos forman complejos triméricos compuestos por las subunidades A, B y C que son codificadas por pequeñas familias multigénicas (Baudin et al., 2015). El NF-YA tiene un dominio de unión que interactúa directamente con la caja CCAAT del DNA y requiere de las otras dos subunidades para su unión (Laloum et al., 2013; Rípodas et al., 2015).

Con base en esta información, analizamos la región del promotor de *PvSTY10* con el fin de identificar la secuencia consenso reconocida por NFYA1 e inferir que, al igual que en Lotus, los *STY* del frijol común también pudieran estar implicados en la cascada regulatoria dependiente de NFY-A1. De manera interesante encontramos que esta secuencia consenso se llega a repetir hasta 15 veces en la región del promotor analizada (Figura V.4A).

Podemos concluir a partir de los resultados obtenidos del análisis de elementos *cis*, que la región promotora de *PvSTY10* contiene elementos regulatorios que podrían facilitar su expresión en respuesta a rizobios y esto concuerda con los datos obtenidos en el análisis de la expresión génica mostrados anteriormente.

V.4.3 ¿Es regulado el gen *STY* de frijol por la vía de señalización NIN-NFY?

Se conoce que los NF-Y de leguminosas son regulados transcripcionalmente por los TF NIN y post-transcripcionalmente por miR169 (Comber et al., 2006; Soyano et al., 2013).

En *L. japonicus*, se demostró que NIN regula a los FT de la familia NF-Y (A,B,C) (Soyano et al., 2013) y estos están implicados en la regulación de los FT *STY* para la biosíntesis y acumulación local de auxinas en las células corticales de la raíz (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021) lo cual induce a la división de estas células y es un paso inicial en la organogénesis del nódulo (Soyano et al., 2013).

En el frijol las subunidades NF-YA1, B7 y C1 se inducen en la simbiosis con rizobios y son las que forman el trímero que regula este proceso (Rípodas et al., 2015). Se ha observado que la mayor expresión de *NF-Y* de frijol, correlaciona con una nodulación más eficiente, o sea en aquellas simbiosis en las que se forman más nódulos se expresa más *NF-Y*. Estas observaciones resultaron del análisis de las simbiosis frijol-rizobia en las que ambos simbiontes provienen del mismo origen geográfico (Mesoamericano o Andino) que, en general, forman más nódulos en comparación con simbiosis en las que el genotipo de frijol y el la especie / aislado de rizobia provienen de distintos orígenes geográficos (Aguilar et al., 2004; Zanetti et al., 2010).

Con base en la figura V.4, que muestra cajas CCAAT en el promotor de *STY10*, proponemos que, al igual que sucede en *L. japonicus* (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021), en frijol NF-Y pudiera regular transcripcionalmente a *STY*. Este resultado en conjunto con los reportes de la correlación entre eficiencia de nodulación y expresión de NF-Y en simbiosis de frijol (Aguilar et al., 2004; Zanetti et al., 2010), nos llevó a analizar si existe correlación de expresión entre los FT de la vía propuesta (*NIN – NF-Y - STY*) y la eficiencia de nodulación en diferentes simbiosis de frijol.

Utilizando un sistema de crecimiento en “growth pouches” realizamos el conteo del número de nódulos por planta desde los 7 hasta los 15 dpi (Figura V.5A). Observamos que la simbiosis frijol BAT93 – *R. etli* GR14 muestra una mayor cantidad de nódulos (a partir de los 11 dpi) con respecto a la simbiosis BAT93 – *R. etli* 152N3 (Figura V.5B).

Tomamos muestras de raíces inoculadas a las 24 horas post inoculación (hpi), para realizar el análisis de la expresión de dos candidatos de la familia *STY*: el *STY7* y el *STY10*, que en la simbiosis BAT93 - *R. etli* CE3 mostraron su nivel de expresión máximo en los nódulos inmaduros y en los nódulos maduros, respectivamente (Fig. V.3). Además, como ya se

comentó, se incorporaron los análisis de expresión *NIN* y *NFY-A1*; *NFYB7* y *NFY-C1*, reguladores centrales de etapas claves (como es la etapa de infección) en la simbiosis entre las leguminosas y rizobios.

Los resultados de la Figura V.5C muestran que en la simbiosis BAT93 – *R. etli* GR14, donde se observó mayor formación de nódulos, hay una mayor expresión de los 6 genes analizados: *NIN*, *NFY-A1*, *NFYB7*, *NFY-C1*, *STY7* y *STY10*; mientras que en la simbiosis BAT93 - *R. etli* 152N3 se obtuvieron los resultados opuestos. Con base en esto, proponemos que en frijol *NIN* pudiera ser el regulador transcripcional de *NFY*, que a su vez regulan a los genes *STY* (7 y 10), de manera similar a lo que se ha reportado sobre las vías de regulación de otras leguminosas (Combiere et al., 2006; Soyano et al., 2013; Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021).

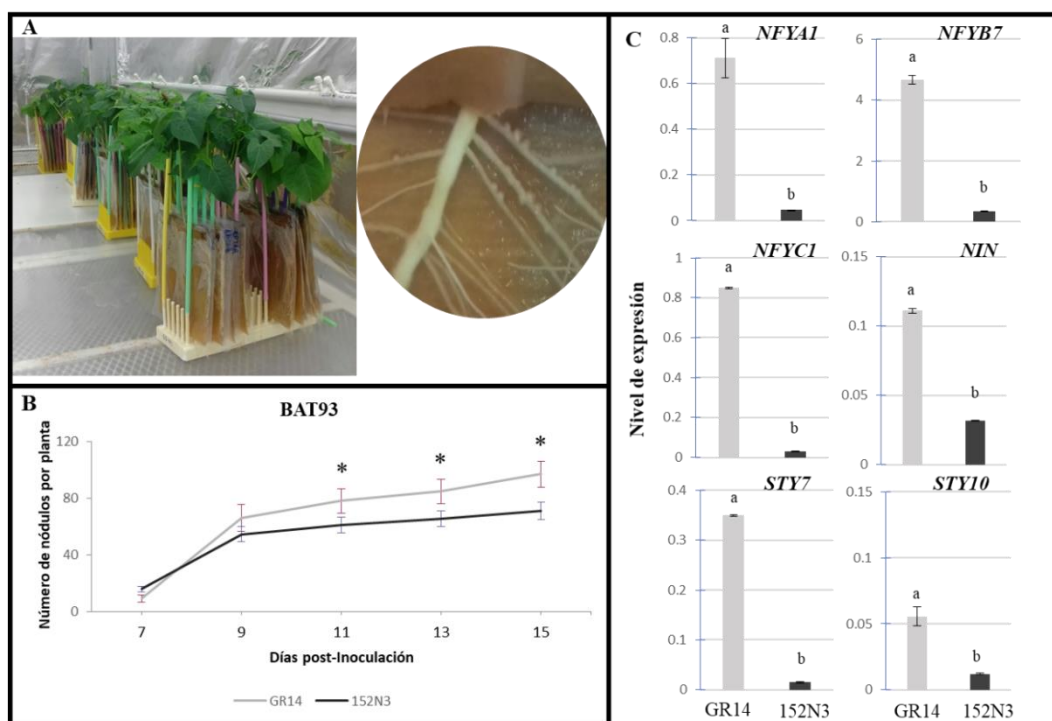


Figura V.5| Eficiencia de nodulación en la simbiosis entre el frijol común y diferentes cepas de *Rhizobium* (GR14/152N3). (A) Sistema de cultivo por “growth pouches” en plantas de frijol. (B) Cinética de nodulación en la simbiosis entre el genotipo de frijol BAT93 y dos cepas de *R. etli* (GR14: línea de color gris claro; 152N3: línea de color gris oscuro). (C) Análisis de la expresión génica para (*STY7/STY10*; *NFY-A1/NFY-B7/NFY-C1* y *NIN*) a las 24 hpi con cada cepa de *R. etli*. Se realizó una prueba *t* de Student como análisis estadístico en cada tiempo de la cinética de nodulación (en B) y para los valores de expresión de cada

uno de los genes (en C), considerando significativos los valores de ($p < 0.05$) que se indican con asteriscos o diferentes letras minúsculas.

V.5 Perspectivas del Capítulo V.

En la literatura se han descrito las vías de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno en leguminosas, tomando como modelo fundamentalmente las especies de *L. japonicus* y *M. truncatula* (Oldroyd, 2013). Recientemente, en *L. japonicus* se demostró que entre los blancos de los *STY* se encuentran genes relacionados con la vía de síntesis y acumulación de auxinas como son *YUCCA1* y *YUCCA11*, desempeñando un papel importante en las divisiones de las células del córtex para la formación de haces vasculares y primordios de nódulos (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021).

En *P. vulgaris*, en respuesta a la inoculación con rizobios, se demostró que *NFY-C1* regula la expresión de genes del ciclo celular como la ciclina B (*CYCB*) (Rípodas et al., 2015) Además se ha reportado que el nivel de expresión de *NFY-C1* de frijol, correlaciona con la cantidad de nódulos formados (Zanetti et al., 2010).

Con base en los resultados mostrados en este capítulo, proponemos que, en frijol, *STY10* está regulado transcripcionalmente por el trímero de NFY-A1, NFY-B7, NFY-C1 y por FT de la familia AGL.

Con el fin de demostrar que en frijol el *NFYA1* es un regulador transcripcional del *STY10*, pretendemos utilizar el sistema de transformación transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* y hacer co-infiltraciones con una construcción reportera (la que contiene al promotor del *STY10* fusionado al gen GUS y al gen de la GFP) y una construcción efectora (la que contiene clonado al *NFYA1*). En esta propuesta, estamos infiriendo que las otras dos subunidades B y C endógenas de *N. benthamiana*, funcionan adecuadamente con la subunidad A heteróloga, similar al ensayo de co-infiltración realizado por Soyano et al., (2013). La construcción reportera nos permitiría detectar, por tinciones histoquímicas o fluorescencia, si existe la regulación transcripcional propuesta.

Otra vía para demostrar que NFYA1 se une al promotor de Pv*STY10* en estos sitios *cis* que identificamos podría ser a través de un ensayo EMSA (cuyas siglas significan Electrophoretic Mobility Shift Assay) el cual, de manera muy general, indica que mediante cambios en la movilidad electroforética permite identificar si hay una unión entre la proteína y el DNA. También pudiera realizarse un análisis detallado del promotor de Pv*STY10*, mediante

deleciones de dicho promotor, con el fin de evaluar, con genes reporteros como *GUS*, la actividad transcripcional de determinados fragmentos del promotor con diferentes cajas de reconocimiento para FT identificadas.

Nuestros resultados son acordes con los reportados por Zanetti et al., (2010), que muestran una correlación entre la eficiencia de nodulación y el nivel de expresión de NF-Y en frijol. Además, por los resultados obtenidos en este trabajo proponemos, que esta correlación se da también para el nivel de expresión de los FT NIN y STY de frijol.

Desde luego, además de los que hemos analizado, debe haber muchos otros reguladores transcripcionales simbióticos, cuyo nivel de expresión esté relacionado con el FT de la vía de señalización a STY y con la eficiencia de nodulación de distintas simbiosis de frijol. Lo anterior se pudiera inferir analizando comparativamente datos de RNA-seq de tejidos simbióticos (raíz/nódulos) de frijol, obtenidos a partir de simbiosis con diferente eficiencia de nodulación para identificar otros reguladores transcripcionales o post-transcripcionales en los que se cumpla la correlación “nivel de expresión: eficiencia de nodulación”. Si no se encuentran datos de RNA-seq en los que se informe la cantidad de nódulos formados en cada simbiosis, se podría realizar el experimento de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) de raíz inoculada a tiempos tempranos, por ejemplo, de las simbiosis frijol BAT93 – *R. etli* GR14 en comparación con la de BAT93 – *R. etli* 152N3 (Figura V.5). De los resultados obtenidos se debe analizar, con herramientas bioinformáticas, los niveles de expresión de genes reguladores para eventos simbióticos tempranos e inferir los genes y las vías de señalización con alto nivel de expresión y su correlación con la eficiencia de nodulación.

CAPÍTULO VI DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

El trabajo con plantas de frijol común es de gran interés en nuestro grupo de trabajo ya que es la leguminosa más importante para el consumo humano en el mundo. De aquí que, la identificación de reguladores positivos que contribuyan a la adquisición de nutrientes, como es el nitrógeno en el proceso de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, es de gran importancia agrícola y pudiera ser utilizado para el mejoramiento del cultivo.

Este trabajo de tesis es el primer reporte acerca de la participación de los FT AGL como reguladores positivos de la simbiosis entre frijol y rizobios, controlando el desarrollo de raíz, la infección por rizobios, la organogénesis y el funcionamiento de los nódulos, así como el mecanismo de auto regulación de la nodulación a través de la interacción con *NIN* que es el regulador maestro de la simbiosis (Ayra et al., 2021).

En el frijol, se han podido generar plantas transgénicas estables tolerantes al estrés hídrico (Liu et al., 2005) a través de *Agrobacterium tumefaciens*. Por otra parte, mediante el bombardeo de partículas en células embrionarias con una construcción de RNAi, se generó un frijol transgénico estable que posee resistencia al virus de mosaico dorado del frijol (Aragão et al., 2013). Sin embargo, estas metodologías no son eficientes y su reproducibilidad no ha sido fácil. Aunque se han reportado poblaciones de mutantes de frijol, generadas por radiación con “fast-neutron” (O'Rourke et al., 2014) o por EMS (Porch et al., 2009), no existen bancos de mutantes públicos con mutantes generadas por inserción de transposones como en las leguminosas modelo *M. truncatula* y *L. japonicus*. Por lo tanto, considerando la dificultad para generar plantas transgénicas estables en frijol, en este trabajo utilizamos la transformación genética de frijol con *A. rhizogenes*, que permite la generación de plantas “compuestas”, donde la parte aérea es silvestre pero las raíces y nódulos que se generan son transgénicos (Estrada-Navarrete et al., 2007). Este enfoque de genética reversa ha permitido, con éxito, el análisis de diversos genes relevantes para el fenotipo de raíz y/o nódulos de frijol.

Lo que apoya nuestra hipótesis de que los PvAGL pudieran regular la transcripción de *PvNIN* se basa, en que su nivel de expresión disminuyó significativamente en las raíces no inoculadas para RNAi_AGL mientras que incrementó significativamente en las de OE_FUL. Es decir que aún en ausencia de los reguladores simbióticos, la expresión basal de *PvNIN* sí se regula por el silenciamiento o la sobreexpresión de los AGL. Además, esta propuesta se

apoya con los resultados que obtuvimos sobre el nivel de expresión de genes simbióticos tempranos que también disminuyeron en raíces inoculadas con silenciamiento de AGL. Algunos de estos genes (*NF-Y*, *RIC1*) se conoce que son blancos directos de NIN (Soyano et al., 2013; Ferguson et al., 2018) Recientemente, analizamos el nivel de expresión de *CYCLOPS* en raíces de frijol expresando las construcciones RNAi_AGL, EV y OE_FUL, a los 2 dpi con *R. etli* CE3 (similar al experimento de la Fig. 6 de Ayra et al. 2021). *CYCLOPS* es un interactor directo de la cinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CCaMK) la cual se cree que es un decodificador de las oscilaciones de Ca^{2+} , una de las primeras respuestas celulares a señales microbianas. Al ser fosforilado por ésta, induce una cascada de activación transcripcional en la cual NIN y el complejo heterotrimérico NFY actúan en sucesión jerárquica para iniciar el desarrollo de nódulos radicales simbióticos (Singh et al., 2014). El nivel de expresión de *CYCLOPS* en raíz control vs. silenciada en PvAGLs o sobreexpresando PvFUL-like es similar, sin diferencias significativas. Lo anterior se espera para reguladores como *CYCLOPS* que están río arriba de PvNIN en la cascada regulatoria e indica que la regulación transcripcional de *CYCLOPS* no está relacionada con los PvAGL.

Durante la evolución, las leguminosas han reclutado elementos reguladores de diferentes programas de desarrollo para vincularlos a los programas genéticos que intervienen en el desarrollo de raíces y la organogénesis de nódulos. Estudios recientes en *L. japonicus* y en *M. truncatula* demostraron que las leguminosas reclutaron un programa “equivalente” al del desarrollo de raíces laterales de Arabidopsis, ejercido por los genes *ASL18/LBD16a* y *NF-Y*, para regular la organogénesis del nódulo. En ambas leguminosas estos FT son regulados por NIN, regulador maestro de la simbiosis (Schiessl et al., 2019; Soyano et al., 2019; Soyano et al., 2021). Por otra parte, el desarrollo de raíces laterales en leguminosas puede ser inducida por señales simbióticas (LCO) de bacterias y hongos micorrizas, adicional al papel que juegan en el reconocimiento del hospedero y la formación de nódulos (Olah et al., 2005; Maillet et al., 2011) Otro ejemplo lo encontramos en los genes *NOOT-BOP-COCH-LIKE* (*NBCL*) de leguminosas que reprimen la identidad de la raíz en el nódulo simbiótico y son ortólogos de genes *BOP* de Arabidopsis que participan en los programas de desarrollo de hojas y flores (Couzigou et al., 2012; Magne et al., 2018). Nuestros resultados (Ayra et al. 2021) indican que los PvAGLs son reguladores positivos del desarrollo y arquitectura de la raíz, tanto en plantas fertilizadas (con nitrato como fuente de N) como en plantas en simbiosis

fijadora de N en las que además regulan el desarrollo de nódulos. Con base en esto y en los ejemplos de la literatura mencionados con relación al reclutamiento de las leguminosas de los programas de desarrollo existentes en otras plantas, proponemos que los *PvAGL* pudieran haber sido reclutados por las leguminosas para controlar el desarrollo tanto de raíces como de nódulos, aunque aún se requieren más estudios que nos permitan confirmar esta conclusión.

En comparación con otras leguminosas, se considera que el frijol es de los menos eficientes en la fijación de nitrógeno (Hardarson, 1993). Por muchos años se ha tratado de incidir en mejorar la eficiencia de fijación simbiótica de frijol. En la medida que se conozcan los reguladores positivos más relevantes para la fijación simbiótica de N en frijol, se podrá usar este conocimiento para mejorar el cultivo. Este trabajo evidencia un nuevo regulador positivo de la simbiosis del frijol: los FT AGLs con expresión elevada en raíz/nódulos y podría plantearse trabajo futuro orientado a eficientar la fijación simbiótica en frijol, a través de la sobreexpresión de gene(s) *PvAGL*.

¿Cuál de los seis genes *PvAGL* de mayor expresión en raíz y nódulos de frijol, sería el candidato idóneo para la sobreexpresión en la simbiosis de frijol? Habría que determinarlo en investigaciones futuras, a través de analizar el fenotipo simbiótico de plantas compuestas que sobreexpresen cada uno de los genes *PvAGL* con alta expresión en raíz / nódulo. Estos son, además de *PvFUL*-like: *PvXAL1*-like, *PvSVP*-like, *PvSOC1*-like, *PvAGL16*-like y *PvAGL24*-like. El enfoque de genética reversa usado en este trabajo servirá para el análisis de la sobreexpresión de cada uno de los genes *PvAGL*.

¿Cómo podría lograrse obtener cultivos de frijol con mayor expresión del *PvAGL* idóneo y mejor eficiencia en la fijación simbiótica de N? Una estrategia para esto se basa en aprovechar la gran diversidad genética que presenta el frijol y las excelentes colecciones de diferentes genotipos/variedades de frijol existentes (por ejemplo, en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT). Analizando colecciones de distintos genotipos de frijol, podrían detectarse aquellos con mayor expresión de *PvAGLs* en raíz/nódulos y analizar la correlación de este carácter con la eficiencia en la fijación biológica de N. Posteriormente podrían usarse las técnicas clásicas de fitomejoramiento con esa(s) variedad(es) detectada(s) (con sobreexpresión de *PvAGL*) y variedades tradicionalmente utilizadas para cultivo/alimento de frijol en diferentes países. Alternativamente, se pudieran generar plantas

transgénicas de frijol de las variedades agrícolas más utilizadas, con sobreexpresión del *PvAGL* seleccionado.

¿Son los TF AGL reguladores de la simbiosis con rizobia en otras leguminosas? Se conoce que varias especies de leguminosas, tanto con nódulos determinados como indeterminados, comparten los mismos reguladores de la simbiosis con rizobia (Roy et al., 2020). Pero esto no se conoce a detalle para los FT AGLs, aunque hay artículos que lo indican para soya y alfalfa (Zuccherro et al., 2001; Liu et al., 2015; Ma et al., 2019). Nos parece interesante ampliar la investigación sobre el papel de los FT AGL en la simbiosis fijadora de N en diferentes leguminosas. Nuestro análisis de “Gene Expression Atlas” muestran la elevada expresión de genes AGL en la raíz/nódulo de *M. truncatula*, *L. japonicus* y *G. max* -además de frijol- (Ayra et al. 2020), lo que indica que pueden ser reguladores positivos de la simbiosis en estas especies. Incluso podríamos explorar esto en leguminosas de importancia económica para la alimentación o forraje, como son la soya, el garbanzo, la lenteja o la alfalfa, analizando las bases de RNA-seq de estas especies. Algunas de estas especies, como la soya o la alfalfa, presentan ventajas para la obtención de transgénicas estables en comparación con el frijol. Por tanto, se pudiera explorar con esta herramienta para sobre expresar el gen *AGL* idóneo en raíz/nódulos y analizar el fenotipo simbiótico resultado de esas plantas. Posteriormente se podría aplicar ese conocimiento para su aplicación en el mejoramiento de la fijación simbiótica de N de esas especies.

El conocimiento aportado en esta tesis en relación con el papel que juegan los genes *AGL* en los eventos de simbiosis, podrían enriquecerse aún más explorando otros eventos de simbiosis, como el que se establece con hongos micorrizas, de gran importancia para la adquisición de fósforo del suelo, el cual es otro nutriente mineral de mayor importancia para la planta al igual que el nitrógeno, y que también está poco disponible en el suelo (Foo et al., 2014).

Otra familia de FT que se ha descrito como reguladores claves para el desarrollo de nódulos en *L. japonicus* es la familia *SHI/STY/SRS* (Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021).

En este trabajo de tesis, investigamos el papel que pudieran tener en la asociación simbiótica entre *P. vulgaris-R. etli*, pero son resultados preliminares y consideramos que es necesario profundizar aún más en estos estudios.

Los análisis de expresión génica por qRT-PCR de la familia *STY* del frijol común en diferentes etapas de la simbiosis, demostró que estos genes se expresan más en nódulos que en raíces inoculadas. Del análisis *in silico* en el promotor del gen *STY10* (que alcanzó el valor máximo de expresión en nódulos maduros de 22 dpi) se identificaron elementos *cis* relacionados con la nodulación o el desarrollo de raíces, así como secuencias consenso CArG y CCAAT que son reconocidas por FT MADS y FT NFY respectivamente (Riechmann et al., 1996; Mantovani, 1999). En base a estos resultados, inferimos que la familia de genes *STY* en el frijol común pueden estar regulados por la vía de NIN y de NFY al igual que en otras leguminosas (Soyano et al., 2013; Rípodas et al., 2015; Hossain et al., 2016; Shrestha et al., 2021) y estar involucrados en el desarrollo de raíces así como en diferentes etapas del proceso de simbiosis con *R.etli*. Además, consideramos que *PvSTY10* pudieran ser blancos de la regulación por AGL, lo cual también habría que demostrar en futuros experimentos.

La Figura VI.1 presenta las vías de señalización propuestas para los FT AGL y *STY*, relevantes para el control de la simbiosis del frijol con rizobios, derivada de los resultados presentados en esta tesis. Los factores de nodulación (FN) rizobiales al ser reconocidos por los receptores específicos en la membrana, desencadenan una cascada de señalización en la raíz que es esencial para el desarrollo de raíces, así como para el proceso de infección y la formación de nódulos en las leguminosas. Debido a esta cascada de señalización, se induce la transcripción de FT como *NSP2* y *NIN* y desde etapas tempranas también se induce la transcripción de *AGL*, que, a su vez en este trabajo de tesis, proponemos como regulador de la transcripción de *NIN* y de *NSP2*.

Tanto *AGL* como *NIN* pueden regular directa o indirectamente la transcripción de genes claves de la simbiosis en eventos tempranos cuyos productos enzimáticos garantizan la infección del rizobio y el desarrollo del hilo infectivo hacia las células corticales de la raíz.

El mantenimiento de un gran número de nódulos implica un gasto energético para la planta, por lo que después de los eventos iniciales de la infección por rizobios, en el mecanismo de auto regulación del número de nódulos (AON), intervienen *RIC1* y *TML* quienes son reguladores negativos de la organogénesis de los nódulos, pero son regulados por *NIN* y por los *AGL* de manera positiva en este proceso.

Consideramos que el conocimiento aportado sobre el papel de estos FT como reguladores de la simbiosis fijadora de nitrógeno, puede ser relevante para el desarrollo de sistemas agrícolas

que protejan el medio ambiente y sean capaces de cubrir la demanda de alimentos de la población, aunque debido a la complejidad de las redes regulatorias se requieren aún estudios globales que permitan la identificación de otros genes u otros reguladores -como miRNAs que posiblemente están participando en estas vías de regulación.

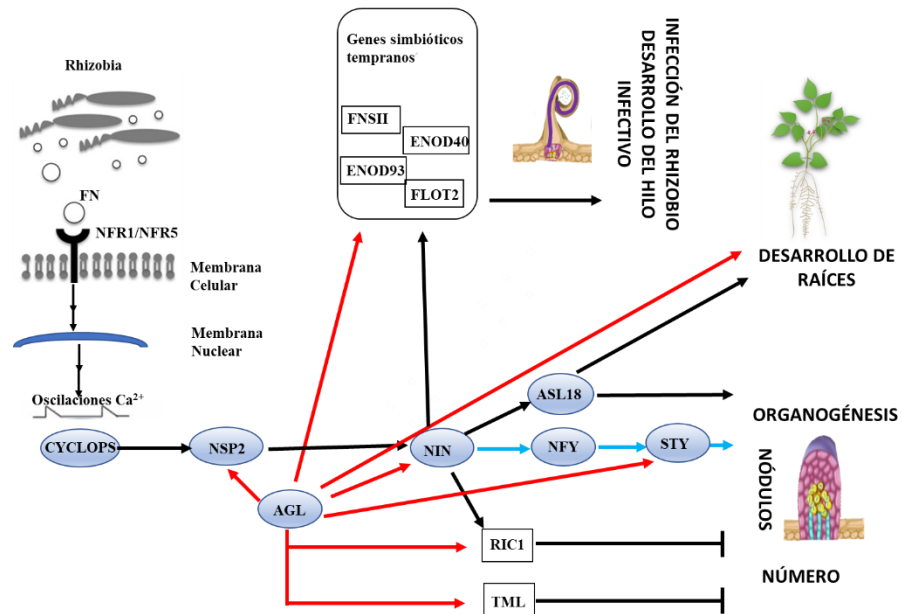


Figura VI.1| Modelo de regulación de los FT AGL y STY en la simbiosis frijol-*R. etli*.

Los FT se muestran como elipses y otro tipo de moléculas como rectángulos. Las flechas indican la regulación positiva y las líneas que terminan en línea perpendicular indican la regulación negativa. Ambas regulaciones pudieran ser directa o indirecta. Las líneas en rojo indican la regulación que ejercen los *AGL* propuesta por Ayra et al., 2021 y las líneas en azul indican los resultados de esta tesis en el capítulo V.

CAPÍTULO VII REFERENCIAS.

- Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37), 13548-13553. doi: 10.1073/pnas.0405321101.
- Akiyama, K., and Hayashi, H. (2006). Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot* 97(6), 925-931. doi: 10.1093/aob/mcl063.
- Alvarez-Buylla, E.R., Garcia-Ponce, B., Sanchez, M.P., Espinosa-Soto, C., Garcia-Gomez, M.L., Pineyro-Nelson, A., et al. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. *New Phytol* 223(3), 1143-1158. doi: 10.1111/nph.15793.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., et al. (2000a). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* 24(4), 457-466. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00891.x.
- Alvarez-Buylla, E.R., Pelaz, S., Liljegren, S.J., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., et al. (2000b). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10), 5328-5333. doi: 10.1073/pnas.97.10.5328.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., et al. (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* 19(9), 2866-2885. doi: 10.1105/tpc.107.052944.
- Aparicio-Fabre, R., Guillen, G., Loredó, M., Arellano, J., Valdes-Lopez, O., Ramirez, M., et al. (2013). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) PvTIFY orchestrates global changes in transcript profile response to jasmonate and phosphorus deficiency. *BMC Plant Biol* 13, 26. doi: 10.1186/1471-2229-13-26.
- Appleby, C.A., Turner, G.L., and Macnicol, P.K. (1975). Involvement of oxyleghaemoglobin and cytochrome P-450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which supports nitrogen fixation in *Rhizobium*. *Biochim Biophys Acta* 387(3), 461-474. doi: 10.1016/0005-2728(75)90086-9.
- Aragão, F.J., Nogueira, E.O., Tinoco, M.L., and Faria, J.C. (2013). Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *J Biotechnol* 166(1-2), 42-50. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.009.
- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., et al. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 24(9), 3838-3852. doi: 10.1105/tpc.112.103267.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A.K., Singh, V.P., Tyagi, A.K., et al. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* 8, 242. doi: 10.1186/1471-2164-8-242.
- Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu Rev Plant Biol* 64, 137-159. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120043.

- Ayra, L., Reyero-Saavedra, M.D.R., Arellano, M., Lozano, L.F., Ramirez, M., Leija, A., et al. (2021). Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-domain /AGL Transcription Factors. *Frontiers in Plant Science* 12. doi: 10.3389/fpls.2021.679463.
- Balanzá, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., and Ferrándiz, C. (2014). Genetic and phenotypic analyses of carpel development in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 1110, 231-249. doi: 10.1007/978-1-4614-9408-9_11.
- Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., and Rípodas, C. (2015). A Phylogenetically Conserved Group of Nuclear Factor-Y Transcription Factors Interact to Control Nodulation in Legumes. 169(4), 2761-2773. doi: 10.1104/pp.15.01144.
- Bhuvaneshwari, T.V., Bhagwat, A.A., and Bauer, W.D. (1981). Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol* 68(5), 1144-1149. doi: 10.1104/pp.68.5.1144.
- Blumwald, E., Fortin, M.G., Rea, P.A., Verma, D.P., and Poole, R.J. (1985). Presence of Host-Plasma Membrane Type H-ATPase in the Membrane Envelope Enclosing the Bacteroids in Soybean Root Nodules. *Plant Physiol* 78(4), 665-672. doi: 10.1104/pp.78.4.665.
- Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combier, J.P., et al. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J* 54(5), 876-887. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03448.x.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* 252(1), 55-128. doi: 10.1023/a:1024146710611.
- Bustos-Sanmamed, P., Mao, G., Deng, Y., Elouet, M., Khan, G.A., Bazin, J.R.M., et al. (2013). Overexpression of miR160 affects root growth and nitrogen-fixing nodule number in *Medicago truncatula*. *Funct Plant Biol* 40(12), 1208-1220. doi: 10.1071/fp13123.
- Cai, Z., Wang, Y., Zhu, L., Tian, Y., Chen, L., Sun, Z., et al. (2017). GmTIR1/GmAFB3-based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation. *New Phytol* 215(2), 672-686. doi: 10.1111/nph.14632.
- Camehl, I., Sherameti, I., Venus, Y., Bethke, G., Varma, A., Lee, J., et al. (2010). Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 185(4), 1062-1073. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03149.x.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4), 642-655. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., et al. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12(9), 1647-1666. doi: 10.1105/tpc.12.9.1647.
- Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.C., Niebel, A., Oldroyd, G.E., et al. (2012). *Medicago truncatula* ERN transcription factors: regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiol* 160(4), 2155-2172. doi: 10.1104/pp.112.203190.

- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6), 735-743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
- Combiér, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., et al. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 20(22), 3084-3088. doi: 10.1101/gad.402806.
- Corcilius, L., Hastwell, A.H., Zhang, M., Williams, J., Mackay, J.P., Gresshoff, P.M., et al. (2017). Arabinosylation Modulates the Growth-Regulating Activity of the Peptide Hormone CLE40a from Soybean. *Cell Chem Biol* 24(11), 1347-1355.e1347. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.014.
- Couzigou, J.M., Zhukov, V., Mondy, S., Abu el Heba, G., Cosson, V., Ellis, T.H., et al. (2012). NODULE ROOT and COCHLEATA maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* BLADE-ON-PETIOLE genes. *Plant Cell* 24(11), 4498-4510. doi: 10.1105/tpc.112.103747.
- Charpentier, M., Bredemeier, R., Wanner, G., Takeda, N., Schleiff, E., and Parniske, M. (2008). Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 20(12), 3467-3479. doi: 10.1105/tpc.108.063255.
- D'Haeseleer, K., Den Herder, G., Laffont, C., Plet, J., Mortier, V., Lelandais-Brière, C., et al. (2011). Transcriptional and post-transcriptional regulation of a NAC1 transcription factor in *Medicago truncatula* roots. *New Phytol* 191(3), 647-661. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03719.x.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., and Boivin, C. (2001). Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim Pol* 48(2), 359-365.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., et al. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* 17(8), 678-682. doi: 10.1016/j.cub.2007.02.047.
- Denarie, J., and Cullimore, J. (1993). Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* 74(6), 951-954. doi: 10.1016/0092-8674(93)90717-5.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., et al. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119(1), 71-84.
- Elmayan, T., and Tepfer, M. (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res* 4(6), 388-396. doi: 10.1007/bf01973757.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., et al. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* 2(7), 1819-1824. doi: 10.1038/nprot.2007.259.
- Fehlberg, V., Vieweg, M.F., Dohmann, E.M., Hohnjec, N., Puhler, A., Perlick, A.M., et al. (2005). The promoter of the leghaemoglobin gene VfLb29: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *J Exp Bot* 56(413), 799-806. doi: 10.1093/jxb/eri074.

- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., et al. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 52(1), 61-76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x.
- Ferguson, B.J., Li, D., Hastwell, A.H., Reid, D.E., Li, Y., Jackson, S.A., et al. (2014). The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnol J* 12(8), 1085-1097. doi: 10.1111/pbi.12216.
- Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A.H., Zhang, M., Su, H., Jones, C.H., et al. (2018). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ* 42(1), 41-51. doi: 10.1111/pce.13348.
- Ferguson, B.J., Ross, J.J., and Reid, J.B. (2005). Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiol* 138(4), 2396-2405. doi: 10.1104/pp.105.062414.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., and Yanofsky, M.F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* 127(4), 725-734.
- Ferrandiz, C., Pelaz, S., and Yanofsky, M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu Rev Biochem* 68, 321-354. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.321.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Carlson, R.W., Davies, A.E., and Downie, J.A. (1993). Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by nodX, which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor. *Mol Microbiol* 10(2), 351-360. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01961.x.
- Flôres, J.A., Amaral, C.B., Pinto, C.C., Mingotte, F.L., and Borges, L.L. (2017). Agronomic and qualitative traits of common bean as a function of the straw and nitrogen fertilization1. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 47(2), 195-201. . doi: <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4743979>.
- Foo, E., Ferguson, B.J., and Reid, J.B. (2014). Common and divergent roles of plant hormones in nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Plant Signal Behav* 9(9), e29593. doi: 10.4161/psb.29593.
- Fridborg, I., Kuusk, S., Robertson, M., and Sundberg, E. (2001). The *Arabidopsis* protein SHI represses gibberellin responses in *Arabidopsis* and barley. *Plant Physiol* 127(3), 937-948.
- Frugier, F., Poirier, S., Satiat-Jeunemaître, B., Kondorosi, A., and Crespi, M. (2000). A Krüppel-like zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. *Genes Dev* 14(4), 475-482.
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S., and Forde, B.G. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222(4), 730-742. doi: 10.1007/s00425-005-0020-3.
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sanchez, M., Murphy, A.S., Garcia-Ponce, B., Marsch-Martinez, N., et al. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J* 32(21), 2884-2895. doi: 10.1038/emboj.2013.216.

- Garcia-Cruz, K.V., Garcia-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M.P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoyes, B., et al. (2016). The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Ann Bot* 118(4), 787-796. doi: 10.1093/aob/mcw126.
- Garneau, M.G., Tan, Q., and Tegeder, M. (2018). Function of pea amino acid permease AAP6 in nodule nitrogen metabolism and export, and plant nutrition. *J Exp Bot* 69(21), 5205-5219. doi: 10.1093/jxb/ery289.
- Gomariz-Fernández, A., Sánchez-Gerschon, V., Fourquin, C., and Ferrándiz, C. (2017). The Role of SHI/STY/SRS Genes in Organ Growth and Carpel Development Is Conserved in the Distant Eudicot Species Arabidopsis thaliana and Nicotiana benthamiana. *Front Plant Sci* 8, 814. doi: 10.3389/fpls.2017.00814.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L., and Komina, O. (1999). Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol* 120(3), 867-878. doi: 10.1104/pp.120.3.867.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., et al. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435(7043), 819-823. doi: 10.1038/nature03610.
- Graham, P.H., and Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131(3), 872-877. doi: 10.1104/pp.017004.
- Groth, M., Takeda, N., Perry, J., Uchida, H., Dräxl, S., Brachmann, A., et al. (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(7), 2509-2526. doi: 10.1105/tpc.109.069807.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., and Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* 125(8), 1509-1517.
- Ham, B.K., and Lucas, W.J. (2017). Phloem-Mobile RNAs as Systemic Signaling Agents. *Annu Rev Plant Biol* 68, 173-195. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-041139.
- Hardarson, G. (1993). Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America. Developments in Plant and Soil Sciences. In: Bliss F.A., Hardarson G. (eds). Springer, Dordrecht.* vol 52. . doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-2100-2_1.
- Hastwell, A.H., Gresshoff, P.M., and Ferguson, B.J. (2015). Genome-wide annotation and characterization of CLAVATA/ESR (CLE) peptide hormones of soybean (Glycine max) and common bean (Phaseolus vulgaris), and their orthologues of Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 66(17), 5271-5287. doi: 10.1093/jxb/erv351.
- Heard, J., Caspi, M., and Dunn, K. (1997). Evolutionary diversity of symbiotically induced nodule MADS box genes: characterization of nmhC5, a member of a novel subfamily. *Mol Plant Microbe Interact* 10(5), 665-676. doi: 10.1094/MPMI.1997.10.5.665.
- Hempel, F.D., Weigel, D., Mandel, M.A., Ditta, G., Zambryski, P.C., Feldman, L.J., et al. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development* 124(19), 3845-3853.

- Herrada, G., Puppo, A., Moreau, S., Day, D.A., and Rigaud, J. (1993). How is leghemoglobin involved in peribacteroid membrane degradation during nodule senescence? *FEBS Lett* 326(1-3), 33-38. doi: 10.1016/0014-5793(93)81755-o.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J.s., Laguerre, G.I., Tichy, H.-V., Requena, N., Amarger, N.I., et al. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology* 30(1), 87-97. doi: 10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27(1), 297-300. doi: 10.1093/nar/27.1.297.
- Hirsch, A.M., Lum, M.R., and Downie, J.A. (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol* 127(4), 1484-1492.
- Hobecker, K.V., and Reynoso, M.A. (2017). The MicroRNA390/TAS3 Pathway Mediates Symbiotic Nodulation and Lateral Root Growth. 174(4), 2469-2486. doi: 10.1104/pp.17.00464.
- Hofferek, V., Mendrinna, A., Gaude, N., Krajinski, F., and Devers, E.A. (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* 14, 199. doi: 10.1186/s12870-014-0199-1.
- Holt, D.B., Gupta, V., Meyer, D., Abel, N.B., Andersen, S.U., Stougaard, J., et al. (2015). micro RNA 172 (miR172) signals epidermal infection and is expressed in cells primed for bacterial invasion in *Lotus japonicus* roots and nodules. *New Phytol* 208(1), 241-256. doi: 10.1111/nph.13445.
- Hossain, M.S., Shrestha, A., Zhong, S., Miri, M., Austin, R.S., Sato, S., et al. (2016). *Lotus japonicus* NF-YA1 Plays an Essential Role During Nodule Differentiation and Targets Members of the SHI/STY Gene Family. *Mol Plant Microbe Interact* 29(12), 950-964. doi: 10.1094/mpmi-10-16-0206-r.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., et al. (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* 433(7025), 527-531. doi: 10.1038/nature03237.
- Iñiguez, L.P., Nova-Franco, B., and Hernandez, G. (2015). Novel players in the AP2-miR172 regulatory network for common bean nodulation. *Plant Signal Behav* 10(10), e1062957. doi: 10.1080/15592324.2015.1062957.
- Ivanov, V.B., and Dubrovsky, J.G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci* 18(5), 237-243. doi: 10.1016/j.tplants.2012.10.002.
- Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F.A., and Smith, S.E. (2011). Role of mycorrhizal symbioses in phosphorus cycling. *Soil Biol.* 26, 137–168. doi: 10.1007/978-3-642-15271-9_6
- Jia, Y., Gray, V.M., and Straker, C.J. (2004). The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann Bot* 94(2), 251-258. doi: 10.1093/aob/mch135.
- Jibrán, R., Tahir, J., Cooney, J., Hunter, D.A., and Dijkwel, P.P. (2017). Arabidopsis AGAMOUS Regulates Sepal Senescence by Driving Jasmonate Production. *Front Plant Sci* 8, 2101. doi: 10.3389/fpls.2017.02101.

- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.
- Julius, B.T., Leach, K.A., Tran, T.M., Mertz, R.A., and Braun, D.M. (2017). Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant Cell Physiol* 58(9), 1442-1460. doi: 10.1093/pcp/pcx090.
- Kaló, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., et al. (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308(5729), 1786-1789. doi: 10.1126/science.1110951.
- Kamboj, D.V., Bhatia, R., Pathak, D.V., and Sharma, P.K. (2010). Role of nodD gene product and flavonoid interactions in induction of nodulation genes in *Mesorhizobium ciceri*. *Physiol Mol Biol Plants* 16(1), 69-77. doi: 10.1007/s12298-010-0009-7.
- Kamst, E., Spaink, H.P., and Kafetzopoulos, D. (1998). Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. *Subcell Biochem* 29, 29-71. doi: 10.1007/978-1-4899-1707-2_2.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M., Miwa, H., et al. (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 U S A* 103(2), 359-364. doi: 10.1073/pnas.0508883103.
- Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, W., Jung, H.S., Huijser, P., and Ahn, J.H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159(1), 461-478. doi: 10.1104/pp.111.192369.
- Kinkema, M., and Gresshoff, P.M. (2008). Investigation of downstream signals of the soybean autoregulation of nodulation receptor kinase GmNARK. *Mol Plant Microbe Interact* 21(10), 1337-1348. doi: 10.1094/mpmi-21-10-1337.
- Kouchi, H., and Yoneyama, T. (1984). Dynamics of Carbon Photosynthetically Assimilated in Nodulated Soya Bean Plants under Steady-state Conditions 2. The Incorporation of ¹³C into Carbohydrates, Organic Acids, Amino Acids and some Storage Compounds. *Annals of Botany* 53, 883-896.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S., Aubert, G., Genua, A., Szczyglowski, K., et al. (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature* 420(6914), 422-426. doi: 10.1038/nature01207.
- Kuč, J., and Rush, J.S. (1985). Phytoalexins. *Arch Biochem Biophys* 236(2), 455-472. doi: 10.1016/0003-9861(85)90648-4.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci* 18(3), 157-166. doi: 10.1016/j.tplants.2012.07.004.
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., et al. (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* 65(2), 481-494. doi: 10.1093/jxb/ert392.
- Libault, M., Joshi, T., Benedito, V.A., Xu, D., Udvardi, M.K., and Stacey, G. (2009). Legume transcription factor genes: what makes legumes so special? *Plant Physiol* 151(3), 991-1001. doi: 10.1104/pp.109.144105.

- Liu, A., Contador, C.A., Fan, K., and Lam, H.M. (2018). Interaction and Regulation of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Root Nodules of Legumes. *Front Plant Sci* 9, 1860. doi: 10.3389/fpls.2018.01860.
- Liu, A., Ku, Y.S., Contador, C.A., and Lam, H.M. (2020a). The Impacts of Domestication and Agricultural Practices on Legume Nutrient Acquisition Through Symbiosis With Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Front Genet* 11, 583954. doi: 10.3389/fgene.2020.583954.
- Liu, B., Wu, J., Yang, S., Schiefelbein, J., and Gan, Y. (2020b). Nitrate regulation of lateral root and root hair development in plants. *J Exp Bot* 71(15), 4405-4414. doi: 10.1093/jxb/erz536.
- Liu, J., and Bisseling, T. (2020). Evolution of NIN and NIN-like Genes in Relation to Nodule Symbiosis. *Genes (Basel)* 11(7). doi: 10.3390/genes11070777.
- Liu, J., Rasing, M., Zeng, T., Klein, J., Kulikova, O., and Bisseling, T. (2021). NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol* 230(1), 290-303. doi: 10.1111/nph.17215.
- Liu, J., Rutten, L., Limpens, E., van der Molen, T., van Velzen, R., Chen, R., et al. (2019). A Remote cis-Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 31(1), 68-83. doi: 10.1105/tpc.18.00478.
- Liu, W., Han, X., Zhan, G., Zhao, Z., Feng, Y., and Wu, C. (2015). A Novel Sucrose-Regulatory MADS-Box Transcription Factor GmNMHC5 Promotes Root Development and Nodulation in Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Int J Mol Sci* 16(9), 20657-20673. doi: 10.3390/ijms160920657.
- Liu, Z., Park, B.J., Kanno, A., and Kameya, T. (2005). The Novel Use of a Combination of Sonication and Vacuum Infiltration in *Agrobacterium*-mediated Transformation of Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *lea* Gene. *Molecular Breeding* 16(189). doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-005-6616-2>.
- Lobet, G., Pages, L., and Draye, X. (2011). A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol* 157(1), 29-39. doi: 10.1104/pp.111.179895.
- Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G., and Gresshoff, P.M. (2009). Ethylene insensitivity conferred by a mutated *Arabidopsis* ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic *Lotus japonicus*. *Ann Bot* 104(2), 277-285. doi: 10.1093/aob/mcp132.
- Lozano-Elena, F., Planas-Riverola, A., Vilarrasa-Blasi, J., Schwab, R., and Caño-Delgado, A.I. (2018). Paracrine brassinosteroid signaling at the stem cell niche controls cellular regeneration. *Plant Cell* 30(2), 131(2). doi: 10.1242/jcs.204065.
- Ma, W.-y., Liu, W., Hou, W.-s., Sun, S., Jiang, B.-j., Han, T.-f., et al. (2019). GmNMH7, a MADS-box transcription factor, inhibits root development and nodulation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Journal of Integrative Agriculture* 18(3), 553-562. doi: 10.1016/s2095-3119(18)61992-6.
- Madsen, E.B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., et al. (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(3), 404-417. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04431.x.

- Magne, K., George, J., Berbel Tornero, A., Broquet, B., Madueño, F., Andersen, S.U., et al. (2018). Lotus japonicus NOOT-BOP-COCH-LIKE1 is essential for nodule, nectary, leaf and flower development. *94*(5), 880-894. doi: 10.1111/tpj.13905.
- Maillet, F., Poinso, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., et al. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469(7328), 58-63. doi: 10.1038/nature09622.
- Mandel, M.A., and Yanofsky, M.F. (1995). A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature* 377(6549), 522-524. doi: 10.1038/377522a0.
- Mantelin, S., and Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot* 55(394), 27-34. doi: 10.1093/jxb/erh010.
- Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239(1), 15-27. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00368-6.
- Mao, G., Turner, M., Yu, O., and Subramanian, S. (2013). miR393 and miR164 influence indeterminate but not determinate nodule development. *Plant Signal Behav* 8(10), doi: 10.4161/psb.26753. doi: 10.4161/psb.26753.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., et al. (2007). Medicago truncatula NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* 144(1), 324-335. doi: 10.1104/pp.106.093021.
- Martin-Rodriguez, J.A., Leija, A., Formey, D., and Hernandez, G. (2018). The MicroRNA319d/TCP10 Node Regulates the Common Bean - Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Front Plant Sci* 9, 1175. doi: 10.3389/fpls.2018.01175.
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252, 11-23. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R., Spaink, H.P., Of Sautter, C., Rolfe, B.G., and Djordjevic, M.A. (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J* 14(1), 23-34. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00090.x.
- Melzer, R., Verelst, W., and Theissen, G. (2009). The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro. *Nucleic Acids Res* 37(1), 144-157. doi: 10.1093/nar/gkn900.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A., and Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* 40(12), 1489-1492. doi: 10.1038/ng.253.
- Messenguy, F., and Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1-21. doi: 10.1016/s0378-1119(03)00747-9.
- Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M. (2009). Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 50(7), 1232-1248. doi: 10.1093/pcp/pcp075.
- Miyahara, A., Hirani, T.A., Oakes, M., Kereszt, A., Kobe, B., Djordjevic, M.A., et al. (2008). Soybean nodule autoregulation receptor kinase phosphorylates two kinase-associated protein phosphatases in vitro. *J Biol Chem* 283(37), 25381-25391. doi: 10.1074/jbc.M800400200.

- Mortier, V., Den Herder, G., Whitford, R., Van de Velde, W., Rombauts, S., D'Haeseleer, K., et al. (2010). CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol* 153(1), 222-237. doi: 10.1104/pp.110.153718.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* 20(12), 1138-1143. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.035.
- Murai, K. (2013). Homeotic Genes and the ABCDE Model for Floral Organ Formation in Wheat. *Plants (Basel)* 2(3), 379-395. doi: 10.3390/plants2030379.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Murray, J.D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol Plant Microbe Interact* 24(6), 631-639. doi: 10.1094/MPMI-08-10-0181.
- Nishimura, R., Ohmori, M., Fujita, H., and Kawaguchi, M. (2002). A Lotus basic leucine zipper protein with a RING-finger motif negatively regulates the developmental program of nodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23), 15206-15210. doi: 10.1073/pnas.222302699.
- Nizampatnam, N.R., Schreier, S.J., Damodaran, S., Adhikari, S., and Subramanian, S. (2015). microRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *Plant J* 84(1), 140-153. doi: 10.1111/tpj.12965.
- Nova-Franco, B., Iniguez, L.P., Valdes-Lopez, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S.I., et al. (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol* 168(1), 273-291. doi: 10.1104/pp.114.255547.
- O'Rourke, J.A., Iniguez, L.P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S.S., Jackson, S.A., et al. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics* 15, 866. doi: 10.1186/1471-2164-15-866.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., et al. (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol* 50(1), 67-77. doi: 10.1093/pcp/pcn194.
- Olah, B., Briere, C., Becard, G., Denarie, J., and 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(2), 195-207. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11(4), 252-263. doi: 10.1038/nrmicro2990.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(7), 566-576. doi: 10.1038/nrm1424.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 45, 119-144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549.
- Ortega, J.L., Moguel-Esponda, S., Potenza, C., Conklin, C.F., Quintana, A., and Sengupta-Gopalan, C. (2006). The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. *Plant J* 45(5), 832-846. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02644.x.

- Páez-Valencia, J., Sánchez-Gómez, C., Valencia-Mayoral, P., Contreras-Ramos, A., Hernández-Lucas, I., Orozco-Segovia, A., et al. (2008). Localization of the MADS domain transcriptional factor NMH7 during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. *Plant Science* 175, 596-603.
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., et al. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 65(4), 622-633. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04447.x.
- Porch, T.G., Blair, M.W., Lariguet, P., Galeano, C., Pankhurst, C.E., and Broughton, W.J. (2009). Generation of a Mutant Population for TILLING Common Bean Genotype BAT 93. *American Society for Horticultural Science* 134(3), 348–355. doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.3.348>.
- Quiles, F.A., Galvez-Valdivieso, G., Guerrero-Casado, J., Pineda, M., and Piedras, P. (2019). Relationship between ureidic/amidic metabolism and antioxidant enzymatic activities in legume seedlings. *Plant Physiol Biochem* 138, 1-8. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.02.016.
- Quinto, C., de la Vega, H., Flores, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., et al. (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature* 299, 724-728. doi: <https://doi.org/10.1038/299724a0>.
- Reid, D.E., Ferguson, B.J., Hayashi, S., Lin, Y.H., and Gresshoff, P.M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Ann Bot* 108(5), 789-795. doi: 10.1093/aob/mcr205.
- Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T.H., Hill, B., and Pauls, K.P. (2020). Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation in Common Bean Production. *Front Plant Sci* 11, 1172. doi: 10.3389/fpls.2020.01172.
- Riechmann, J.L., and Meyerowitz, E.M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* 378(10), 1079-1101.
- Riechmann, J.L., Wang, M., and Meyerowitz, E.M. (1996). DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* 24(16), 3134-3141. doi: 10.1093/nar/24.16.3134.
- Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Blanco, F., and Zanetti, M.E. (2015). Annotation, phylogeny and expression analysis of the nuclear factor Y gene families in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Front Plant Sci* 5, 761. doi: 10.3389/fpls.2014.00761.
- Ripoll, J.J., Roeder, A.H., Ditta, G.S., and Yanofsky, M.F. (2011). A novel role for the floral homeotic gene APETALA2 during Arabidopsis fruit development. *Development* 138(23), 5167-5176. doi: 10.1242/dev.073031.
- Roberts, D.M., and Tyerman, S.D. (2002). Voltage-dependent cation channels permeable to NH⁽⁺⁾(4), K⁽⁺⁾, and Ca⁽²⁺⁾ in the symbiosome membrane of the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 128(2), 370-378. doi: 10.1104/pp.010568.
- Roche, P., Debelle, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., et al. (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67(6), 1131-1143. doi: 10.1016/0092-8674(91)90290-f.
- Rosendahl, L., Glenn, A.R., and Dilworth, M.J. (1991). "Organic and Inorganic inputs into legume root nodule nitrogen fixation.," in *Biology and Biochemistry of Nitrogen*

- Fixation.*, ed. A.G. MJ Dilworth. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers), 259-291.
- Sahay, N.S., and Varma, A. (1999). Piriformospora indica: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiol Lett* 181(2), 297-302. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08858.x.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., et al. (2007). NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in Lotus japonicus. *Plant Cell* 19(2), 610-624. doi: 10.1105/tpc.106.046938.
- Samach, A., and Coupland, G. (2000). Time measurement and the control of flowering in plants. *Bioessays* 22(1), 38-47. doi: 10.1002/(sici)1521-1878(200001)22:1<38::aid-bies8>3.0.co;2-l.
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* 5, 4983. doi: 10.1038/ncomms5983.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402(6758), 191-195. doi: 10.1038/46058.
- Schiessl, K., Lilley, J.L.S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P.C., et al. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in Medicago truncatula. *Curr Biol* 29(21), 3657-3668 e3655. doi: 10.1016/j.cub.2019.09.005.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N.H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., et al. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130(24), 6001-6012. doi: 10.1242/dev.00842.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., et al. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* 46(7), 707-713. doi: 10.1038/ng.3008.
- Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G., and Frugoli, J. (2005). The Medicago truncatula SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol* 58(6), 809-822. doi: 10.1007/s11103-005-8102-y.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Carroll, B.J., et al. (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science* 299(5603), 109-112. doi: 10.1126/science.1077937.
- Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A., and Oelmüller, R. (2007). A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus Piriformospora indica in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 50(1), 1-13. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03028.x.
- Sharma, M.P., Grover, M., Chourasiya, D., Bharti, A., Agnihotri, R., Maheshwari, H.S., et al. (2020). Deciphering the Role of Trehalose in Tripartite Symbiosis Among Rhizobia, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, and Legumes for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Microbiol* 11, 509919. doi: 10.3389/fmicb.2020.509919.
- Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229(1), 1-13. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x.

- Shrestha, A., Zhong, S., Therrien, J., Huebert, T., Sato, S., Mun, T., et al. (2021). Lotus japonicus Nuclear Factor YA1, a nodule emergence stage-specific regulator of auxin signalling. *New Phytol* 229(3), 1535-1552. doi: 10.1111/nph.16950.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M. (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe* 15(2), 139-152. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.011.
- Singh, S., Yadav, S., Singh, A., Mahima, M., Singh, A., Gautam, V., et al. (2020). Auxin signaling modulates LATERAL ROOT PRIMORDIUM1 (LRP1) expression during lateral root development in Arabidopsis. *101(1)*, 87-100. doi: 10.1111/tpj.14520.
- Smaczniak, C., Immink, R.G., Angenent, G.C., and Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139(17), 3081-3098. doi: 10.1242/dev.074674.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., et al. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308(5729), 1789-1791. doi: 10.1126/science.1111025.
- Smith, P.M., and Atkins, C.A. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol* 128(3), 793-802. doi: 10.1104/pp.010912.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and 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(3), e1003352. doi: 10.1371/journal.pgen.1003352.
- Soyano, T., Liu, M., Kawaguchi, M., and Hayashi, M. (2021). Leguminous nodule symbiosis involves recruitment of factors contributing to lateral root development. *Current Opinion in Plant Biology* 59. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.102000>.
- Soyano, T., Shimoda, Y., Kawaguchi, M., and Hayashi, M. (2019). A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus. *Science* 366(6468), 1021-1023. doi: 10.1126/science.aax2153.
- Springer, P.S., McCombie, W.R., Sundaresan, V., and Martienssen, R.A. (1995). Gene trap tagging of PROLIFERA, an essential MCM2-3-5-like gene in Arabidopsis. *Science* 268(5212), 877-880. doi: 10.1126/science.7754372.
- Ståldal, V., Cierlik, I., Chen, S., Landberg, K., Baylis, T., Myrenås, M., et al. (2012). The Arabidopsis thaliana transcriptional activator STYLISH1 regulates genes affecting stamen development, cell expansion and timing of flowering. *Plant Mol Biol* 78(6), 545-559. doi: 10.1007/s11103-012-9888-z.
- Streeter, J., and Wong, P.P. (1988). Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 7(1), 1-23. doi: 10.1080/07352688809382257.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., et al. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* 9(14), 1797-1810. doi: 10.1101/gad.9.14.1797.
- Tajini, F., Trabelsi, M., and Drevon, J.J. (2012). Combined inoculation with Glomus intraradices and Rhizobium tropici CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (Phaseolus vulgaris L.). *Saudi J Biol Sci* 19(2), 157-163. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.11.003.

- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., et al. (2013). Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol* 54(4), 433-447. doi: 10.1093/pcp/pct022.
- Tang, A., Haruna, A.O., Majid, N.M.A., and Jalloh, M.B. (2020). Potential PGPR Properties of Cellulolytic, Nitrogen-Fixing, Phosphate-Solubilizing Bacteria in Rehabilitated Tropical Forest Soil. *Microorganisms* 8(3). doi: 10.3390/microorganisms8030442.
- Tapia-Lopez, R., Garcia-Ponce, B., Dubrovsky, J.G., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, R.V., Kim, S.H., et al. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146(3), 1182-1192. doi: 10.1104/pp.107.108647.
- Timmers, A.C., Auriac, M.C., and Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126(16), 3617-3628.
- Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D.B., Abel, N.B., Reid, D.E., Madsen, L.H., et al. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science* 362(6411), 233-236. doi: 10.1126/science.aat6907.
- Turgeon, B.G., and Bauer, W.D. (1985). Ultrastructure of infection-thread development during the infection of soybean by Rhizobium japonicum. *Planta* 163(3), 328-349. doi: 10.1007/bf00395142.
- Turner, M., Nizampatnam, N.R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., et al. (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiol* 162(4), 2042-2055. doi: 10.1104/pp.113.220699.
- Udvardi, M., and Poole, P.S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64, 781-805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
- Vadassery, J., and 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(11), 1024-1027. doi: 10.4161/psb.4.11.9800.
- Van de Velde, W., Guerra, J.C., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., et al. (2006). Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in Medicago truncatula. *Plant Physiol* 141(2), 711-720. doi: 10.1104/pp.106.078691.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* 390(6657), 287-289. doi: 10.1038/36856.
- Vasse, J., de Billy, F., and Truchet, G. (1993). Abortion or infection during the Rhizobium meliloti- alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal* 4(3), 555-566.
- Vernié, T., Moreau, S., de Billy, F., Plet, J., Combier, J.P., Rogers, C., et al. (2008). EFD Is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 20(10), 2696-2713. doi: 10.1105/tpc.108.059857.

- Vieweg, M.F., Frühling, M., Quandt, H.J., Heim, U., Bäumlein, H., Pühler, A., et al. (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant Microbe Interact* 17(1), 62-69. doi: 10.1094/mpmi.2004.17.1.62.
- Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Rendon-Anaya, M., Hernandez-Onate, M., Minoche, A.E., Erb, I., et al. (2016). Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biol* 17, 32. doi: 10.1186/s13059-016-0883-6.
- Voisin, A.S., Munier-Jolain, N.G., and Salon, C. (2010). The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant Soil* 337, 99–412 doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0536-6>.
- Walshaw, D.L., Wilkinson, A., Mundy, M., Smith, M., and Poole, P.S. (1997). Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology (Reading)* 143 (Pt 7), 2209-2221. doi: 10.1099/00221287-143-7-2209.
- Wang, L., Sun, Z., Su, C., Wang, Y., Yan, Q., Chen, J., et al. (2019). A GmNINa-miR172c-NNC1 Regulatory Network Coordinates the Nodulation and Autoregulation of Nodulation Pathways in Soybean. *Mol Plant* 12(9), 1211-1226. doi: 10.1016/j.molp.2019.06.002.
- Wang, X., Pan, Q., Chen, F., Yan, X., and Liao, H. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza* 21(3), 173-181. doi: 10.1007/s00572-010-0319-1.
- Wang, Y., Li, K., Chen, L., Zou, Y., and Liu, H. (2015a). MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors GmARF8a and GmARF8b Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. 168(3), 984-999. doi: 10.1104/pp.15.00265.
- Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M.Y., et al. (2015b). Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Mol Genet Genomics* 290(2), 471-484. doi: 10.1007/s00438-014-0931-4.
- Weaver, R.W., and Frederick, L.R. (1972). A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia. *Plant Soil* 36, 219–222 doi: <https://doi.org/10.1007/BF01373474>.
- Weston, L.A., and Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol* 39(2), 283-297. doi: 10.1007/s10886-013-0248-5.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., De Bruijn, F.J., et al. (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant J* 23(1), 97-114. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00799.x.
- Yoro, E., Suzaki, T., and Kawaguchi, M. (2020). CLE-HAR1 Systemic Signaling and NIN-Mediated Local Signaling Suppress the Increased Rhizobial Infection in the daphne Mutant of *Lotus japonicus*. 33(2), 320-327. doi: 10.1094/mpmi-08-19-0223-r.
- Yu, L.H., Wu, J., Zhang, Z.S., Miao, Z.Q., Zhao, P.X., Wang, Z., et al. (2017). Arabidopsis MADS-Box Transcription Factor AGL21 Acts as Environmental Surveillance of

- Seed Germination by Regulating ABI5 Expression. *Mol Plant* 10(6), 834-845. doi: 10.1016/j.molp.2017.04.004.
- Zanetti, M.E., Blanco, F., Reynoso, M., and Crespi, M. (2020). To keep or not to keep: mRNA stability and translatability in root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 56, 109-117. doi: 10.1016/j.pbi.2020.04.012.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M. (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-Rhizobium etli symbiosis. *Plant Cell* 22(12), 4142-4157. doi: 10.1105/tpc.110.079137.
- Zawaski, C., Kadmiel, M., Ma, C., Gai, Y., Jiang, X., Strauss, S.H., et al. (2011). SHORT INTERNODES-like genes regulate shoot growth and xylem proliferation in Populus. *New Phytol* 191(3), 678-691. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03742.x.
- Zhang, M., and Su, H. (2020). Shoot-derived miR2111 controls legume root and nodule development. 44(5), 1627-1641. doi: 10.1111/pce.13992.
- Zhang, Y., Aono, T., Poole, P., and Finan, T.M. (2012). NAD(P)⁺-malic enzyme mutants of Sinorhizobium sp. strain NGR234, but not Azorhizobium caulinodans ORS571, maintain symbiotic N₂ fixation capabilities. *Appl Environ Microbiol* 78(8), 2803-2812. doi: 10.1128/aem.06412-11.
- Zuccherro, J.C., Caspi, M., and Dunn, K. (2001). ngl9: a third MADS box gene expressed in alfalfa root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 14(12), 1463-1467. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1463.