



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIO
TEMPORAL DEL GEN MtAGO5 DE *Medicago
truncatula* EN EL ESTABLECIMIENTO Y
DESARROLLO DE LA SIMBIOSIS
LEGUMINOSA-RIZOBIO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

**PRESENTA:
TOMÁS TONALTSINTLE ACEVEDO
SANDOVAL**

**DIRECTOR:
DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi familia, por estar conmigo

Agradecimientos

A el Dr. Oswaldo Valdés López, por su apoyo y comprensión durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Mariel Isidra Arellano, por apoyarme y enseñarme las técnicas que ocupé para mi proyecto.

A los integrantes de mi comité tutorial Dr. Gumercindo Honorato de la Cruz Guzmán, Dr. Juan Gerardo Ortiz Montiel, Dra. María del Rocío Reyer Saavedra y Mtro. Sergio Camacho Montiel, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

Resumen	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	4
1.El ciclo del nitrógeno	4
1.1 La simbiosis para la obtención de nutrientes	6
1.2 Los organismos diazótrofos	7
1.3 El complejo nitrogenasa.....	8
2. Fijación simbiótica de nitrógeno.	10
3. Establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio.....	16
4. Regulación genética de la simbiosis leguminosa-rizobio.....	22
5. La regulación postranscripcional	27
Antecedentes	33
1. El complejo AGO-miARN en el desarrollo de las plantas.....	33
2. Papel de los miRNAs en la simbiosis leguminosa-rizobio.....	35
3. AGO5 en la simbiosis leguminosa-rizobio.....	38
Hipótesis.....	40
Objetivos	40
Metodología.....	41
Resultados	43
Discusión.....	48
Conclusión.....	51
Literatura citada.....	52

Resumen

El estudio de la regulación de la simbiosis leguminosa-rizobio es de gran importancia para el desarrollo de técnicas de fertilización amigables con el medio ambiente. La regulación postranscripcional mediada por los complejos AGOs-miRNAs, ha demostrado ser una parte importante en el desarrollo de esta asociación simbiótica. Recientemente se evidenció que AGO5 participa en la regulación durante la infección, establecimiento y maduración de la simbiosis leguminosa-rizobio de tipo determinado. La presencia de nódulos indeterminados y determinados en la simbiosis leguminosa-rizobio invita a conocer las diferencias en el papel del gen *AGO5* durante las distintas etapas de su desarrollo. Esto brinda una oportunidad para comprender mejor su función en este proceso. En este trabajo se evaluó la expresión espaciotemporal del gen *AGO5* a nivel morfológico durante el proceso de simbiosis indeterminada en *Medicago truncatula*. Se comparó la expresión espaciotemporal de *AGO5* en los nódulos indeterminados con la expresión de *AGO5* previamente reportada en nódulos determinados en el modelo *Lotus japonicus*. Se encontró que existe una correspondencia en los patrones de expresión de *AGO5* en los nódulos determinados e indeterminados durante los eventos tempranos de simbiosis, como la infección a través del hilo de infección y las primeras divisiones en el córtex. Sin embargo, durante la maduración se encontraron diferencias en los patrones de expresión: en los nódulos indeterminados se mantuvo la presencia de *AGO5* en la región apical meristemática, dedicada a la renovación de las capas celulares del nódulo mientras que en los nódulos determinados la expresión disminuía mientras alcanzaban la madurez. Se concluyó que *AGO5* es un componente que participa tanto en la simbiosis leguminosa-rizobio de tipo indeterminado como determinado y las diferencias observadas entre los nódulos determinados se deben a las diferencias en el programa de desarrollo de los tejidos (zona meristémica, zona de infección, zona de fijación de nitrógeno y zona de senescencia) que presentan los nódulos indeterminados.

Introducción

El nitrógeno (N) es un macroelemento esencial para la síntesis del ADN, RNAs, proteínas y diversos metabolitos nitrogenados. A pesar de que se encuentra en grandes cantidades en forma gaseosa en la atmósfera, este elemento no es accesible para la mayoría de los organismos vivos, debido a que el N_2 posee enlaces altamente estables que requieren una gran cantidad de energía para poder romperlos. Frente al uso intensivo de fertilizantes sintéticos que contaminan los suelos y los cuerpos de agua, el uso de los microorganismos diazotróficos han cobrado gran importancia ya que han permitido satisfacer la demanda de nitrógeno y mantener un equilibrio en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Młodzińska et al., 2015; Ribbe et al., 2022).

Las cianobacterias y la simbiosis leguminosa-rizobio son los grupos que contribuyen con más de dos tercios del nitrógeno biodisponible (Mus et al., 2019). Se estima que los diazotófos de vida libre fijan entre 30 y 140 millones de toneladas de nitrógeno por año, mientras que la simbiosis leguminosa-rizobio aporta aproximadamente de 40 a 170 millones de toneladas de nitrógeno por año (Campillo R. et al., 2003). Dentro de las leguminosas (familia Fabaceae) se encuentran plantas con un alto contenido proteico importantes para garantizar la seguridad alimentaria mundial, el establecimiento de la simbiosis leguminosa rizobio es un proceso complejo que requiere una gran inversión energética y riesgo por parte de la planta, la capacidad de entablar simbiosis con múltiples microorganismos les ha permitido tener un éxito evolutivo a pesar de los costos. El nódulo simbiótico es un órgano especializado que deriva de los programas genéticos del desarrollo de la raíz, de hecho, los nódulos menos sofisticados presentan características morfológicas semejantes a las raíces. Los nódulos leguminosa-rizobio se clasifican en dos grupos indeterminados y determinados, dependiendo de las características morfológicas que presentan. Aunque se conocen a grandes rasgos los componentes que rigen los programas de desarrollo general de ambos tipos de nódulos de leguminosa-rizobio aún se desconocen sus particularidades.

La regulación postranscripcional tiene una gran importancia en los programas de desarrollo. En las plantas se ha demostrado que los complejos AGO-miRNAs forman parte importante en la morfogénesis de los distintos órganos aéreos y radiculares. En el desarrollo de la raíz y del nódulo están involucrados distintos tipos de miRNAs que tienen como objetivos a genes involucrados en la génesis de pared celular y la defensa contra patógenos (Reyero-Saavedra et al., 2017; Valdés-López et al., 2019). Recientemente se pudo constatar que AGO5 participa en la regulación durante la infección, establecimiento y maduración de la simbiosis leguminosa-rizobio de tipo determinado (Sánchez-Correa et al., 2022). El estudio de AGO5 en el desarrollo de la simbiosis de tipo indeterminado es importante para conocer el papel que tiene AGO5 en el programa general de simbiosis.

Marco teórico

1. El ciclo del nitrógeno

La industria agroalimentaria ha permitido el aumento de la cantidad y calidad de los alimentos para la humanidad, brindando beneficios que se reflejan en el creciente nivel de salud y esperanza de vida experimentada durante el último siglo. Particularmente el desarrollo del método Haber-Bosch para la síntesis de los fertilizantes nitrogenados permitió a principios del siglo XX superar significativamente el rendimiento de los cultivos (X. Zhang et al., 2020) que antes se encontraban limitados por el ritmo natural de fijación de N atmosférico o la limitada cantidad de fertilizantes naturales que se podían extraer en el mundo (guano). La producción de fertilizantes nitrogenados mediante el proceso Haber-Bosch representa el 1.4% de las emisiones globales de dióxido de carbono y consume el 1% de la producción total de energía del mundo (Kyriakou et al., 2020). La implementación de fertilizantes sintéticos permitió la expansión y continuo uso de prácticas agrícolas orientadas al monocultivo intensivo que soportan la creciente demanda de alimentos a nivel mundial, pero el mantenimiento en la dinámica de introducción de nitrógeno antropogénico en los sistemas terrestres y marinos ha perturbado su ciclo global, lo cual ha traído costos significativos para el medio ambiente y la salud humana (Figura 1) (Zhang et al., 2020).

El uso ineficiente y generalizado en la fertilización química es donde se genera la mayor cantidad de daño al ambiente, ya que un gran porcentaje del fertilizante se pierde en el agua y suelo que posteriormente causa eutrofización en los cuerpos de agua dulce y costeros, mientras que promueve aún más el consumo de estos suplementos, lo que causa un mayor deterioro de las condiciones del suelo (Figura 1). El exceso de nitrógeno antropogénico es transportado por las corrientes de agua superficiales y subterráneas, al llegar a estos cuerpos de agua y no encontrarse almacenado o desnitrificado es aprovechado por algas de rápido crecimiento que dañan el ecosistema al agotar el O₂ disuelto también se desencadena la proliferación bacterias anaerobias, así como el aumento de CO₂ que acidifican el

entorno (Figura 1). En su conjunto, estos fenómenos provocan la contaminación del agua, la muerte de peces, artrópodos y ha mermado significativamente las redes microbianas asociadas al ciclo del nitrógeno, en su conjunto ha alterado la dinámica de las cadenas tróficas (Kuypers et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Actualmente, de acuerdo con el Banco Mundial, poco más de la mitad de la población mundial depende del uso de fertilizantes sintéticos, esto evidencia el riesgo medioambiental, así como a las catástrofes humanitarias que se puedan desencadenar por su el uso extensivo de fertilizantes al que nos enfrentamos. Por estas razones es imperativo buscar nuevas soluciones más eficientes y amigables con el medio ambiente que puedan sustituir a los fertilizantes sintéticos. En este sentido, la comprensión de la dinámica asociada a la microbiota del suelo y de las raíces de las plantas cobra una especial importancia, ya que nos ha permitido conocer con mayor detenimiento las distintas asociaciones que se entablan para la obtención de macro y micronutrientes en condiciones óptimas y de estrés, en consecuencia, se están abriendo distintas brechas para la aplicación de fertilizantes basados en microbiología.

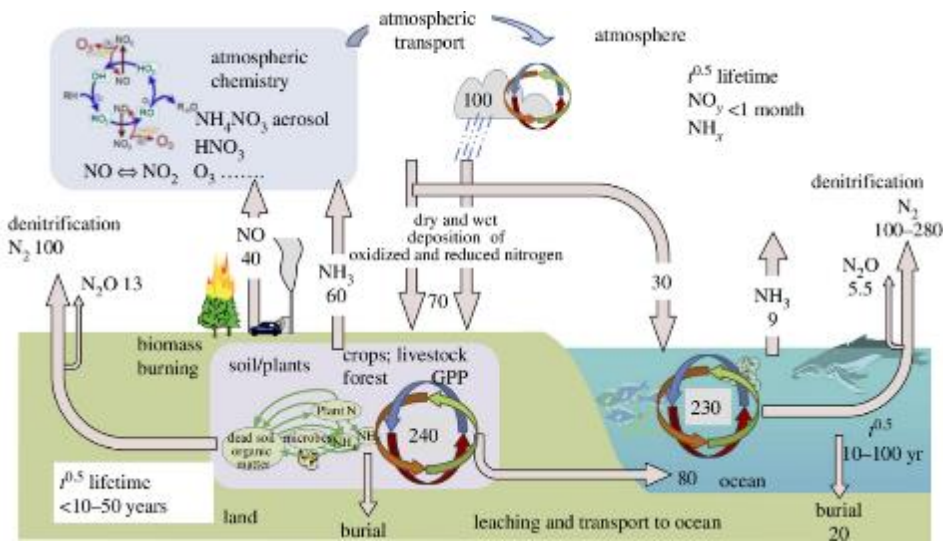


Figura 1. El procesamiento y los flujos de nitrógeno reactivo en los sistemas terrestres y marinos y en la atmósfera (Tg N año⁻¹). El nitrógeno antropogénico altera las tasas de flujo del nitrógeno que dependen de las transformaciones entre los reservorios. El nitrógeno antropogénico eutrofiza las aguas creando enormes zonas hipóxicas alterando los ciclos biogeoquímicos. Figura tomada de Fowler et al., 2013. *Biological sciences*, 368

1.1 La simbiosis para la obtención de nutrientes

Las plantas interactúan constantemente con microorganismos del suelo, con las cuales establecen asociaciones perjudiciales, como las asociaciones patogénicas que pueden causar enfermedades; y beneficiosas, como las asociaciones simbióticas que les proporcionan resistencia a condiciones adversas y nutrientes esenciales (Moran, 2006). La relación simbiótica entre las plantas y los microorganismos implica una interacción íntima a nivel fisiológico y metabólico que proporciona ventajas adaptativas para ambos socios simbióticos (Figura 2) ya que les permite optimizar la absorción de nutrientes, protegerse contra patógenos y depredadores en condiciones ambientales adversas, lo cual aumenta significativamente su supervivencia al garantizar su salud y crecimiento (Zeng et al., 2022). Los microorganismos simbióticos, como son los hongos y las bacterias, optimizan el metabolismo de las plantas debido a que facilitan la absorción de nutrientes esenciales inaccesibles (Figura 2), a cambio, las plantas proporcionan carbono fotosintético y crean un entorno propicio para el microorganismo (Ruffel et al., 2008). La interacción entre las plantas y los simbiontes fúngicos/bacterianos es mutuamente beneficiosa y ha desempeñado un papel fundamental en la historia evolutiva de las plantas. Se ha encontrado evidencia de que estos socios microbianos han sido coparticipes del éxito adaptativo de las plantas para colonizar una variedad de hábitats (El Amrani, 2022; Moran, 2006).

La simbiosis con hongos

Las simbiosis micorrícicas se clasifican en dos tipos principales: arbusculares y ectomicorrízicas. La simbiosis arbuscular (AM) se originó en un evento único hace aproximadamente 460 millones de años, es la más común y se establece entre los hongos del filo Glomeromycota con aproximadamente el 70% de todas las plantas superiores (Brundrett & Tedersoo, 2018). La simbiosis ectomicorrízica (ECM) ha surgido varias veces de forma independiente y su aparición se calcula hace 150 millones de años aproximadamente, se establecen entre los filos de hongos

Ascomycota, Basidiomycota o Mucoromycota con el 2% de las plantas superiores, principalmente las plantas leñosas gimnospermas (Strullu-Derrien et al., 2018).

1.2 Los organismos diazotrofos

Un diazotrofo es un organismo que pueden fijar el nitrógeno atmosférico de forma independiente o mediante una asociación simbiótica con otras plantas o animales. La reducción de nitrógeno atmosférico requiere del complejo nitrogenasa, que se encarga de catalizar la reducción biológica del dinitrógeno (N_2) y está exclusivamente en los dominios; Bacteria y Archaea (Mus et al., 2019) (Rutledge & Tezcan, 2020). La nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno (O_2), por lo que

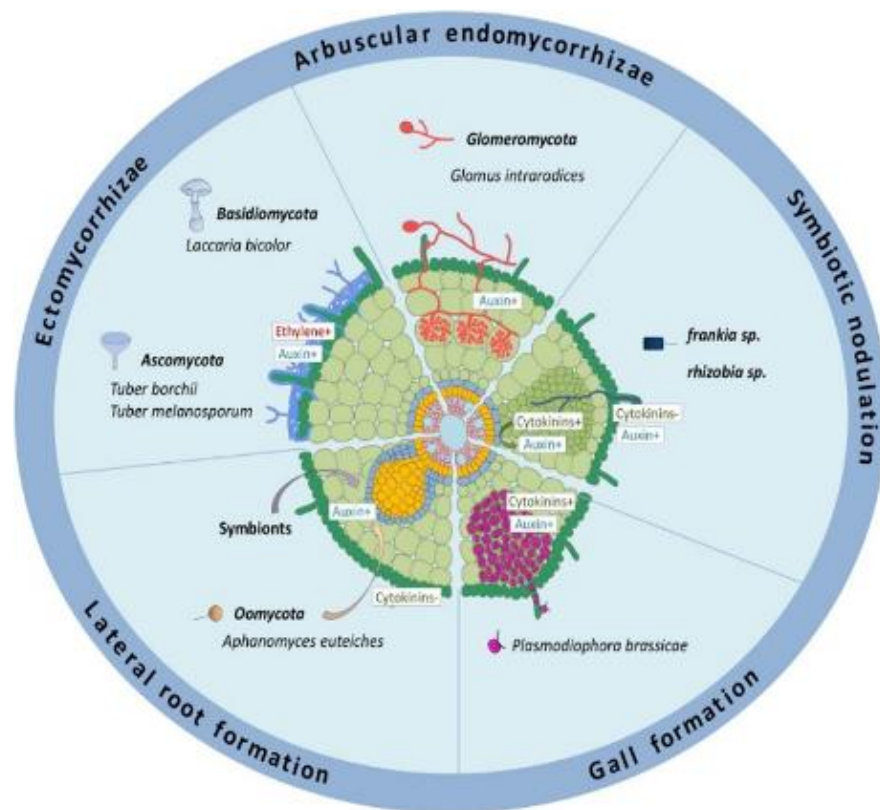


Figura 2. Interacciones en el sistema radicular de diferentes especies de plantas y el papel de las auxinas y citoquininas: ectomicorrizas, endomicorrizas arbusculares, nodulación simbiótica en leguminosas (Rhizobia) o plantas actinorrhiza (Frankia), agallas formadas en las raíces de algunas plantas Brassicaceae, el efecto de los simbiontes y patógenos oomicetos sobre el desarrollo de las raíces laterales. Figura tomada de Boivin et al., 2016. *Frontiers in plant science*, 7(num. 1240).

requiere de niveles de O_2 y N_2 perfectamente controlados, además su actividad también precisa de una importante inversión de energía (16 moles de ATP para reducir un mol de nitrógeno) y un donante de electrones (Lindström & Mousavi, 2020). A pesar de que la fijación de nitrógeno impone importantes restricciones fisiológicas, los microorganismos diazotófos se encuentran extendidos en una amplia variedad de hábitats tanto de vida libre o en asociaciones simbióticas con algas, plantas vasculares o no vasculares y animales (Dixon & Kahn, 2004; Mus et al., 2016). Los diazotófos de vida libre incluyen arqueas quimiolitótrofas (Nitrososphaera, Nitrosocaldus o Nitrosopumilus), bacterias anaerobias (*Clostridium* o *Desulfovibrio*) y cianobacterias (Mistry et al., 2022). Los diazotófos simbióticos incluyen rizobios (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*), frankia, nostoc (*Anabaena azollae*) y *Wolbachia* (Kumar et al., 2010).

Los microbios diazotróficos contribuyen con más de dos tercios del nitrógeno biodisponible en la biosfera (Mus et al., 2019). Las cianobacterias y la simbiosis leguminosa-rizobio son los grupos que más contribuyen porcentualmente a este total. Se estima que los diazotófos de vida libre fijan entre 30 y 140 millones de toneladas de nitrógeno por año, mientras que la simbiosis leguminosa-rizobio aporta, dependiendo de factores ambientales y geográficos, entre 50-300 kg de nitrógeno por hectárea por año (Campillo et al., 2003) que equivale a entre 40 y 170 millones de toneladas de nitrógeno por año.

1.3 El complejo nitrogenasa

Los microorganismos diazotófos pueden reducir el N_2 atmosférico a NH_3 , este proceso lo llevan a cabo el complejo enzimático nitrogenasa (Figura 3) y al proceso se le denomina fijación biológica del nitrógeno (Lindström & Mousavi, 2020). Las enzimas nitrogenasas son metaloenzimas con características estructurales conservadas, se compone por una subunidad dinitrogenasa reductasa que se encarga de la transferencia de electrones, así como por heterodímero dinitrogenasa compuesto de las subunidades α y β (Figura 3) (Einsle & Rees, 2020). Estas subunidades son codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK*, respectivamente

(Garcia et al., 2020). Para que este complejo enzimático lleve a cabo su actividad catalítica es necesario la entrada de 13 ATP por cada molécula de N_2 (Ribbe et al., 2022). Hasta la fecha se han identificado tres nitrogenasas homologas denominadas por el tipo de heterometal en sus respectivos cofactores Mo, V y Fe (Kuypers et al., 2018; Mus et al., 2019). La Mo-nitrogenasa es el miembro mejor caracterizado de esta familia y se constituye de dos metaloproteínas, por un lado, la proteína de hierro (Fe) y la proteína de molibdeno-hierro (Mo-Fe). En el caso de las nitrogenasas alternativas homólogas el clúster es ocupado por el vanadio (V-Fe) y el hierro (Fe-Fe) (Figura 3) (Einsle & Rees, 2020). La mayoría de los microorganismos diazotróficos viven en asociación simbiótica con eucariotas. Entre estas asociaciones simbióticas destaca la que se lleva a cabo entre cianobacterias unicelulares (*Atelocyanobacterium thalassa*) asociadas con algas unicelulares (*Braarudosphaera bigelowii*) ya que son uno de los fijadores de nitrógeno más extendidos y tienen un papel clave en la fijación del nitrógeno marino (Kuypers et al., 2018). Por otro lado, en el medio terrestre bacterias del orden Rhizobiales (rizobios) se asocian simbióticamente con las plantas del orden Fabaceae (leguminosas), dentro de este último grupo se encuentran plantas importantes para garantizar la seguridad alimentaria mundial, ya que contienen entre un 25-40% de proteínas,

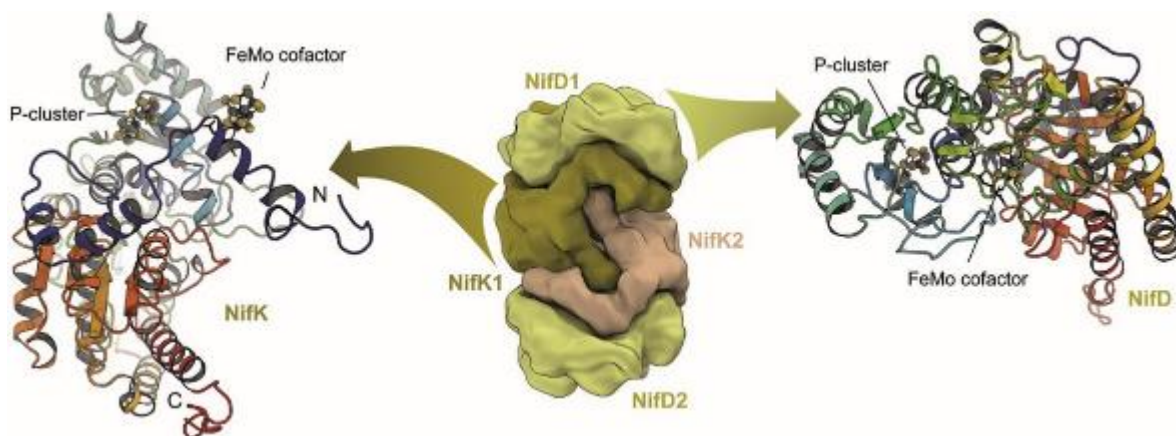


Figura 3. Arquitectura de la proteína Mo-Fe de la nitrogenasa de molibdeno NifDK (PDB 3U7Q). El componente dinitrogenasa es un NifD₂K₂ heterotetrámero que contiene un conjunto de dos grupos complejos de hierro-azufre en cada dímero $\alpha\beta$. Mientras que el cúmulo P de transferencia de electrones [8Fe:7S] se encuentra en la interfaz de NifD y NifK, el cofactor Fe-Mo del sitio activo, una fracción única [Mo:7Fe:9S:C]:homocitrato, está enterrada dentro de NifD. Figura tomada de Einsle & Rees, 2020. Chemical reviews, 120(pág. 4969–5004).

algunos ejemplos son: la alfalfa (*Medicago sp.*), el frijol (*Phaseolus sp.*), chícharo (*Pisum sp.*) y la soya (*Glycine sp.*) (Jha et al., 2022).

2. Fijación simbiótica de nitrógeno.

Dentro del grupo de organismos que fijan el nitrógeno atmosférico se encuentran aquellos microorganismos que entablan endosimbiosis, como lo son las cianobacterias del género *Nostoc* y *Anabaena* que se asocian con plantas vasculares como *Gunnera sp.* y *Azolla sp.* respectivamente y no vasculares como, *Anthoceros sp.* en caso de *Nostoc* (Figura 4), y los dos grupos de bacterias (frankia y rizobio) que se asocian a un grupo monofilético de plantas superiores conocido como clado fijador de nitrógeno y que forman una estructura endosimbiótica derivada de la región radicular que es denominada nódulo (Berckx et al., 2022; Mus et al., 2016). Las bacterias frankia (*Frankia sp.*) son un género de bacterias filamentosas, gram-positivas que se asocian simbióticamente con el grupo de

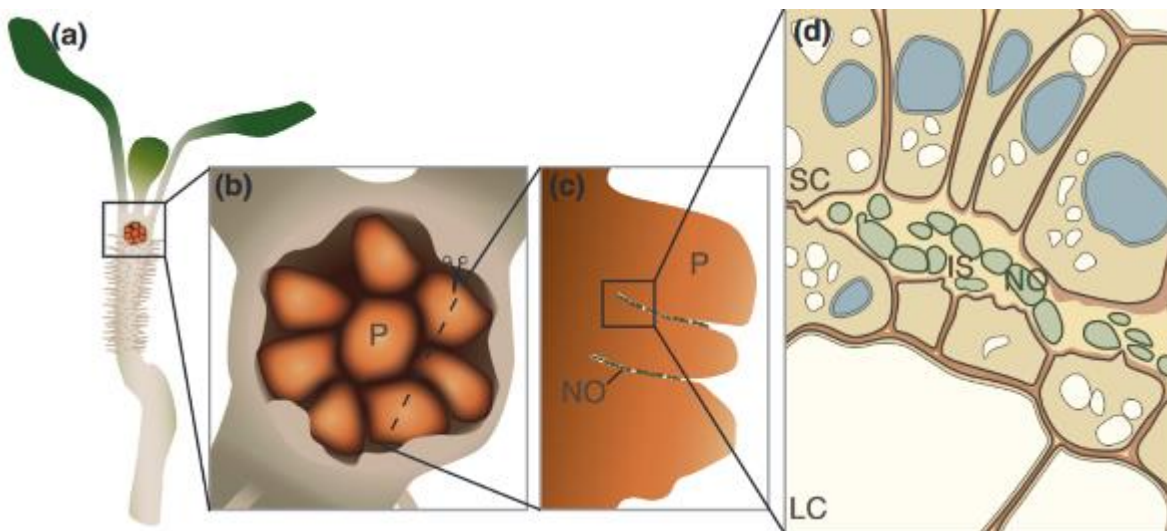


Figura 4. Modelo simbiótico de bacterias *Nostoc sp.* en células vegetales de *Gunnera sp.* (angiosperma de la familia Gunneraceae). La endosimbiosis *Gunnera-Nostoc* (a) se desarrolla una estructura llamada glándula (b) la cual contiene protuberancias en forma de dedos llamadas papilas (c) en las cuales se encuentran las hormogonias de las cianobacterias *Nostoc* la cuales están apretadas en canales formados entre las células de la planta huésped (d). Abreviaturas: papilas(P), *Nostoc* (NO), espacio intercelular (IS), células pequeñas (SC). Estos dibujos se basan en imágenes publicadas por Johansson y Bergmann. Figura tomada de Parniske, 2018. *Current opinion in plant biology*, 44(pág. 164–174).

plantas parafiléticas conocidos como actinorrizas, estas plantas son angiospermas dicotiledóneas de tres órdenes Cucurbitales, Fagales y Rosales (Pawlowski & Demchenko, 2012). El término “Rizobio” hace referencia a un grupo de bacterias gram negativas que pertenecen a los grupos α -proteobacterias (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*) y β -proteobacteria (*Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum*) que son capaces de entablar una relación simbiótica con las plantas del orden Fabales comúnmente conocidas como leguminosas. Ambos grupos forman, durante dichas asociaciones, estructuras especializadas para fijar el nitrógeno atmosférico en las raíces o tallos de las plantas hospedantes (Lindström & Mousavi, 2020; Sharma et al., 2020).

2.1 Nódulo simbiótico de leguminosa-rizobio

Los nódulos simbióticos son órganos especializados que se derivan de las raíces de las plantas hospederas que están adaptados para alojar a las bacterias fijadoras de nitrógeno (Lebedeva et al., 2021). En estos nódulos, la planta ofrece un ambiente propicio y suministra ácidos orgánicos como el malato y succinato derivados de la fotosíntesis al rizobio, a cambio, el rizobio desencadena la conversión del nitrógeno atmosférico en una forma reducida que la planta puede absorber y utilizar como nutriente esencial. Los dos grupos de bacterias, frankia y rizobios con sus respectivas plantas huéspedes, desarrollan dos tipos de nódulos. Los nódulos simbióticos de actinorriza-frankia presentan diferencias significativas en el desarrollo y estructura a sus contrapartes de leguminosas, de forma simplificada se puede afirmar que su morfología muy parecida a la de las raíces, con un haz vascular en el centro y con los simbioses distribuidos en su perímetro (Figura 5) (Berckx et al., 2022; Pawlowski & Demchenko, 2012). Los nódulos simbióticos de leguminosa-rizobio presentan una morfología más compleja, tienen dos haces vasculares que flanquean un centro en el cual se encuentran contenidos los simbioses, entre otras características (Yang et al., 2022). Los nódulos simbióticos que desarrollan las leguminosas tienen características morfológicas adaptadas para albergar los simbioses (Figura 5). El nódulo simbiótico es un órgano especializado

que se ha desarrollado a lo largo de millones de años, esta relación simbiótica ha evolucionado y se ha perfeccionado y ha resultado en una asociación altamente especializada que brinda a las leguminosas una ventaja nutricional significativa. Sin embargo, cuando hay suficiente nitrógeno biodisponible en los suelos, la simbiosis de leguminosas se inhibe y las plantas satisfacen su demanda de N como el resto

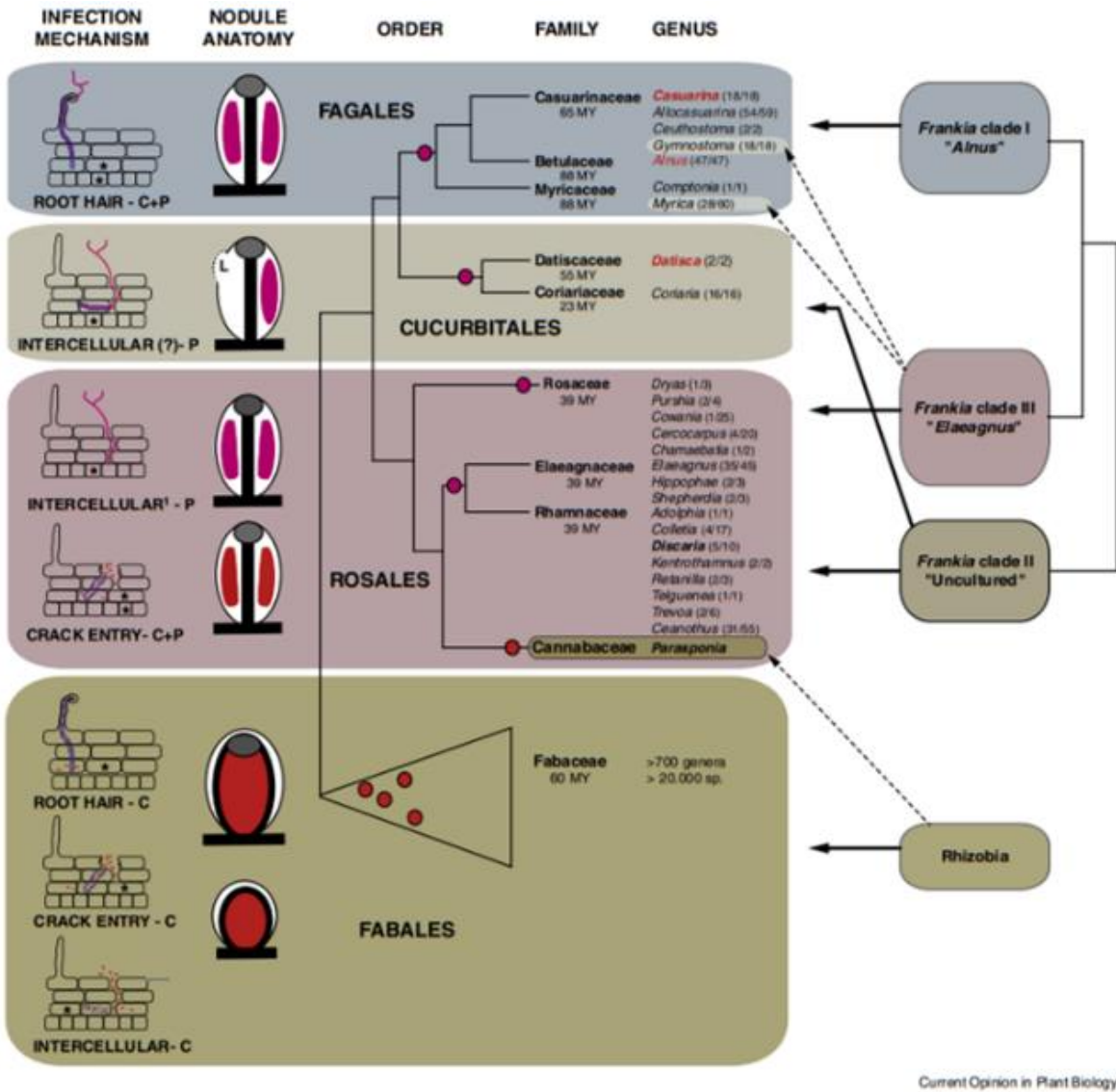


Figura 5. Filogenia de las familias de plantas del clado fijador de nitrógeno que son capaces de formar simbiosis con cepas Frankia correspondientes. Las flechas sólidas muestran la amplia correspondencia entre los órdenes de plantas y los clados de Frankia; Las flechas discontinuas muestran asociaciones excepcionales. Los círculos indican los supuestos orígenes evolutivos de la nodulación actinorrhiza (rosa) o rizobiana (rojo). Figura tomada de Svistoonoff et al., 2014. *Current opinion in plant biology*, 20(pág. 11–18).

de plantas (Lepetit & Brouquisse, 2023). Esto se debe a que los nódulos consumen una alta cantidad de energía en proporción con su tamaño, ya que la fijación del dinitrógeno, el mantenimiento del nódulo funcional lo cual implica la translocación del amoníaco (NH_3) amonio (NH_4^+) y los azúcares de la fotosíntesis y el mantener un control fino de la respuesta inmunitaria implican altos costos (Lepetit & Brouquisse, 2023). Por otro lado, el desarrollo del nódulo no es un proceso sencillo ya que deben ocurrir adaptaciones-cambios morfológico-moleculares exclusivas que abarca desde la detección del simbionte adecuado, la infección, la organogénesis y el mantenimiento en condiciones óptimas del nódulo simbiótico (Chaulagain & Frugoli, 2021). La simbiosis leguminosa-rizobio confiere de una serie de ventajas en suelos pobres en nitrógeno y cumplen un importante rol ecológico, no obstante, para asegurar que su desarrollo sea exitoso y cumpla con un óptimo funcionamiento se debe cumplir una serie de requisitos que involucran, la compatibilidad del rizobio a nivel morfológico y molecular (Jha et al., 2022).

2.2 Tipos de nódulos simbióticos en leguminosa-rizobio

Hay dos tipos principales de nódulos simbióticos: determinados e indeterminados (Figura 6), la formación del tipo de nódulo que se forma está determinada por la especie de leguminosa y la cepa de rizobio con la cual se entabla la relación simbiótica. Por ejemplo, los nódulos determinados son más comunes en las leguminosas nativas de las regiones tropicales, mientras que los nódulos indeterminados son más comunes en las leguminosas nativas de las regiones templadas. Los dos tipos de nódulos comparten en esencia el programa genético que orchestra su desarrollo, lo cual no implica que ambos sigan pautas idénticas del desarrollo. Las similitudes morfológicas son; un par de haces vasculares periféricos y una masa central de células, en su mayoría infectadas, donde ocurre la fijación de nitrógeno (Figura 6). Sin embargo, también tienen diferencias principalmente en las capas celulares corticales responsables de la formación del primordio del nódulo y en la organización espacial de los tejidos del nódulo (Figura 10) (Kohlen et al., 2018; Sprent, 2007). En los nódulos indeterminados, los procesos de infección, fijación de

nitrógeno y la senescencia de los simbiosomas se encuentran espacialmente separados en capas de células especializadas, en los nódulos determinados, no existe tal separación espacial, y estas funciones ocurren en proximidad física en todo el nódulo (Figura 6) (Kohlen et al., 2018; S. Liu et al., 2020). La formación de ambos tipos de nódulos involucra la remodelación de citoesqueleto, la pared celular y la membrana celular así como la reprogramación de células corticales y pasa por las siguientes etapas: cámara de infección, el hilo de infección y las gotas de infección (Kitaeva et al., 2021; Zhang et al., 2019).

2.1.1 Los nódulos determinados

Los nódulos determinados se caracterizan por su forma globular y su pequeño tamaño y a diferencia de los nódulos indeterminados, carecen de un meristemo persistente (Figura 6). En estos nódulos, los primeros eventos de división celular ocurren en la corteza media o externa, este nuevo grupo de células diferenciadas son posteriormente alcanzadas por el hilo de infección, formando así las estructuras conocidas como simbiosomas (Kohlen et al., 2018). En un nódulo determinado maduro, la mayoría de los simbiosomas presentan la misma etapa de desarrollo, y

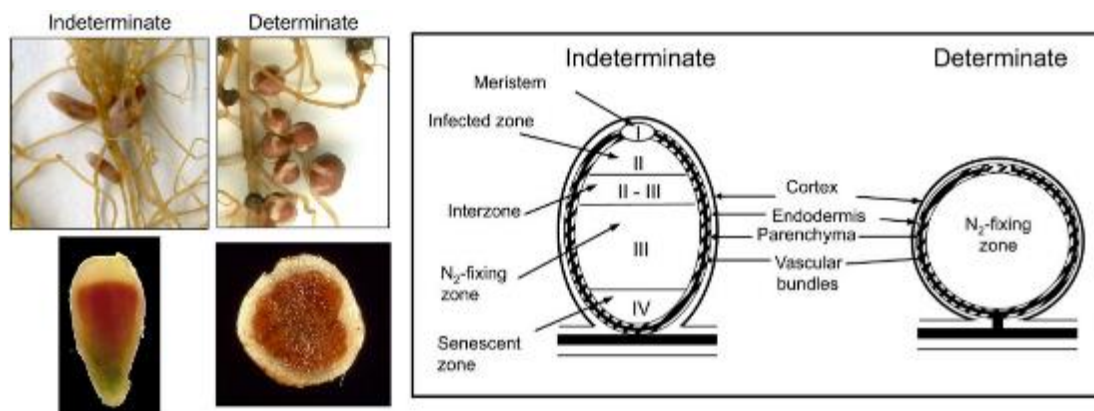


Figura 6. Izquierda: imágenes de raíces con nódulos y cortes sagitales de nódulos determinados e indeterminados (se puede observar la coloración rojiza característica de que indica que son funcionales). Derecha: representación esquemática de las principales características que diferencian los nódulos indeterminados y determinados "clásicos" (modificado de Hirsch, 1992). I zona meristémica; II, zona de infección; III, zona de fijación de nitrógeno; IV, zona de senescencia. Figura tomada de Larrainzar et al., 2020. *The New phytologist*, 228(pág. 472–484)

los bacteroides adoptan una forma de bastoncillo característico de los rizobios de en vida libre. Esta característica se debe a la ausencia de un meristemo persistente que pueda generar nuevas células infectadas para reemplazar las viejas (Booth et al., 2021; Ferguson et al., 2010). En este tipo de nódulo la diferenciación celular de las células infectadas comienza temprano en el desarrollo y cuando culmina la vida útil de estas células entran en senescencia simultáneamente, y si la necesidad de fijación de nitrógeno se mantiene se forman nuevos nódulos en raíces adicionales (Ferguson et al., 2010; Mergaert, 2020).

2.1.2 Los nódulos indeterminados.

Los nódulos indeterminados se caracterizan por su forma cilíndrica y por la presencia de un meristemo persistente (Figura 6). En este tipo de nódulos, los primeros eventos de división celular ocurren en el periciclo, la endodermis y la corteza interna, las primeras dos capas dan lugar a la parte basal y la última al meristemo del primordio del nódulo (Franssen et al., 2015; Kitaeva et al., 2021). El meristemo, que se forma en la parte superior del primordio, genera las células que serán posteriormente infectadas por los rizobios y se diferenciarán en simbiosomas funcionales a lo largo de un gradiente conforme el nódulo continúa creciendo. Los simbiosomas de los nódulos indeterminados presentan una mayor diferenciación a diferencia de sus contrapartes de crecimiento determinado ya que presentan bacteroides alargados, ramificados o esféricos (Dupont et al., 2012). En la madurez, los nódulos indeterminados se caracterizan por una organización especializada de sus tejidos y una población heterogénea de bacteroides en diversas etapas de desarrollo (Figura 6). Se pueden distinguir cuatro zonas bien definidas desde el meristemo; 1) Zona de infección: en donde las células dejan de dividirse debido a la penetración de los hilos de infección, 2) Zona de transición: aquí el tejido que contiene bacteroides atraviesa las etapas finales de diferenciación, 3) Zona de fijación: es la región central del nódulo en la cual se encuentran los simbiosomas con los respectivos bacteroides, estas formas en estado simbióticos son capaces catalizan activamente la reducción de del N_2 a NH_4^+) Zona de senescencia: en

donde los bacteroides ya no pueden fijar nitrógeno y se degradan (Figura 6) (Kohlen et al., 2018). La ventaja clave del meristemo persistente en los nódulos indeterminados es su capacidad para mantener un crecimiento continuo y regenerarse a lo largo de la vida de la planta mediante divisiones celulares continuas y la infección secuencial, lo que permite renovar los simbiosomas y prolongar la capacidad de fijación de nitrógeno (Mergaert, 2020)

3. Establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio

3.1 Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular marca el punto de partida en el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio. En esta etapa inicial ocurre un intercambio de señales moleculares entre ambas partes. Las raíces de las plantas leguminosas liberan flavonoides e isoflavonoides, mientras que los rizobios producen lipoquitooligosacáridos rizobiales conocidos como factores de nodulación (NF). Estas señales bioquímicas actúan como mensajeros que revelan la compatibilidad que existe entre ambos socios simbióticos. En el pelo radicular de la planta, los NF son detectados y desencadenan una compleja cascada de señalización que pone en marcha y coordina el proceso de infección y la organogénesis del nódulo (Ferguson et al., 2010).

3.2 Infección rizobial

La infección de la raíz de la leguminosa por el rizobio consiste en la entrada de los rizobios al interior de células de la raíz que darán origen al nódulo y en donde fijarán nitrógeno atmosférico. La infección exitosa es crucial para establecer y mantener una asociación simbiótica. Durante el proceso de infección se desencadena la remodelación del citoesqueleto, la membrana y la pared celular ya que se deben de desarrollar estructuras especializadas como el pelo radical, y el hilo de infección (Figura 7) (Kitaeva et al., 2021). En resumen, se pueden destacar los siguientes

eventos clave en el proceso de infección: la célula epidermal se debe de modificar para extenderse en el conocido pelo radicular, esto es importante ya que después el pelo radicular se riza y contiene a las bacterias que después se trasladaran en el hilo de infección hasta las células meristemáticas donde son liberadas (Figura 7) (Tsyganova & Tsyganov, 2018).

3.3 Formación de la Cámara de infección

El proceso de infección comienza cuando las bacterias rizobios se adhieren al pelo radicular, lo que provoca la deformación de este último y la formación de una estructura en forma de rizo que atrapa a una sola unidad formadora de colonias rizobiales. La multiplicación activa de este único rizobio da lugar a la formación de una microcolonia que penetra gradualmente en el interior de pelo radicular conforme

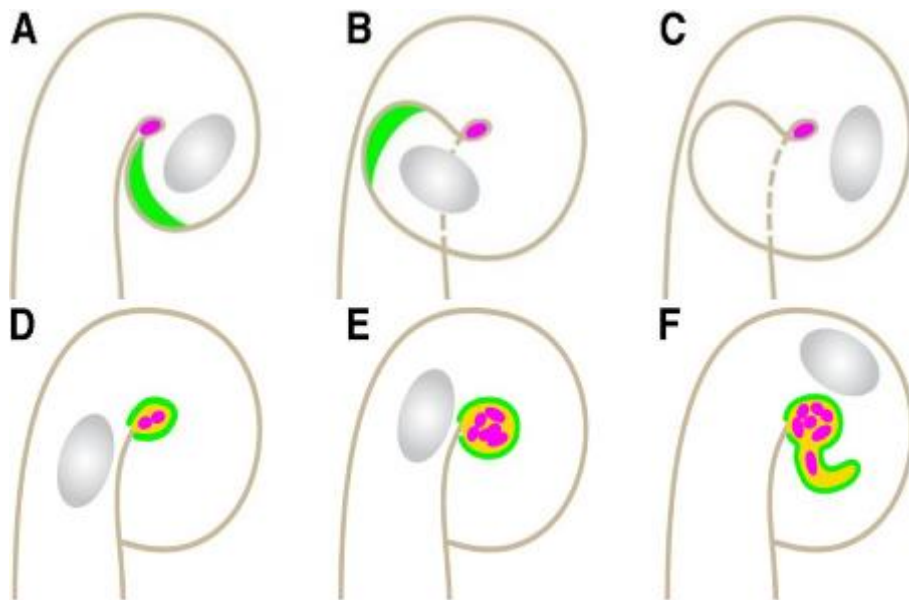


Figura 7. Captura del rizobio por parte del pelo radicular, la posterior remodelación de la cámara de infección y el inicio del hilo de infección. También se esquematiza como el núcleo está presente durante el proceso de guiado del hilo de infección. A) El pelo radicular se riza en respuesta a la presencia de los factores Nod B) el rizo del pelo radicular atrapa a una bacteria rizobio C) Se forma una cámara de infección que contiene a la bacteria D) Los rizobios se multiplican dentro de la cámara de infección E) Se forma una microcolonia de rizobios F) De la cámara de infección se deriva el pelo radicular y el núcleo de la célula guía el crecimiento del mismo. Figura tomada de Fournier et al., 2015. *Plant physiology*, 167(pág. 1233–1242)

aumenta la su población provocando finalmente a una invaginación globular de la membrana y pared celular que es conocida como cámara de infección (Figura 7) (Fournier et al., 2015; Tsyganova & Tsyganov, 2018).

3.4 Hilo de infección

El hilo de infección es una estructura tubular que se compone principalmente de celulosa y pectina la cual se deriva de la membrana plasmática de los pelos radiculares y tiene una pared semejante a la celular (Fournier et al., 2015). El hilo de infección tiene como propósito crear una interfaz mediante la cual las bacterias se puedan transportar a través de las capas de células de la raíz hasta llegar al córtex en donde se encuentran las células meristemáticas del nódulo evitando el riesgo de infección patógena para la planta (Figura 8) (Madsen et al., 2010; Tsyganova et al., 2021). La reorganización de la cámara de infección da lugar al infectosoma que inicia el crecimiento polar del hilo de infección, esto se acompaña de una organización de una densa red de microtúbulos longitudinales que se

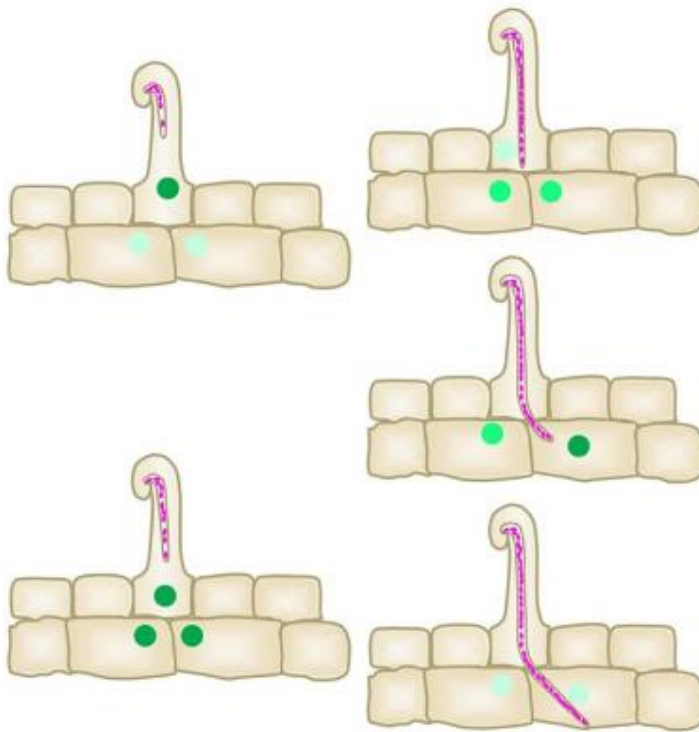


Figura 8. Crecimiento del hilo de infección junto con los rizobios que se dividen dentro de él a través del pelo radical y las células del córtex adyacentes. El hilo de infección mantiene un crecimiento con polaridad negativa que es guiado por el núcleo (en verde) y el hilo de preinfección. Cuando alcanza la base del pelo radical en donde se degrada la membrana y la pared celulares con lo cual es capaz de traspasar la primera capa de la corteza exterior del córtex, durante este proceso también el hilo de infección es guiado por los núcleos a través del hilo de preinfección. Figura tomada de Cerri et al., 2012. *Plant physiology*, 160(pág. 2155–2172)

extienden desde la invaginación del hilo de infección hasta el núcleo del pelo radicular (Tsyganova & Tsyganov, 2018). La reorganización de los microtúbulos endoplásmicos desempeña un papel fundamental en el desarrollo anticlinal del hilo de infección ya que establecen una estructura conocida como hilo de preinfección, estos microtúbulos crean un puente citoplasmático a través de las células del pelo de radicular y entre las células del córtex que determina la polaridad y la dirección a lo largo de la cual el hilo de infección debe de crecer. Cuando la punta del hilo de infección alcanza la célula subepidérmica adyacente debe de fusionarse y degradar localmente la membrana y la pared celular para poder continuar su camino hasta llegar a las células meristemáticas en las cuales se presentan múltiples episodios de ramificación que están dirigidos a depositar los rizobios en distintas células (Figura 8) (Kitaeva et al., 2021).

3.5 Formación de gotas de infección y simbiosomas

Cuando el hilo de infección llega a él meristemo del nódulo, las bacterias son liberadas mediante “gotas de infección” en el citoplasma, lo que da lugar a el simbiosoma que es un sistema semejante a un orgánulo celular. Las gotas de infección se forman a partir de la membrana del hilo de infección en el momento en que son depositados en el citoplasma de la célula huésped. Carecen de la pseudo pared celular del hilo de infección, pero esta membrana derivada de la membrana del hilo de infección da lugar a la membrana simbiosómica (Figura 9). Durante este proceso los microtúbulos regulan la formación, el crecimiento y preparación de cada una de las gotas de infección (Tsyganova & Tsyganov, 2018) así como en la distribución de los simbiosomas dentro de las células infectadas” (Kitaeva et al., 2021). El simbiosoma es un sistema semejante a un orgánulo celular el cual se compone de bacteroides rodeados por un espacio peribacteroide (PBS) y por una membrana simbiosómica (SM). Los bacteroides se originan de un único rizobio que se divide y después pasa por un proceso de diferenciación, el material peribacteroide en el que están embebidos los bacteroides diferenciados evita el contacto directo con el citosol de la planta y por último la membrana simbiosómica

con la que están rodeadas las bacterias se deriva de la membrana plasmática (MP) de las células radiculares que se invagina a medida que las bacterias ingresan en las células que las hospeda, esta membrana especializada regula el intercambio de nutrientes (Figura 9) (Booth et al., 2021; Clarke et al., 2015).

Los bacteroides difieren en su morfología, se pueden distinguir cuatro morfotipos: los alargados ramificados (EB), los alargados no ramificados (ENB), los esféricos (S) y aquellos menos diferenciados que mantienen la forma de bastón característica de los rizobios de vida libre (U) (Kitaeva et al., 2021).

3.6 Organogénesis del nódulo

La organogénesis es un proceso mediante el cual se forma el nódulo que albergará los rizobios simbiotes y donde se llevará a cabo la simbiosis. El desarrollo del nódulo implica una reprogramación masiva que inicia en las capas celulares internas de la raíz en donde se activan células pericíclicas y corticales que se encuentran en un estado diferenciado para que se vuelvan mitóticamente activas y entran en un proceso de reprogramación celular (Figura 10), después de que se establece el reconocimiento bioquímico de ambos simbiotes y se coordina con la infección bacteriana (Madsen et al., 2010). El lugar en donde inician las divisiones celulares iniciales difiere entre los dos tipos de nódulos simbióticos: determinados e indeterminados (Figura 10). El desarrollo del nódulo guarda similitudes con la formación de las raíces laterales, ya que comparten mecanismos moleculares, incluyendo la regulación genética y hormonal (Schiessl et al., 2019). Sin embargo, este órgano especializado en la simbiosis leguminosa-rizobio tiene características fisiológicas únicas.

En los nódulos indeterminados, el proceso de organogénesis comienza con divisiones celulares anticlinales seguidas de divisiones periclinales en las células pericíclicas, luego, las células endodérmicas y corticales experimentan divisiones anticlinales y periclinales (Figura 10).

En el caso de *Medicago truncatula*, el modelo de nódulo indeterminado más estudiado, la parte basal del nódulo se deriva de las células endodérmicas y del

periciclo, mientras que el meristemo del primordio del nódulo se origina a partir de la tercera capa de células corticales, esto da como resultado la conformación del primordio del nódulo (Ferguson et al., 2010; Timmers et al., 1999; Xiao et al., 2014). El meristemo del nódulo genera dos haces vasculares periféricos a partir de las células provasculares y la corteza del nódulo se genera a partir de células posmeristemáticas (Mergaert, 2020; Monroy-Morales et al., 2022). Por otra parte,

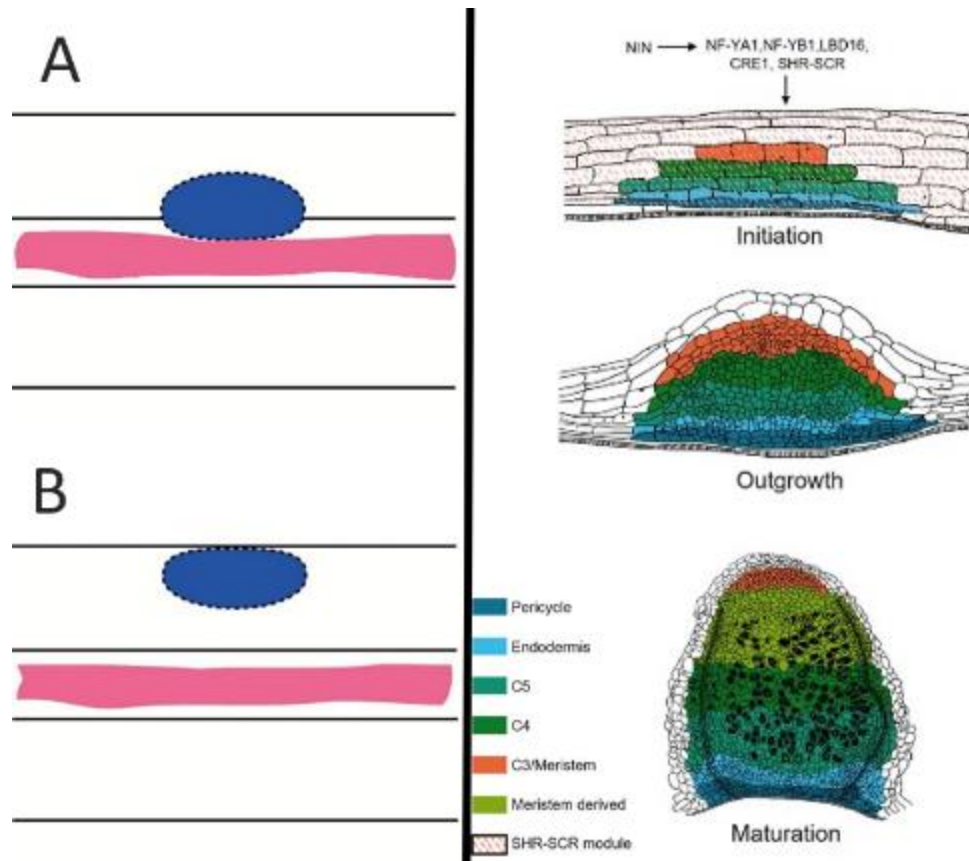


Figura 10. Izquierda: Posición de las primeras divisiones celulares en nódulos indeterminados (A) y determinados (B), que coincide con una respuesta local a la auxina. Estructura del nódulo maduro (C, D). Azul: divisiones celulares/tejido meristemático. Rosa: tejido vascular, estela radicular. Derecha: Organogénesis de nódulos indeterminados en *Medicago truncatula* A) Iniciación: Las células de la corteza interna (C4/C5) sufren divisiones anticlinales y periclinales, seguidas de divisiones anticlinales en la corteza media (C3). (B) Crecimiento: Las células de la epidermis se caen y numerosas divisiones celulares en la corteza dan como resultado la formación de un primordio de nódulo en la raíz, con una NAM activada que se divide y diferencia persistentemente para agrandar el nódulo. (C) Maduración: El órgano forma un sistema de haz vascular de nódulos periféricos (NVB) y una zona de infección que contiene bacteroides. Figuras tomadas de Kohlen et al., 2018. *Journal of experimental botany*, 69(pág. 229–244) y de Yang et al., 2022. *Journal of integrative plant biology*, 64(pág. 244–267)

las divisiones celulares en los nódulos determinados ocurren en la región subepidérmica y también conducen a la formación del primordio del nódulo, pero sin la formación de un meristemo persistente. Finalmente, los rizobios que se encuentran en el hilo de infección son expulsados dentro de la membrana simbiosómica en el plasmalema de las células diferenciadas en la zona central del nódulo inmaduro, donde posteriormente se diferencian en bacteroides para culminar en un simbiosoma funcional (Figura 10) (Ferguson et al., 2010; Monroy-Morales et al., 2022).

4. Regulación genética de la simbiosis leguminosa-rizobio

La simbiosis leguminosa-rizobio requiere de un conjunto conservado de factores de transcripción y enzimas que mantienen altamente regulado y coordinado cada uno de los complejos pasos en el proceso de simbiosis. Estos puntos de controles son importantes porque de esta forma la planta se asegura que el simbionte es óptimamente compatible y llevará a cabo la simbiosis fijadora de nitrógeno óptimamente para que la planta tenga mayor ventaja en detrimento de la energía que invertirá para mantener la simbiosis.

4.1 Los receptores del factor de nodulación

Las legumbres perciben los factores de nodulación mediante heterómeros similares a cinasas con motivos LysM (LysM-RLK) que se localizan en la membrana plasmática y también en la membrana del hilo de infección, en la leguminosa modelo *Lotus japonicus* se denominan Nod Factor Receptor1 (NFR1) y NFR5 mientras que en *Medicago truncatula* son LYK3 y Nod Factor Perception (NFP) (Roy et al., 2020). Estos receptores desempeñan un papel crucial en el reconocimiento de los factores de nodulación (Figura 11), lo que inicia la transducción de señales que conducen a cambios en la expresión génica nuclear y desencadena respuestas bioquímicas y fisiológicas para la infección bacteriana y la organogénesis (Buendía et al., 2018; He et al., 2019). Los receptores de los factores de nodulación pasan por un proceso

de fosforilación para poder iniciar la transducción señales. Los eventos clave de fosforilación en la señalización simbiótica entre leguminosas y rizobios incluyen componentes como MtPUB1, una ubiquitina ligasa E3 que es fosforilada por MtDMI2, que es el equivalente de LjSYMRK en *Medicago truncatula*. LjSYMRK/MtDMI2 forma un heterodímero con LjNFR5 y se ha encontrado que desempeña un papel esencial en la activación de la cascada de señalización simbiótica (Figura 11) (Dávila-Delgado et al., 2023; J. Liu et al., 2018). En la transducción de señales también están involucrados otros receptores que contiene el dominio LysM pero que se especializan en identificar las señales de los exopolisacáridos de la superficie bacteriana. El receptor LjEPR3, en este caso su activación no es esencial para las respuestas iniciales al factor Nod, desempeña un papel crítico en etapas posteriores de la interacción. En particular, LjEPR3 es necesario para la progresión de la infección más allá de la etapa de microcolonia, lo que lo convierte en un componente esencial para el establecimiento exitoso de la simbiosis leguminosa-rizobio (Figura 11) (Kawaharada et al., 2017).

4.2 Despolarización de la membrana y oscilaciones de calcio

La percepción de los factores de nodulación desencadena la despolarización de las membranas celulares y alteraciones en el flujo de iones de calcio. Este proceso conduce a oscilaciones en las concentraciones de calcio, conocidas como "Ca²⁺ spiking", en los núcleos de las células de pelos radicales y de la raíz epidérmica. Estas firmas de calcio son importantes porque su decodificación conlleva a una compleja expresión genética que se tienen que llevar a cabo en el desarrollo de la infección bacteriana y la organogénesis (Figura 12). Este evento se lleva a cabo gracias a los canales de calcio LjCASTOR y LjPOLLUX/MtDMI, y además de las subunidades de nucleoporina como LjNUCLEOPORINA85 (LjNUP85) y LjNUP133 que se encuentran en la membrana nuclear. Estos complejos actúan coordinadamente para producir las oscilaciones de calcio y que con ello se expresen los genes indicados en el momento adecuado en cada tipo de célula involucrada en la simbiosis (Roy et al., 2020). Las oscilaciones simbióticas de calcio son detectadas

por una proteína que se encuentra en el núcleo de la célula vegetal, llamada MtDMI3/LjCCaMK, la cual es una cinasa nuclear dependiente de calcio-calmodulina, y fosforila a al factor de transcripción MtIPD3/LjCYCLOPS (Figura 12) (Singh et al., 2014; Yano et al., 2008). De esta forma este complejo convierte las oscilaciones producidas por la apertura de los canales de calcio en cambios en la expresión de genes simbióticos. IPD3/CYCLOPS fosforilado por CCaMK/DMI3 coordina la expresión de los genes involucrados en la formación de nódulos y la entrada de rizobios en las células de la planta (Figura 12). A continuación, se destacan tres de ellos. 1) interactúa con las proteínas DELLAs y NSP1/2. DELLA pertenecen al grupo de proteínas GRAS, y regula negativamente la señalización de giberelinas (GA) durante la cascada de señalización de la simbiosis. DELLA es clave

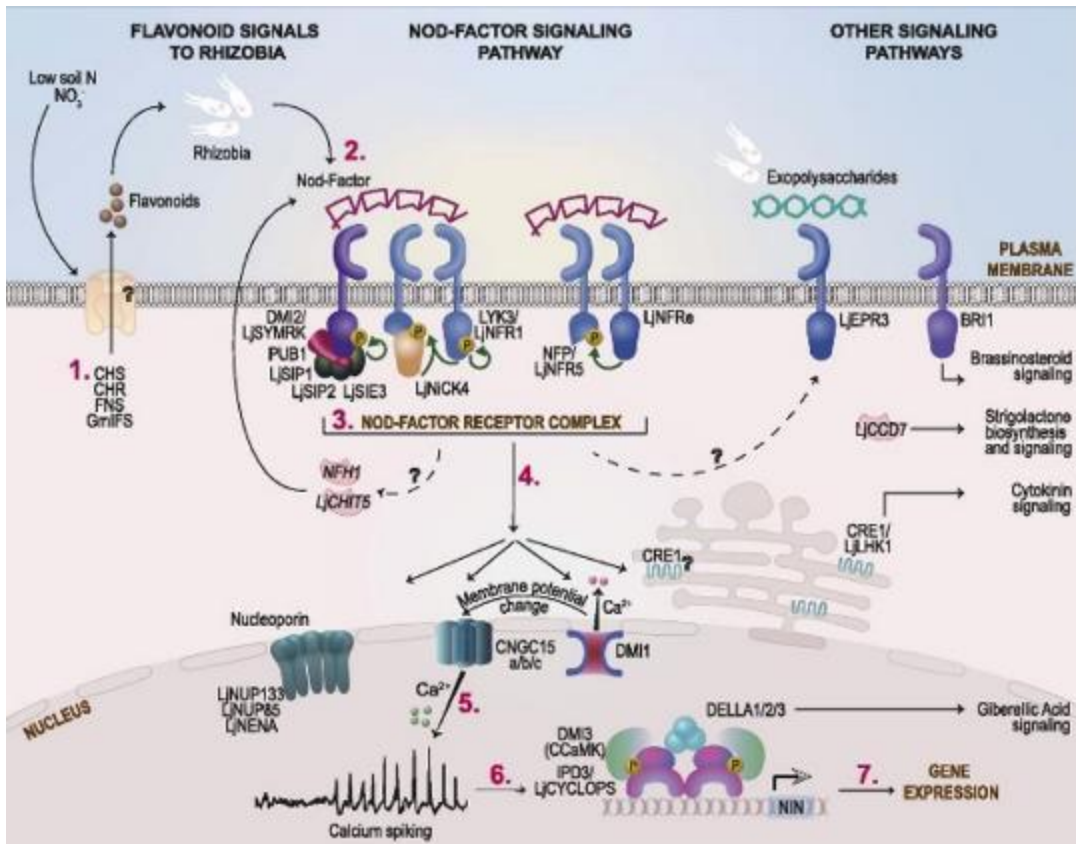


Figura 11. Genes y procesos implicados en la señalización temprana durante la nodulación. Los (iso)flavonoides producidos bajo niveles bajos de nitrógeno en el suelo (1) los factores Nod bacterianos (2) son percibidos por receptores en la membrana plasmática de las células epidérmicas (3). Esto desencadena respuestas bioquímicas y fisiológicas (4–6) que conducen a cambios en la expresión de genes nucleares (7). Figura tomada de Roy et al., 2020. *The Plant cell*, 32(pag. 15–41).

en la formación de un complejo proteico que se compone de MtIPD3, MtDELLAs, NSPs y NF-Ys (Floss et al., 2013; Fonouni-Farde et al., 2016), este complejo se encarga de activar otros factores de transcripción como es el caso de ERN1 el cual está involucrado en el control de la progresión de la infección bacteriana en el hilo de infección (Cerri et al., 2017), 2) Las NSPs también son factores de transcripción tipo GRAS, el complejo NSP1-NSP2 están involucrados en la formación de las bolsas de infección y de los primordios de nódulos ya que regulan la expresión temprana de ENOD11 (NODULINA)(Cerri et al., 2012)

NIN es un factor de transcripción que pertenece a la familia de factores de transcripción que poseen un motivo RWP-RK, durante la simbiosis leguminosa-rizobio desempeña un papel central ya que es un regulador maestro en la expresión de componentes involucrados en los programas genéticos de la infección y la organogénesis del nódulo que tienen efectos positivos o negativos dependiendo de la etapa de desarrollo en la que se encuentre cada célula. Por ello mismo, su promoción transcripcional juega un papel central durante las oscilaciones de calcio decodificados por MtDMI3/LjCCaMK. CYCLOPS cuando es fosforilado activa la transcripción de NIN, además el complejo NSP1-NSP2 Y IPN2 también promueve

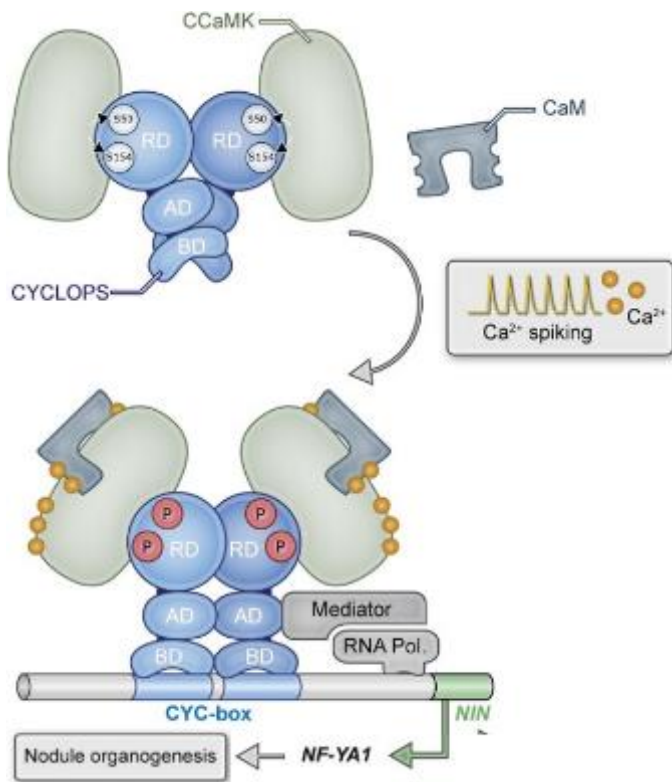


Figura 12. Función del complejo CCaMK/CYCLOPS en la decodificación de firmas de calcio nuclear que conducen al desarrollo de nódulos radiculares CCaMK y CYCLOPS forman un complejo preensamblado inactivo y autoinhibido en los núcleos de las células de la raíz en el que CYCLOPS está presente como un dímero. Tras el inicio del aumento simbiótico de calcio nuclear, CCaMK se activa mediante Ca^{2+} /calmodulina (CaM) y fosforila (P) CYCLOPS. Figura tomada de Singh et al., 2014. *Cell host & microbe*, 15(pag. 139–152).

su transcripción. Se ha encontrado que NIN también es inducido por la señalización de citoquinina mediante CRE1 en la células corticales internas durante el inicio de la nodulación. LjSIP1, interactúa con LjSymRK y también puede unirse al promotor NIN para activar su expresión NIN activa la expresión de los genes LjEPR3, LjRINRK1 y LjNPL que están relacionados con la formación de hilo de infección durante RNS (H. Li et al., 2018) También activan la expresión de los genes de subunidad del factor nuclear-Y (NF-Y) (Soyano et al., 2013), el complejo MtNF-YA1/MtNF-YB16/MtNF-YC2 regula la activación transcripcional de MtERN1 y con ello contribuyen en la etapa temprana de la infección y del meristemo del nódulo (el complejo NSP1 / 2 y CYCLOPS también regula su expresión) y controla la expresión de ENOD11 y ENOD12 asociados a la pared celular, que son críticos para el desarrollo de TI (Cerri et al., 2017; J. Yang et al., 2022).

4.3 Complejos involucrados en el crecimiento del hilo de infección

La formación del hilo de infección es un paso crucial para la colonización bacteriana, durante este proceso se debe de mantener el crecimiento negativo anticlinal de una membrana y una pared celular y se ha encontrado que el complejo de proteínas del infectosoma tiene un papel clave en el inicio y mantenimiento del hilo de infección. Este complejo, está compuesto por la proteína MtVPY (MtVAPYRIN) y sus socios MtLIN y MtEXO70 H4. (Figura 13) (C.-W. Liu et al., 2019) Otro complejo proteico conformado por MtFLOTILLIN2, MtFLOT4 y MtSYMREM1, localizado en la membrana plasmática del hilo de infección y que se asocia con microdominios de membrana que median la endocitosis bacteriana permiten con ello la progresión del hilo de infección (Roy et al., 2020; Tóth et al., 2012). Por otro lado, las modificaciones en el crecimiento y la morfología de las células, piénsese en el alargamiento del pelo radicular, así como en su posterior rizamiento, la conformación de hilo de preinfección, el traslado del núcleo a la zona del hilo de preinfección, así como el adelgazamiento de las células del córtex por donde pasa el hilo de infección dependen de la reconfiguración del ensamblaje de actina. En esta etapa es clave la activación del complejo SCAR/WAVE, que es un grupo de

proteínas que se une a la membrana y recluta a otra proteína llamada Arp2/3 (Figura 12). El complejo SCAR/WAVE y Arp2/3 forman el complejo activador de la nucleación de la actina (CAN), que es el responsable de crear y ramificar los filamentos de actina en los puntos específicos que permiten que la célula generar las estructuras especializadas para la infección (Gavrin et al., 2020; Qiu et al., 2015).

5. La regulación postranscripcional

Los miRNA como reguladores postranscripcionales

Los reguladores de la expresión génica desempeñan papeles clave en la regulación de la expresión de los genes, lo cual permite a las células controlar cuando y en qué medida se producen las proteínas que estos genes codifican, esto es especialmente importante en el desarrollo y diferenciación celular o cuando el organismo responde

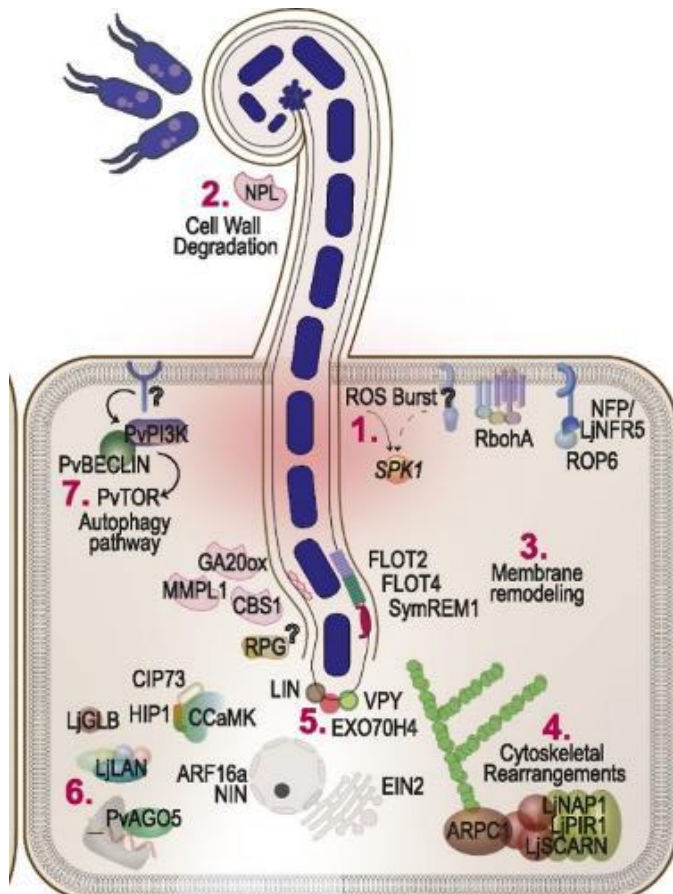


Figura 13. La entrada de rizobios en la célula vegetal a través de TI tubulares desencadena una explosión transitoria de ROS (1). Esto se acompaña de degradación de la pared celular (2), remodelación de la membrana (3) y reordenamientos del citoesqueleto (4). El TI está dirigido por un complejo en su punta llamado infectosoma (5). Paralelamente, varios otros cambios transcripcionales y postraduccionales (6) y la vía de la autofagia (7) aseguran la acomodación del simbiote dentro de la planta huésped. Figura tomada de Roy et al., 2020. *The Plant cell*, 32(pag15–41).

a condiciones de estrés producidos por patógenos y las condiciones ambientales. Durante la regulación genética que involucra al RNAm se pueden distinguir dos tipos de procesos, la regulación transcripcional y la regulación postranscripcional. La regulación transcripcional se refiere a la acción de factores de transcripción y otros elementos reguladores que modulan la actividad de la ARN polimerasa lo cual lleva a un aumento o reducción en la síntesis del RNA mensajero (RNAm) de un gen determinado. Por otro lado, la regulación postranscripcional se refiere a los procesos que afectan la estabilidad y la traducción del RNAm, lo cual tiene una incidencia directa en su viabilidad y por ende, en su traducción. El silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia es un mecanismo que consiste en el emparejamiento con alta afinidad de un miRNA con un RNAm diana, al reconocerse y unirse el RNAm se degrada o se impulsa la represión de la traducción mediante la actividad de una RNAsas (Figura 14) (Mott & Mohr, 2015) Existen dos tipos de pequeños ARNs que participan en esta proceso de silenciamiento, los small interfering ARN (siRNA) y los microARN (miRNA)(Cui et al., 2017).

Los miRNAs son fragmentos de ARN no codificantes y de pequeño tamaño, tienen una longitud típica de alrededor de 21 nucleótidos (nt) pero también pueden presentar 22 o 24 nt, que en las plantas se encuentran codificados por genes MIR (Cui et al., 2017).

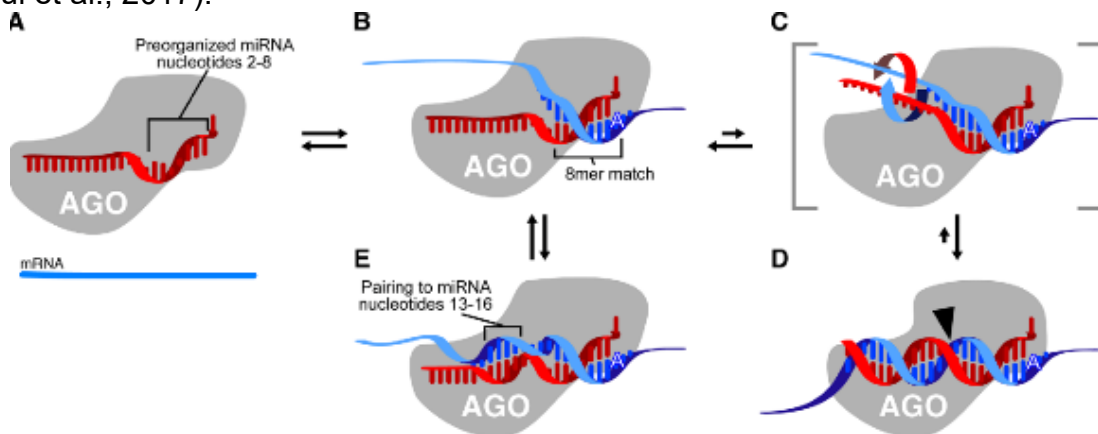


Figura 14. Funciones de cada región de un miARN: (A) MicroARN (rojo) unido por Argonaute (AGO). (B) Reconocimiento de un sitio 8mer (C) Acomodación conformacional masivo de sitios extensamente pareados (D) Apareamiento para la escisión del RNAm. La proteína Argonaute se bloquea en el dúplex ampliamente emparejado, lo que coloca el sitio activo (punta de flecha negra) en posición de escindir el RNAm. (E) Emparejamiento suplementario 3'. Figura tomada de Bartel, 2009. *Cell*, 136(pag. 215–233).

Los miRNAs poseen secuencias de nucleótidos específicas que mediante el emparejamiento con los mRNA diana proporcionan al complejo de regulación una guía de alta afinidad necesario para regular la expresión genética en una variedad de procesos biológicos en las plantas (Figura 14), incluido el desarrollo, la diferenciación celular, la respuesta al estrés y la defensa contra patógenos (Mott & Mohr, 2015; Reis, 2017).

La biogénesis de los miRNA consta de los siguientes pasos; 1) transcripción mediante la ARN polimerasa II: las secuencias de ADN son transcritas en la forma primaria de los miRNAs (pri-miARN) las cuales son de cadena sencilla, 2) procesamiento por DROSHA: las transcripciones de pri-miRNAs son procesadas en el núcleo por la RNasa III DROSHA, la cual corta el pri-miRNA en una estructura en

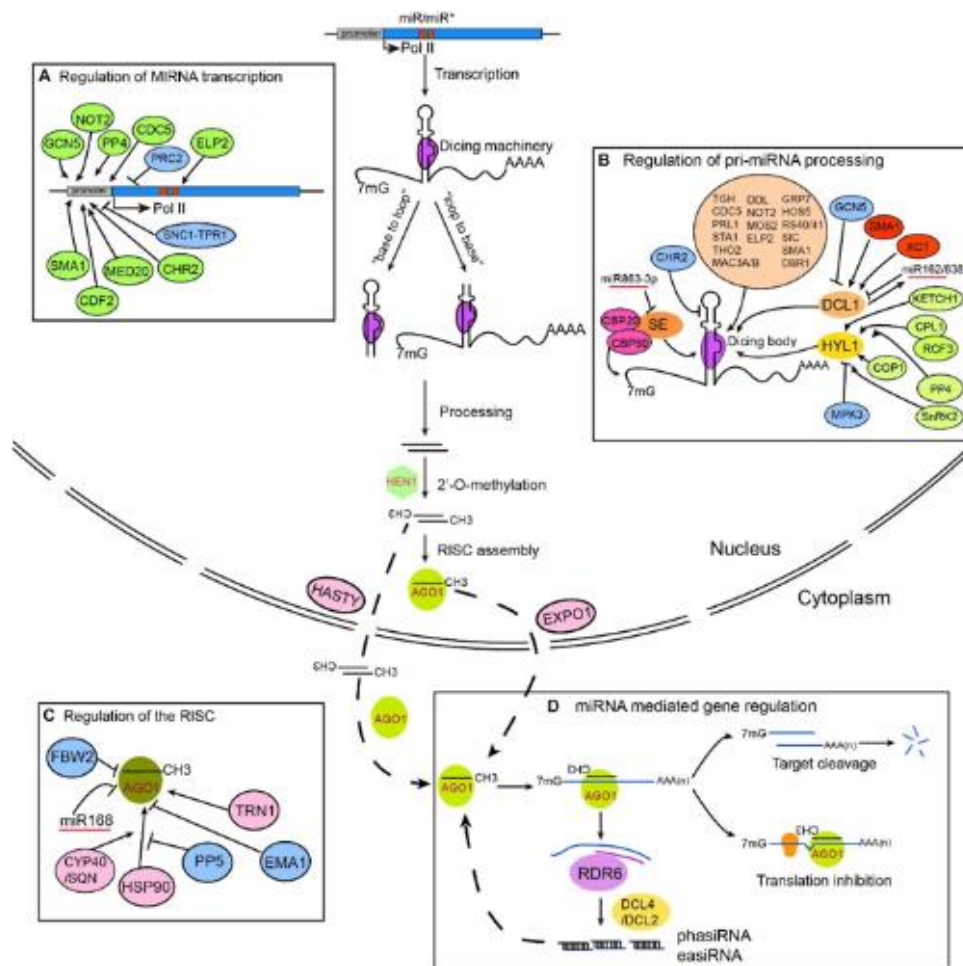


Figura 15. Regulación de la biogénesis de miARN, carga de RISC y acción en plantas. Los genes MIRNA se transcriben mediante la ARN polimerasa II (Pol II) y se pliegan en estructuras de tallo-bucle llamadas pri-miRNA. Figura tomada de J. Wang et al., 2019. *Frontiers in plant science*, 10(num. 360).

forma de “tallo y bucle” que se conocen como precursores de miRNA (pre-miRNA), 3) procesamiento por DICER: los pre-miRNAs se exportan al citoplasma en donde son procesados por la RNAsa III DICER, la cual corta los pre-miRNA en fragmentos de RNA de doble cadena (ds-miARN) en la cual se contiene miARN/miARN* y 4) formación del complejo RISC (RNA induced silencing complex): Este complejo RISC puede reconocer y unirse a los ARNm diana y modular su expresión con precisión mediante la degradación o el bloqueo de la traducción al afectar la actividad de los ribosomas (Figura 15) (J. Wang et al., 2019; Yu et al., 2017).

Formación del complejo RISC

Los componentes centrales del complejo RISC es una proteína de la familia Argonaute (AGO) con actividad endonucleasa y un RNA pequeño monocatenario (siRNA o miRNA) maduro, en este sentido, la asociación selectiva de ambos componentes juega un papel clave para el establecimiento y la funcionalidad del complejo RISC (Figura 16) (Landthaler, 2010; Niaz, 2018; Pegler et al., 2019). Para la formación correcta del complejo RISC es necesario la participación de CARP9, HYL1 y HSP90. CARP9 es una proteína nuclear que se asocia con AGO y facilita su interacción con HYL1 la cual facilita el procesamiento y la carga de los miRNAs a AGO mientras que HSP90 es una proteína chaperona que ayuda a plegar y estabilizar el complejo AGO-miRNA (Bajczyk et al., 2023).

Proteínas Argonaute

La actividad de estos cuatro dominios permite reconocer, desenrollar, anclar los extremos 5`y 3` de los miRNAs para un ensamblaje correcto del complejo RISC (Figura 16) (Niaz, 2018). En *Arabidopsis* se encuentran 10 proteínas Argonauta, las cuales se dividen en tres clados de acuerdo con su relación filogenética (Figura 17), la composición de la secuencia de aminoácidos y su capacidad de unión al miRNA, a continuación, se muestran los miembros de dichos clados; clado 1 incorpora a AGO1, AGO10 y AGO5, clado 2 incorpora a AGO2, AGO7 y AGO3 y el clado 3

incorpora a AGO4, AGO6, AGO8 y AGO9 (Vaucheret, 2008). Los miembros del clado 1 AGO se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma (Borges et al., 2011a; C. Liu et al., 2018; Takeda et al., 2008a) y al ser parálogos cumplen funciones similares, en este caso están orientadas a la regulación del desarrollo y diferenciación de celular (Lecampion et al., 2017; Nonomura et al., 2007). En *Arabidopsis* generalmente se encuentran dentro de las distintas etapas de la floración en áreas clave como los meristemos implicados en su mantenimiento. Se

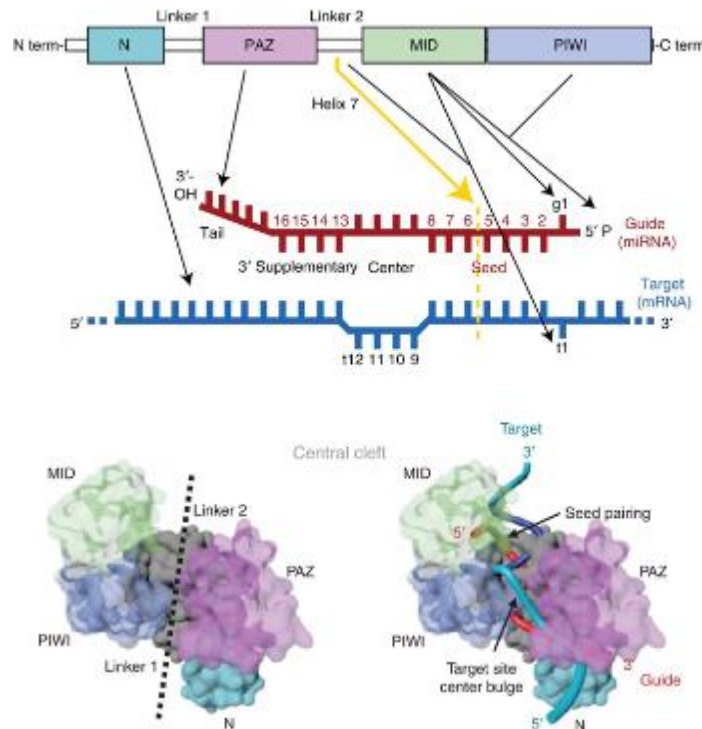


Figura 16. Estructura e interacciones de ARN de Argonautas. Arriba: Se representan la distribución de dominios y los enlaces 1 y 2 en la estructura primaria de HsAGO2. Se indican las interacciones clave con las cadenas guía (el microARN [miARN]) y pasajera (el ARN mensajero objetivo [sitio del ARNm]). Las líneas se conectan cuando la interacción ocurre en la interfaz entre dos dominios (PIWI y MID para el 5'-fosfato guía, y MID y L2 para el nucleótido t1 objetivo). Se indica el posicionamiento de la hélice 7 (codificada en L2) en HsAGO2 y su bloqueo de los nucleótidos g6–8 de la semilla (flecha amarilla y línea discontinua) (Klum et al. 2017). Centro: Representación lineal del emparejamiento de bases de un par arquetípico de miARN/ARNm. Se indica el posicionamiento propuesto de los nucleótidos semilla, centro, suplementario 3' y cola (Wee et al. 2012). Abajo: Estructura de HsAGO2 unido a miARN guía (cadena roja), ARN diana (cadena azul) (modelo derecho) y sin ARN (modelo izquierdo). (La estructura [PDB 4W50] se publicó en Schirle et al. 2014 y Sheu-Gruttadauria y MacRae 2017). Figura tomada de Duchaine & Fabian, 2019. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(pág. 3)

puede destacar las funciones redundantes que presentan AGO1 y AGO10, su parólogo más cercano, dentro de las cuales se encuentran el desarrollo de los meristemas apicales y florales, así como en el desarrollo embrionario (Du et al., 2020a; Mallory et al., 2009; Z. Zhang & Zhang, 2012). Sin embargo, también se presentan diferencias en el caso de AGO5 que está implicado en desarrollo de la línea germinal espermática, el desarrollo del tubo polínico y el desarrollo embrionario pero debido a que es un parólogo más distanciado de AGO1 presentan un mayor número de funciones divergentes dependiendo de la planta (Oliver et al., 2014; Oliver & Martínez, 2022; Vaucheret, 2008).

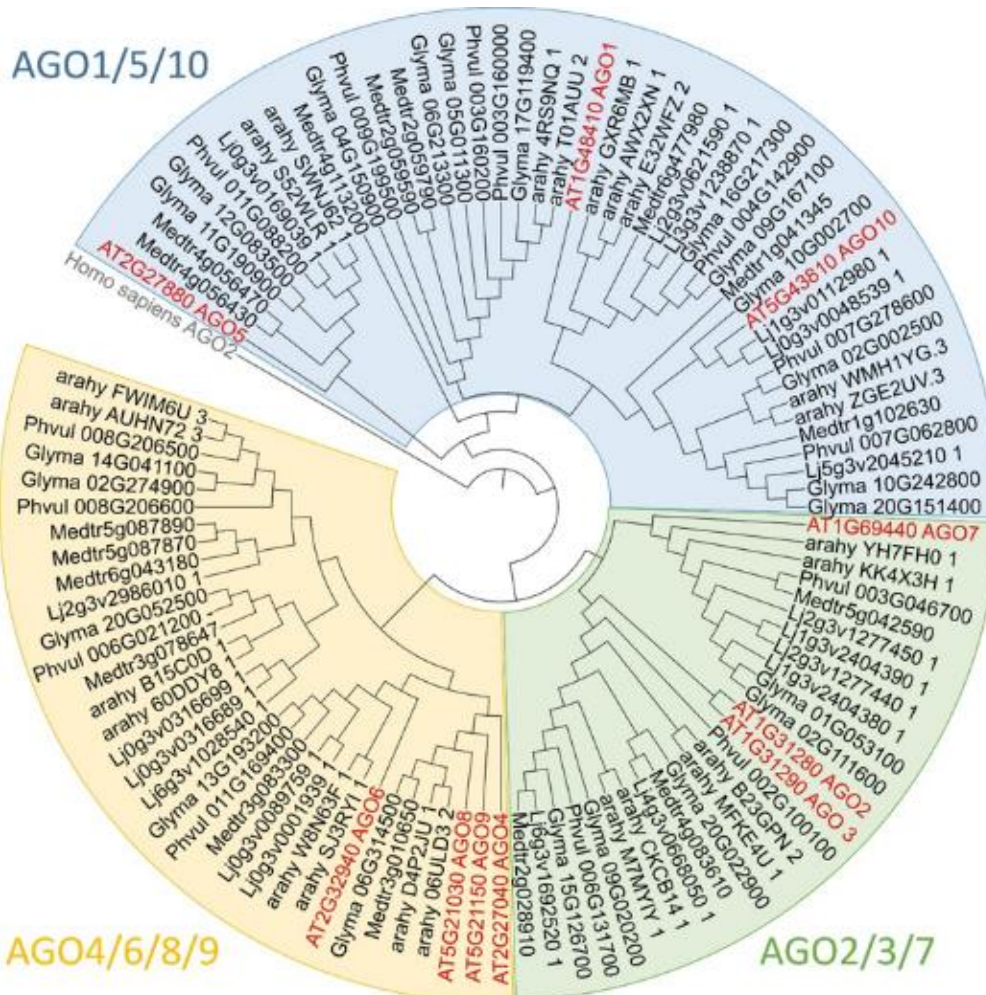


Figura 17. Cladograma de las diferentes proteínas Argonaute presentes en *Arabidopsis thaliana* (AT) y las legumbres; *M. truncatula* (Medtr), *Lotus japonicus* (Lj), *Glycine máx.* (Glyma), *Phaseolus vulgaris* (Phvul), *Arachis hypogaea* (arahy). Figura tomada de Valdés-López et al., 2019. *Frontiers in plant science*, 10

Antecedentes

1. El complejo AGO-miARN en el desarrollo de las plantas.

Los miRNAs son reguladores maestros de la expresión de genes involucrados en el desarrollo los órganos aéreos, radicales y reproductivos de las plantas (Fouracre & Poethig, 2016; Teotia & Tang, 2015). Los miRNAs están presentes en los meristemas, coordinan la diferenciación celular y la orientación espacial, lo cual permite el crecimiento y la formación de tejidos especializados (Bajczyk et al., 2023; Teotia & Tang, 2015), además, también están implicados en diversos procesos de respuesta contra el estrés biótico (Yang et al., 2021) y abiótico (Song et al., 2019), los cuales son necesarios para la simbiosis (Valdés-López et al., 2019).

miRNAs en la arquitectura de las hojas, flores y raíces.

Algunas de las familias de miRNAs de las que se tiene más información de su implicación en el desarrollo y determinación de la arquitectura de las hojas, flores y raíces de las plantas son: miRNA156, miRNA160, miRNA164, miRNA165, miRNA166, miRNA169 y miRNA172. A continuación, se hace un pequeño resumen del papel de estos miRNAs en el desarrollo de los distintos órganos.

miRNA156 tiene como objetivo los factores de transcripción de la familia Squamosa promoter binding protein-like (SPL) (Barrera-Rojas et al., 2020; Sun et al., 2019; Xu et al., 2016). El módulo miRNA156-SPL9 interactúa con WUSCHEL (WUS), es responsable de mantener las células madre y en la formación tanto del Meristema Apical del Brote (shoot apical meristem SAM) como del Meristema Axilar (axillary meristem o AM) esto determina el tamaño, la forma y el número de ramas (Sun et al., 2019; J. Wang et al., 2017). miRNA165/miRNA166 se dirigen a los factores de transcripción Homeodomain Leucine Zipper III (HD-ZIP), REVOLUTA (REV) y KANADI (KAN). HD-ZIP III regula el desarrollo de los meristemas laterales, que median la disposición adaxial y abaxial durante el crecimiento de los órganos laterales (Merelo et al., 2016; Otsuga et al., 2001) y también participa en la

regulación de la polaridad vascular de las plantas (Manuela & Xu, 2020; Ramachandran et al., 2017). El módulo miRNA165-REV regula la expresión de AGO10, el cual que disminuye la efectividad de mirna165 (Brandt et al., 2013). miRNA164 interactúa con los factores de transcripción CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC1, CUC2 y CUC3) que son miembros de la familia NAC (NAM, ATAF y CUC), los cuales son esenciales para la formación y mantenimiento de SAM (Cucinotta et al., 2018; Miguel et al., 2020) y definen la morfología específica de los límites de los órganos florales (Koyama et al., 2010; Nicolas et al., 2022). El módulo miRNA164-CUC también regula la expresión del gen NAC1, influyendo en el desarrollo de las raíces laterales y adventicias de las plantas (J. Li et al., 2012). El miRNA160 tiene como diana a los Auxin Response Factor (ARF): ARF10, ARF16 y ARF17 (Natarajan & Banerjee, 2020). Estos factores de transcripción regulan la expresión de auxinas en diversos la procesos del desarrollo vegetal (Damodharan et al., 2016). Cuando este módulo regulatorio no esta presente causa alteraciones en el desarrollo de los gametos, órganos florales y bordes foliares, que se vuelven aserrados y curvados hacia arriba (Dong et al., 2022). El módulo miRNA160-ARF17/ARF16 también tiene un rol importante en el desarrollo radicular, al regular el número y longitud de las raíces adventicias y laterales (Hao et al., 2022; Meng et al., 2020; J.-W. Wang et al., 2005; J. Yang et al., 2021). miRNA172 se asocia con Apetala2 (AP2) y Target of Early Activation Tagged (TOE11/2/3) que son miembros de la familia AP2/ERF (Nowak et al., 2022). El módulo regulador miRNA172-AP2 participa en el desarrollo de la planta en su etapa juvenil hasta la floración (Zhu & Helliwell, 2011), también participa en el desarrollo frutal (Chung et al., 2020). miRNA169 se asocia con los factores de transcripción NF-Y (compuestos con las subunidades A, C y B) (Sorin et al., 2014), los cuales están ampliamente conservados en una variedad de procesos de desarrollo de las plantas. miRNA169 está implicado en la modulación la arquitectura de la raíz (Sorin et al., 2014), el desarrollo de los órganos florales (en *Petunia* y *Antirrhinum*) y el desarrollo de las hojas (Xing et al., 2023). El módulo miR169-NF-YA2/NF-YA10 influye en el meristemo apical de la raíz para controlar la organogénesis de la raíz y la densidad de las raíces laterales (Sorin et al., 2014), mientras que el módulo miR169q/ZmNF-

YA8 regula el crecimiento de las raíces primarias en maíz bajo condiciones de estrés (Xing et al., 2023)

2. Papel de los miRNAs en la simbiosis leguminosa-rizobio

La simbiosis leguminosa-rizobio es un proceso complejo y que representa un alto costo energético para la planta por lo cual esta finamente regulado. Recientes estudios han evidenciado que la importancia de la regulación mediada por miRNA en la nodulación simbiótica. Los miRNAs participan en la mediación de la expresión genética durante la regulación espacial de la expresión genética de una amplia variedad de procesos necesarios para la infección, desarrollo y función de los nódulos (Hoang et al., 2020; Sánchez-Correa et al., 2022) (Roussin-Léveillé et al., 2020).

Por ejemplo, durante la nodulación la comunicación entre los órganos aéreos y radiculares de la planta se realiza mediante los miRNAs móviles, que viajan a través de los tejidos vasculares (Hoang et al., 2020). miRNA2111 tiene un papel clave en la vía de la vía “autoregulation of nodulation” (AON), ya que, según la disponibilidad de nutrientes, se sintetiza en los órganos aéreos y se traslada al sistema radicular en donde se acumula dependiendo de LHK1, un gen que está relacionado con la vía de la citoquinina y finalmente miR2111 interactúa con TML (Too Much Love) la cual inhibe la nodulación afectando así el número de nódulos (Tsikou et al., 2018). El miR171 se expresa durante el proceso de infección por rizobios y que tiene como diana al factor de transcripción NSP2 (Nodulation Signaling Pathway 2) y SCL-6 (Scarecrow-Like 6) (Hofferek et al., 2014; Hossain et al., 2019). NASP2 y SCL-6 desempeña un papel importante en la vía de señalización de los factores de nodulación ya que participan en la expresión de NIN y ENOD40, así como en la señalización de citoquininas. (Hossain et al., 2019; Z.-L. Zhang et al., 2011). El miRNA172 tiene como diana NNC1 (Nodule Number Control1). NNC1 es un factor de transcripción miembro de la familia AP2/ERF que activa la expresión de ENOD40, el cual está implicado en la nodulación por lo que al ser regulado negativamente NNC1 por miRNA172 también inhibe la formación de los nódulos

mediante la vía AON (Nova-Franco et al., 2015; L. Wang et al., 2019; Y. Wang et al., 2014). El miRNA166 se expresa en haces vasculares y regiones distales de las raíces y nódulos en donde ejerce un papel regulador y afecta el número de nódulos (Boualem et al., 2008; Sánchez-Correa et al., 2022). miR166 es una de las familias de miRNAs más conservadas en las plantas y se unen a la familia HD-ZIPIII que están involucrados en el establecimiento de la polaridad en las hojas y la vasculatura y el patrón radial de la raíz la cual también están ampliamente conservada en las plantas terrestres (Barik et al., 2014). El miR167 se expresa en la vasculatura, el periciclo y la corteza de las raíces en condiciones simbióticas donde regula el desarrollo de órganos radiculares. Tiene como diana la familia de factores ARF que regulan la síntesis de auxinas. El módulo miR167-ARF8, en soja, media la respuesta del periciclo a la ausencia de nitrato y el desarrollo de nódulos (Wang, Li, et al., 2015). El miRNA156 es un regulador de la nodulación en la soja que actúa sobre el factor de transcripción SPL9 (Yun et al., 2022). El miRNA156 inhibe la expresión de SPL9, que a su vez inhibe la expresión de genes involucrados en la formación y el funcionamiento de los nódulos, como NIN y ENOD40 (Wang, Wang, et al., 2015; Yun et al., 2022). Tres miRNAs, miRNA482, miRNA1512 y miRNA1515, se expresan durante la nodulación de la soja, y se observó un aumento significativo en el número de nódulos (Li et al., 2010; Sánchez-Correa et al., 2022; Tiwari et al., 2021). Estos miRNAs reprimen la expresión de genes que participan en la defensa de la planta contra patógenos, lo que podría interferir con la simbiosis con las bacterias fijadoras de nitrógeno, lo cual sugiere que se podría favorecer la nodulación al inhibir la respuesta inmune de la planta y facilitar la simbiosis con las bacterias (Sánchez-Correa et al., 2022; Tiwari et al., 2021).

El clado ARGONAUTE 1/5/10

En distintos trabajos se ha demostrado que AGO 1, 5 y 10 tiene una estrecha homología y comparten un origen evolutivo en común (Figura 20) (Fang & Qi, 2016; Z. Li et al., 2022; Valdés-López et al., 2019). Las distintas investigaciones han demostrado que los miembros de este clado participan en procesos de regulación

del desarrollo, defensa contra estrés abiótico y el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio (García-Ruiz et al., 2015; Koyama et al., 2010; Mallory et al., 2008; Sánchez-Correa et al., 2022). En particular, AGO1 y AGO10 en *Arabidopsis*, han sido implicadas en una gran cantidad de procesos fisiológicos y de desarrollo, incluyendo el crecimiento, la diferenciación celular, la respuesta a estrés y la defensa (M. Liu et al., 2023; Mallory et al., 2009). AGO10 es una proteína que se expresa principalmente en el meristemo apical, donde controla el crecimiento y la diferenciación de los órganos. Por ejemplo, AGO1 y AGO10 compiten por la unión a miR165/166, un microARN que regula negativamente la familia de genes HD-ZIP III, que está implicada en el desarrollo del meristemo y la polaridad de las hojas. AGO1 y AGO10 tienen efectos opuestos sobre este miARN: mientras que AGO1 lo utiliza para silenciar a sus ARNm diana, AGO10 lo secuestra y lo inactiva, evitando así su acción sobre los genes HD-ZIP III5 (Du et al., 2020).

AGO5 en el desarrollo y defensa de las plantas

Se ha encontrado que ARGONAUTE 5 participa en procesos de regulación del desarrollo, defensa contra estrés abiótico y el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio (García-Ruiz et al., 2015; Koyama et al., 2010; Sánchez-Correa et al., 2022). La proteína AGO5 de *Arabidopsis* se expresa en las células somáticas que rodean a las células madre de megasporas, así como en las esporas y los granos de polen, los mutantes de ago5 tienen defectos en el inicio de la megagametogénesis (Borges et al., 2011; Komiya et al., 2014; Tucker et al., 2012). AGO5 también participa en el mecanismo de defensa antiviral ya que puede reconocer y silenciar los ARNs virales del virus del mosaico del pepino (*Cucumis sp.*), y se induce por la infección por el virus X de la papa (*Solanum sp.*) (Brosseau & Moffett, 2015; García-Ruiz et al., 2015; Takeda et al., 2008). Silva-Martins et al., 2023 demostraron que AGO5 participa en la regulación del ácido jasmónico (JA), esta hormona está implicada en el estrés biótico. AGO5 podría estar involucrado en la regulación de la actividad de miRNA en la simbiosis leguminosa-rizobio (Borges et al., 2011b).

3. AGO5 en la simbiosis leguminosa-rizobio

Las proteínas Argonaute (AGO) son componentes esenciales del mecanismo de silenciamiento génico mediado por miRNA. La participación de los miRNAs en la simbiosis leguminosa-rizobio requiere que las proteínas AGO también participen en su regulación (Valdés-López et al., 2019). Sin embargo, la relevancia completa de las proteínas AGO en este proceso aún se desconoce, y se está investigando su función exacta y su interacción con los miRNA y los genes diana. Recientemente se ha planteado la importancia de AGO5 en esta simbiosis, los posibles miRNAs a los que se asocian y las vías en los que están implicados (Reyero-Saavedra et al., 2017; Sánchez-Correa et al., 2022).

Reyero-Saavedra y colaboradores en 2017 encontraron que AGO5 se expresa en las raíces, en los primeros eventos de infección por rizobios (primeras tres horas de inoculación de rizobios) y en los nódulos de *P. vulgaris* y *G. max*. La regulación negativa de AGO5 afecta negativamente a la simbiosis mediante reducción del número de eventos de infección, el rizado del pelo radicular, el número (50% en el número) y el tamaño de los nódulos. AGO5 también modula la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta y en la biosíntesis y señalización de fitohormonas, como el ácido jasmónico. AGO5 está relacionado, directa o indirectamente, con la expresión de genes simbióticos críticos, como NF-YB, NIN, FLOT2, PvNSP2 y PvENOD40 (su expresión se reduce 50% cuando AGO5 es silenciada). Pozas-Rodríguez de (2021) los patrones de coexpresión de AGO5 y miRNAs durante los eventos tempranos de la simbiosis leguminosa-rizobio en el modelo *P. vulgaris*. Los patrones de expresión tisular de AGO5 arrojaron que se focaliza en los pelos radiculares tras ser inoculados por rizobios y los miRNAs asociados con AGO5 son miR172c, miR398b y miR2111. miRNA398b se asocia con Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 (CSD1) la cual participa en el aumento de especies reactivas de oxígeno ROS, miRNA2111 está implicada en la vía AON y miR172c tiene como gen blanco a PvAP2 Ethylene-Responsive Transcription Factor RAP2-7 (AP2-1). Por otro lado, los análisis realizados por Sánchez-Correa y colaboradores en 2022 sobre *P. vulgaris*, arrojaron que AGO5 está implicado en la regulación de la infección, el desarrollo y el mantenimiento de los nódulos funcionales. Durante los

primeros eventos de infección, AGO5 regula la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa de la planta, así como con la biogénesis de la pared celular. AGO5 también está relacionado con la expresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de hormonas, como auxina, citoquininas, etileno y ácido jasmónico ya que cuando es silenciado se reduce la expresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de auxina y citoquininas, mientras que aumenta la expresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de etileno y ácido jasmónico. AGO5 se expresa en los nódulos funcionales, donde podría estar implicado en la regulación de genes del transporte de minerales, como el hierro. Las familias de miRNAs con las cuales pueden asociarse son miR156, miR159, miR166, miR167, miR168, miR319 y miR396, de las cuales miR156 y miR396 están implicadas con la biosíntesis de flavonoides y miR1511 en la homeostasis del hierro.

Hipótesis

El gen *AGO5* se expresará durante el proceso de infección, organogénesis del nódulo y maduración del nódulo en el modelo de nodulación indeterminada, *M. truncatula*. Los patrones de expresión que mostrará la nodulación indeterminada serán similares a los encontrados en la literatura sobre la expresión de *AGO5* durante la nodulación determinada, pero tendrán diferencias ya que los programas genéticos que determinan la estructura del nódulo indeterminado y determinado son diferentes.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la expresión del gen *AGO5* en *Medicago truncatula* durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis leguminosa-rhizobium

Objetivo particular

- Comparar los patrones de expresión de *AGO5* durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis entre la nodulación indeterminada y determinada. Tomando como modelo a *M. truncatula* y *P. vulgaris/G. max* respectivamente.

Metodología

Material vegetal

Se utilizaron semillas de *M. truncatula Jemalong A17* proporcionadas por el laboratorio de Genómica Funcional de leguminosas a cargo del Dr. Oswaldo Valdés-López de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Estado de México, México. Las semillas de *M. truncatula A17* se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 8 min y se enjuagaron 10 veces con agua destilada. Su superficie se esterilizó con cloro concentrado durante 2 min y se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril. Una vez estériles, se germinaron durante 4 días en estratificación a 4°C y 1 día a temperatura ambiente, en placas Petri que contenían medio Fåhraeus cubiertas totalmente por papel aluminio.

Construcción promotor MtAGO5:GUS

La construcción *promotor MtAGO5::GUS (pMtAGO5:GUS)* utilizada se desarrolló previamente en el Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas a cargo del Dr. Oswaldo Valdés mediante la tecnología Gateway. La cepa *Agrobacterium rhizogenes K599* que se utilizó para inducir raíces transgénicas en *M. truncatula* se cultivaron en placas de 5 mg/L de peptona/3 mg/L de extracto de levadura (PY) durante dos días a 30 °C. Se añadieron 100 µg/mL de espectinomicina para seleccionar la presencia de vectores plásmidos.

Generación de raíces transgénicas de M. truncatula Jemalong A17

Se transfirieron 30 plántulas de 1 día de edad con el vector *MtAGO5::GUS* y 30 plantas de 1 día de edad con el vector vacío (control) mediante la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* previamente transformada con el promotor *MtAGO5::GUS* o con el vector vacío (control). Las plantas se transfirieron a cajas con medio Fåhraeus sólido donde completaron el desarrollo de las raíces transgénicas (aproximadamente 3 semanas), después de lo cual fueron

trasplantadas a macetas de dos pulgadas de diámetro con argolita húmeda y se les dio un tiempo de aclimatación de 3-5 días en los cuales se taparon con plastipak que paulatinamente fue retirado.

Inoculación de plantas compuestas de *M. truncatula* con *Sinorhizobium meliloti*

Después de 3-5 días de adaptación ambiental, las plantas con construcción *pMtAGO5:GUS* y las plantas con el vector vacío fueron inoculadas con *S. meliloti*. Para evaluar la actividad transcripcional mediante la fusión transcripcional MtAGO5GUS, se colectaron las raíces transgénicas en 5, 10, 15 y 30 días posteriores a la inoculación y se incubaron en la solución de reacción GUS a 37°C durante 3-4 horas, después de este tiempo, se retiró la solución GUS y se lavaron las raíces con buffer de fosfatos. Posteriormente las raíces fueron observadas en microscopio estereoscópico y óptico de contraste para evaluar la actividad transcripcional de MtAGO5 y como control se usaron plantas con raíces expresando vector vacío (Figura 1).

Resultados

Evaluación de la actividad transcripcional espaciotemporal del gen Argonauta5 (AGO5) en los eventos simbióticos 5, 10, 15 y 30 días en M. truncatula Jemalong A17 – S. meliloti.

5 días después de la infección S. meliloti

Las raíces transfectadas con la construcción *pMtAGO5::GUS* y con el vector vacío mostraron una densidad semejante de eventos simbióticos tempranos, típicos en las raíces deficientes de nitrógeno al ser inoculadas con rizobios, estas etapas consistieron en cabellos radiculares deformados o rizados en el ápice. Tanto en las raíces con niveles altos de nitrato con la construcción *MtAGO5::GUS* o con el vector vacío no se presentaron eventos de nodulación (Imagen 1).

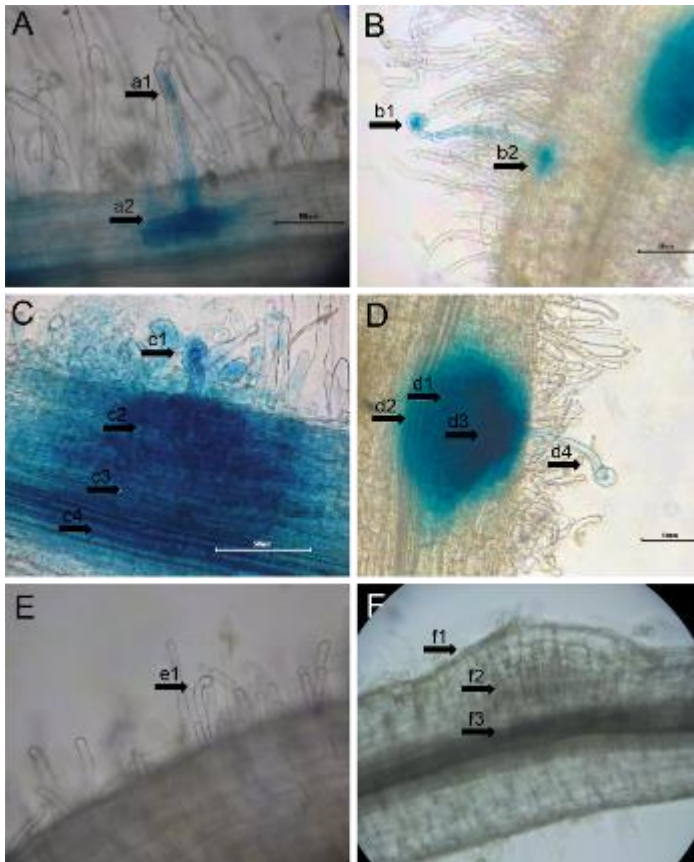


Imagen1: Expresión de tinción GUS en raíces transgénicas de *M. truncatula Jemalong A17* infectadas por *S. meliloti* durante 5 dpi. Raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS* A, B, C y D. Raíces transfectadas con el vector vacío E y F. Se puede observar las primeras etapas de la invasión por rizobios, en e1 el ápice de un cabello radicular esta torcido dividido a la quimiotaxis entre la planta (flavonoides) y la bacteria (lipoquitooligosacáridos) y en b1,c1 y d4 la característica forma de rizo que adquiere el cabello radicular al atrapar la bacteria para después generar la cámara de infección. La tinción GUS se puede observar en las raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS*; en A se muestra una etapa mas temprana con señal GUS a lo largo del cabello radicular (a1) y en el córtex de la raíz (a2), en B la señal GUS se concentra en el rizo (b1) y en el córtex (b2), en C y en D la señal GUS se extiende más allá del cabello (c1 y d4) y se encuentra en el córtex (c2 y d3), periciclo (c3 y d1) y en los haces vasculares (c4 y d2), además, D muestra una visible hinchazón por la división celular. En las raíces con el vector vacío no mostraron señal GUS, en F el nódulo muestra una hinchazón producto de la proliferación celular en f2.

En contraste se observó una fuerte expresión del reportero GUS en la epidermis de las raíces de *M. truncatula* en una zona sensible a infección por rizobios, en la zona del hilo de infección y en la base del hilo de infección. El patrón de expresión de GUS se restringe a las regiones que contienen hilo de infección y se expande hacia las células adyacentes, del mismo modo se expresa en regiones corticales en las cuales el pelo radicular no presenta señal GUS o en pelos radicales sin que se presente en la región cortical adyacente. Se observó una fuerte señal GUS en la zona susceptible a la infección del cabello radicular concentrándose principalmente en el ápice rizado de los pelos radicales rizado, en donde se forma la cámara de infección y quedan atrapados los rizobios lo cual es una fase previa a la formación del hilo de infección, las señales en la región del córtex corresponden a la zona en la cual se induce la diferenciación celular para la formación del meristemo nodular.

10 días posteriores a la infección con *S. meliloti*

Las raíces expresando la construcción *pMtAGO5::GUS* y con el vector vacío mostraron a los 10 dpi (días después de la infección) primordios de nódulos y una

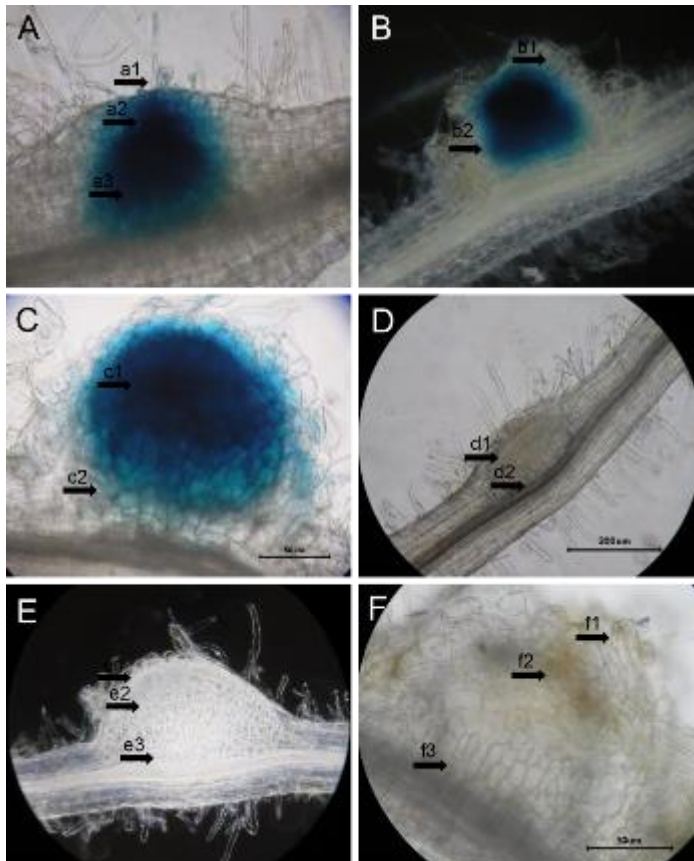


Imagen2: Expresión de tinción GUS en raíces transgénicas de *M. truncatula* *Jemalong A17* infectadas por *S. meliloti* durante 10 dpi. Raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS* A, B y C. Raíces transfectadas con el vector vacío D, E y F. Se muestran primordios nodulares en A y D, esto es debido a la reprogramación celular ocurrida en el córtex y posteriormente en el periciclo. Se muestran nódulos inmaduros en B, C, D y F ya que carecen de coloración rosa y por lo tanto de actividad de *S. meliloti*. La tinción GUS se puede observar en las raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS*; en A se encuentra en el pelo radicular rizado (a1) córtex (a2) y en el periciclo (a3), en B y C la señal GUS se presenta en todo el ápice (b2 y c1), en su base se atenúa (c2) y no se presenta tinción en los haces vasculares. Un cabello rizado con tinción GUS (a1) y células epiteliales sin tinción (b1).. En las raíces con el vector vacío no se muestra señal GUS; en D se observa división celular en el córtex (d1) y el periciclo (d2) sin señal GUS, en E y F se observa el ápice (e2 y f2) y la base (e3 y f3) del nódulo sin señal GUS. Células epiteliales en e1 y f1.

disminución de cabellos radicales. Esto evidencia que se ha iniciado con la reprogramación de las células corticales de la raíz, por lo cual se observa un abultamiento que corresponde a la proliferación de células del meristemo nodular. Por otro lado, las raíces con el vector vacío no mostraron alguna actividad GUS en las regiones en las que se diferenciaban las células corticales o en la región apical del primordio (Imagen 2).

En contraste se observó una fuerte actividad de GUS concentrada en la zona de proliferación celular de los primordios nodulares, mientras que en aquellos primordios nodulares que presentaban un desarrollo más avanzado la señal GUS se redujo sustancialmente en la base, pero siguió conservando la señal en la parte central y apical del meristemo nodular.

15 días posteriores a la infección con *S. meliloti*

Las raíces de ambas construcciones (*pMtAGO5::GUS* y EV) mostraron nódulos tanto en una etapa avanzada de desarrollo como nódulos aun inmaduros, ya que se presentó un tamaño más grande, fue posible distinguir las distintas regiones celulares, una ligera tinción rosa y los haces vasculares que inervan al nódulo. Sin embargo, no fueron generalizadas el conjunto de estas características de maduración por lo cual algunos nódulos aún no presentaban un pleno funcionamiento en lo relativo a la fijación de nitrógeno simbiótico.

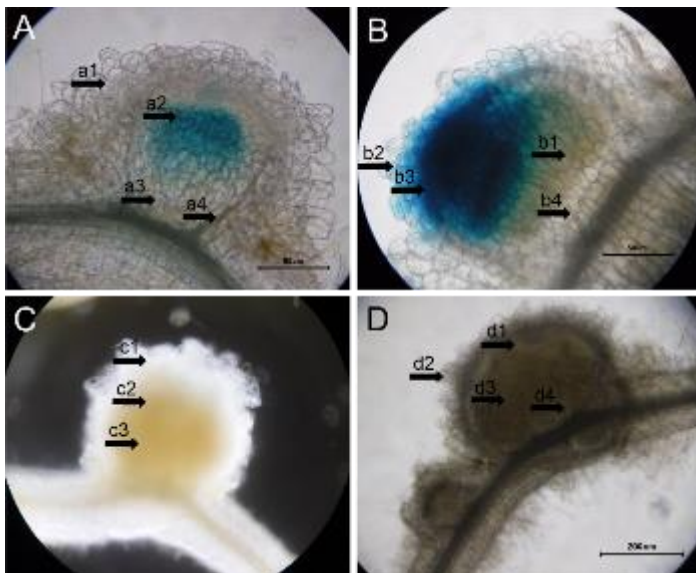


Imagen 3: Expresión de tinción GUS en raíces transgénicas de *M. truncatula Jemalong A17* infectadas por *S. meliloti* durante 15 dpi. Raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS* A y B. Raíces transfectadas con el vector vacío C y D. En los nódulos A, B y D se puede observar los haces vasculares que alimentan al nódulo (a4, b4 y d4). La tinción GUS se puede observar en las raíces transfectadas con el vector *MtAGO5::GUS*; en A y B la tinción se concentra en el ápice (a2 y b3) mientras que está ausente en la base (a3 y b1). Células epiteliales (a1 y b2). Los haces vasculares muestran un ligera tinción. En las raíces con el vector vacío no se muestra señal GUS; en C y D el nódulo no muestra tinción en el ápice (c2 y d1) ni en la base (c3 y d3) y tampoco muestran señal en los haces vasculares. Células epiteliales (c1 y d2)

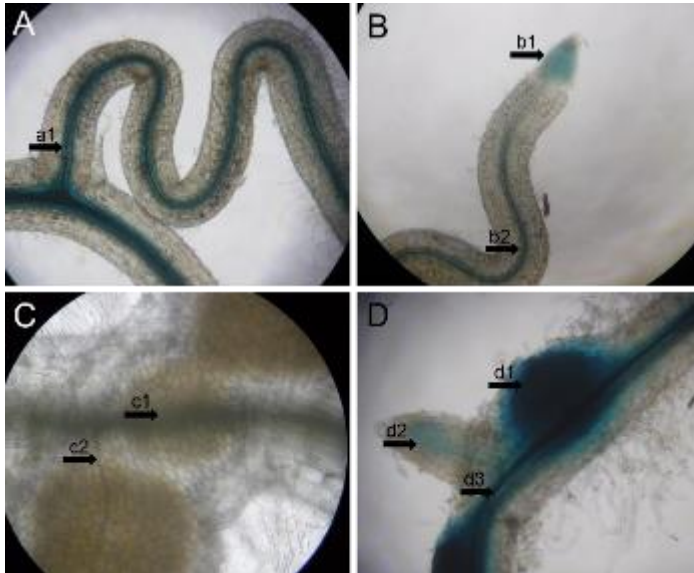


Imagen 5: Expresión de tinción GUS en haces vasculares de raíces transgénicas de *M. truncatula Jemalong A17* infectadas por *S. meliloti*. Raíces transfectedas con el vector *MtAGO5::GUS* con nódulos en diferentes etapas de desarrollo D (10 dpi) y C (30 dpi). Tinción GUS en haces vasculares con vector vacío (a1 y b2) y con el vector *MtAGO5::GUS* (c1 y d3). Tinción GUS en meristemo radicular con vector vacío (b1) y con vector *MtAGO5::GUS* (d2). Nódulo sin teñir (c2) y nódulo con tinción GUS (d1)

En los nódulos expresando la construcción *pMtAGO5:GUS* la actividad de GUS se presentó en la región meristemática de los nódulos, mientras que, en el centro, así como la base del nódulo mostraron una ausencia de tinción. Esta región corresponde a la zona del meristemo persistente de los nódulos indeterminados. Por otro lado, los nódulos con el vector vacío no mostraron tinción GUS en las áreas del meristemo, pero existió tinción de los haces vasculares y los meristemos radiculares (Imagen 3).

30 días posteriores a la inoculación con *S. meliloti*

Las raíces transgénicas expresando la construcción *pMtAGO5:GUS* y EV presentaron nódulos de gran tamaño en los cuales era perfectamente distinguibles; la región del meristemo, así como la región en donde se concentran los bacteroides con un tenue color rosa. Esto evidencio que los nódulos habían completado su maduración y mantienen actividad de fijación de nitrógeno. También se encontraron nódulos en racimo.

En los nódulos expresando la construcción *pMtAGO5:GUS* se observó que la tinción actividad de GUS se concentró en la región apical mientras que en la región central ya no se presentaba en la parte central. Por otro lado, los nódulos con el vector vacío no presentaron tinción GUS en alguna de las regiones del nódulo (Imagen 4).

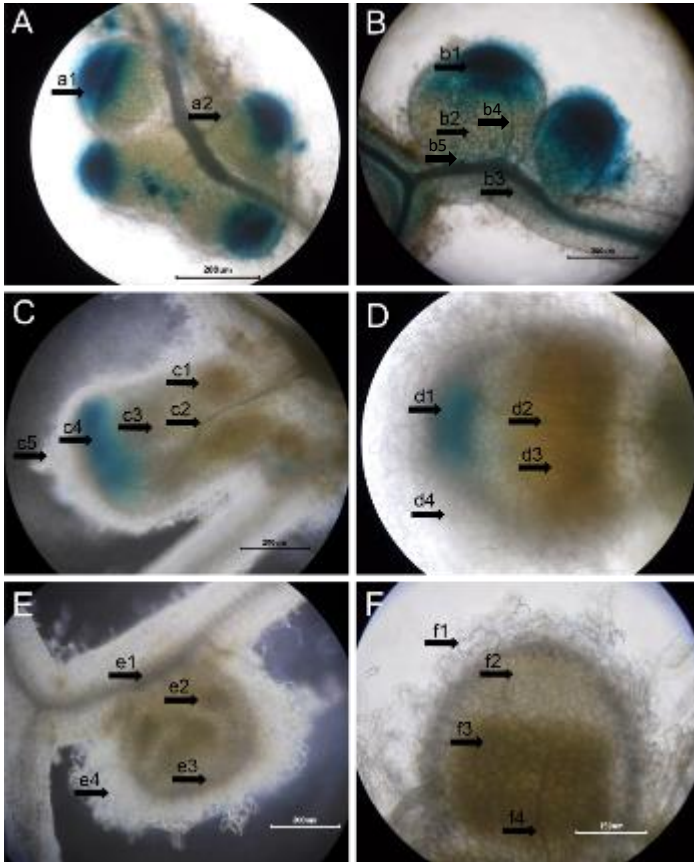


Imagen 4: Expresión de tinción GUS en raíces transgénicas de *M. truncatula* *Jemalong A17* infectadas por *S. meliloti* durante 30 dpi. Raíces transfectedas con el vector *MtAGO5::GUS* A, B, C y D. Raíces transfectedas con el vector vacío E y F. Se muestran nódulos maduros en C, D, E y F ya que presentan un coloración rosa y por lo tanto evidencian la actividad de *S. meliloti* (c1, d3, e2 y f3). En A se presentan nódulos en racimos. Se puede observar los haces vasculares que alimentan al nódulo (a2, b4 y c2, d2 y f4). La tinción GUS se puede observar en las raíces transfectedas con el vector *MtAGO5::GUS*; en A, B, C y D la tinción se presenta y concentra en el ápice del nódulo (a1, b1, c4 y d1) y a excepción de b5 no se presenta en la base (a3, b2, c1 y d3). Se muestra tinción en los haces vasculares (b3). Células epiteliales (c5 y d4). En las raíces con el vector vacío no se muestra señal GUS; en E y F el nódulo no muestra tinción en el ápice (e3 y f2) ni en la base (e2 y f3) y tampoco muestran señal en los haces vasculares. Células epiteliales (e4 y f1)

Discusión

Los procesos de infección, organogénesis y maduración de nódulo simbiótico leguminosa-rizobio requieren mecanismos reguladores precisos. Hasta el momento nuestra comprensión de los módulos regulatorios postranscripcionales que rigen el desarrollo de los nódulos es limitada. Recientemente se han hecho avances importantes sobre los diferentes tipos de miRNAs involucrados y así como de proteínas AGO involucradas. Por ejemplo, AGO5 está involucrada en las diferentes etapas de proceso de simbiosis y su silenciamiento tiene efectos adversos en la formación y funcionalidad de los nódulos. Se sabe que el establecimiento del módulo AGO-miRNA es un proceso competitivo ya que se encuentra una gran cantidad de miRNAs, siRNAs, tsRNAs, rsRNAs, y los niveles de proteínas AGO sin miRNA son degradados rápidamente (Kobayashi et al., 2019). La simbiosis leguminosa-rizobio se puede dividir en dos grandes grupos de acuerdo con el tipo de nódulo que desarrollan, indeterminado y determinado. La clasificación en estos grupos corresponde a una serie de características morfofuncionales y del desarrollo particulares (Kohlen et al., 2018; Sprent, 2007). Ambos grupos comparten un programa general del establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio la cual solo se encuentra esta confinada, a excepción de *Parasponia-Rizobio*, entre los miembros de las legumbres y los rizobios (Svistoonoff et al., 2014). Sin embargo, aún se desconoce en profundidad las sutilezas a nivel molecular que dominan en el desarrollo de estos dos grupos de nódulos y existe una gran heterogeneidad dentro y entre los grupos, un ejemplo son los nódulos lupinoides y aeshynomenoides (Fedorova et al., 2007; Quilbé et al., 2021). Se ha descrito la expresión espaciotemporal de AGO5 en nódulos determinados, así como sus posibles dianas y encontramos que la expresión espaciotemporal de AGO5 es similar en nódulos indeterminados. La expresión espaciotemporal de AGO5 en dos grupos de nódulos, indeterminados y determinados, durante el proceso de infección, organogénesis y maduración es otra evidencia más que apoya la importancia de AGO5 en la regulación postranscripcional durante la simbiosis leguminosa-rizobio.

Actividad espaciotemporal de AGO5 en nódulos indeterminados y determinados

Hilo de infección

AGO5 juega un papel importante en el hilo de infección, ya que está relacionado con la reorganización de la pared celular y el control de la respuesta a patógenos. En este estudio, se expresa AGO5 en los pelos radicales 5 días después de la inoculación en la punta (donde se forma la cámara de infección) así como a lo largo del pelo radical. El patrón de expresión de AGO5 corresponde con lo reportado anteriormente (Pozas-Rodríguez, 2021; Reyero-Saavedra et al., 2017; Sánchez-Correa et al., 2022) en células de pelos radiculares que se encuentran en los eventos tempranos de infección. Esto nos indica que en los nódulos indeterminados (*M. truncatula*), al igual que en los nódulos determinados (*P. vulgaris* y *G. max*), AGO5 también puede regular postranscripcionalmente componentes genéticos implicados en la infección rizobiana (Sánchez-Correa et al., 2022). La expresión de AGO5 tanto en el modelo de nodulación indeterminada como en los modelos de nodulación determinada, implicarían que en ambos casos AGO5 estaría encargada de mediar la expresión de genes que están implicados en las respuestas tempranas de la simbiosis, durante la formación de la cámara de infección y la formación del hilo de infección con la síntesis de la pared celular así como en la regulación de la defensa a estrés biótico como propusieron Sánchez-Correa y colaboradores en 2022

Primordio del nódulos y maduración

AGO5 también es importante en el desarrollo del primordio del nódulo ya que está relacionado con la señalización hormonal necesaria para la reprogramación celular durante la organogénesis del nódulo. En este estudio observamos que AGO5 se expresa 10 y 15 dpi, en el córtex interno y en la totalidad del nódulo. De igual manera la expresión de AGO5 en *M. truncatula* corresponde con lo reportado en los nódulos determinados (*P. vulgaris* y *G. max*), lo cual podría implicar que AGO5 participa en la regulación de la expresión de genes implicados en la síntesis de fitohormonas como la auxina, el etileno y el ácido jasmónico (Sánchez-Correa et al., 2022). En las

etapas de maduración de los nódulos indeterminados también se presentó actividad de AGO5; sin embargo, esta se restringió a la región del meristemo persistente, por otro lado, en los nódulos determinados también se presentó, sin embargo, esta expresión se asoció a la regulación de la homeostasis del hierro (Sánchez-Correa et al., 2022). Los nódulos determinados no presentan un meristemo persistente a diferencia de los nódulos indeterminados, la expresión de AGO5 en el meristemo persistente puede corresponder a la regulación relacionada con la síntesis de la pared celular ya que a diferencia de los nódulos determinados que solo aumentan el tamaño de sus células, en los nódulos indeterminados se presenta una continua división y diferenciación celular (Mergaert, 2020), en estas circunstancias es necesaria una intensa síntesis de nueva pared celular. En los nódulos indeterminados maduros AGO5 también podría estar implicado con la regulación de la absorción de hierro, como ya se ha informado.

La evaluación espaciotemporal en ambos tipos de nódulos, indeterminados y determinados, evidencian que AGO5 participa en el desarrollo general de la simbiosis leguminosa-rizobio. En este sentido, la evidencia de su actividad previamente reportada en nódulos determinados lleva a suponer que el papel que desempeña durante la infección y la organogénesis en nódulos indeterminados se conserva, mientras que en la etapa de maduración puede presentar diversas diferencias debido a la presencia de un meristemo persistente y la organización espacial de sus tejidos.

Conclusión

Evaluamos la expresión de *AGO5* en *Medicago truncatula* durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis indeterminada leguminosa-rhizobium. El promotor de *MtAGO5* tuvo actividad durante la infección, la organogénesis y la maduración del nódulo. Los patrones de expresión del promotor de *MtAGO5* en la nodulación indeterminada se correlacionan con los ya reportados en la nodulación determinada. Durante la infección; en la punta del pelo radicular el cual es susceptible a infección por rizobios y donde se forma la cámara de infección, y a lo largo del pelo radical por donde se forma el hilo de infección. Durante la organogénesis del nódulo: en la corteza interna en donde suceden la reprogramación y la repetida división celular, y el primordio del nódulo. Esto implica que en la nodulación indeterminada *AGO5* puede regular postranscripcionalmente componentes genéticos implicados en la infección rizobiana (síntesis de la pared celular y respuesta a infección), en la organogénesis del nódulo (síntesis de fitohormonas) y en el mantenimiento del nódulo maduro (homeostasis del hierro), pero no se puede afirmar nada sin evidencia experimental.

Literatura citada

Bajczyk, M., Jarmolowski, A., Jozwiak, M., Pacak, A., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Swida-Barteczka, A., Szewc, L., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2023). Recent Insights into Plant miRNA Biogenesis: Multiple Layers of miRNA Level Regulation. *Plants (Basel, Switzerland)*, *12*(2), 342. <https://doi.org/10.3390/plants12020342>

Barik, S., SarkarDas, S., Singh, A., Gautam, V., Kumar, P., Majee, M., & Sarkar, A. K. (2014). Phylogenetic analysis reveals conservation and diversification of micro RNA166 genes among diverse plant species. *Genomics*, *103*(1), 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.11.004>

Barrera-Rojas, C. H., Rocha, G. H. B., Polverari, L., Pinheiro Brito, D. A., Batista, D. S., Notini, M. M., da Cruz, A. C. F., Morea, E. G. O., Sabatini, S., Otoni, W. C., & Nogueira, F. T. S. (2020). miR156-targeted SPL10 controls *Arabidopsis* root meristem activity and root-derived de novo shoot regeneration via cytokinin responses. *Journal of Experimental Botany*, *71*(3), 934-950. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz475>

Berckx, F., Nguyen, T. V., Bandong, C. M., Lin, H.-H., Yamanaka, T., Katayama, S., Wibberg, D., Blom, J., Kalinowski, J., Tateno, M., Simbahan, J., Liu, C.-T., Brachmann, A., & Pawlowski, K. (2022). A tale of two lineages: How the strains of the earliest divergent symbiotic Frankia clade spread over the world. *BMC Genomics*, *23*(1), 602. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08838-5>

Boivin, S., Fonouni-Farde, C., & Frugier, F. (2016). How Auxin and Cytokinin Phytohormones Modulate Root Microbe Interactions. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01240>

Booth, N. J., Smith, P. M. C., Ramesh, S. A., & Day, D. A. (2021). Malate Transport and Metabolism in Nitrogen-Fixing Legume Nodules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(22), 6876. <https://doi.org/10.3390/molecules26226876>

Borges, F., Pereira, P. A., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Becker, J. D. (2011a). MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *Journal of Experimental Botany*, *62*(5), 1611-1620. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq452>

Borges, F., Pereira, P. A., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Becker, J. D. (2011b). MicroRNA activity in the *Arabidopsis* male germline. *Journal of Experimental Botany*, *62*(5), 1611-1620. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq452>

Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combiér, J.-P., Niebel, A., Crespi, M., & Frugier, F. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *54*(5), 876-887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03448.x>

Brandt, R., Xie, Y., Musielak, T., Graeff, M., Stierhof, Y.-D., Huang, H., Liu, C.-M., & Wenkel, S. (2013). Control of stem cell homeostasis via interlocking microRNA and microProtein feedback loops. *Mechanisms of Development*, *130*(1), 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.06.007>

Brosseau, C., & Moffett, P. (2015). Functional and Genetic Analysis Identify a Role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *The Plant Cell*, *27*(6), 1742-1754. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00264>

Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *The New Phytologist*, *220*(4), 1108-1115. <https://doi.org/10.1111/nph.14976>

Buendia, L., Girardin, A., Wang, T., Cottret, L., & Lefebvre, B. (2018). LysM Receptor-Like Kinase and LysM Receptor-Like Protein Families: An Update on Phylogeny and Functional Characterization. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01531>

Campillo R., R., Urquiaga C., S., Pino N., I., & Montenegro B., A. (2003). Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del ¹⁵N. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/39938>

Cerri, M. R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G. E. D., Barker, D. G., Fournier, J., & de Carvalho-Niebel, F. (2012). *Medicago truncatula* ERN transcription factors: Regulatory interplay with NSP1/NSP2 GRAS factors and expression dynamics throughout rhizobial infection. *Plant Physiology*, *160*(4), 2155-2172. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203190>

Cerri, M. R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Downie, J. A., Klingl, A., de Carvalho-Niebel, F., Xie, F., & Parniske, M. (2017). The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *The New Phytologist*, *215*(1), 323-337. <https://doi.org/10.1111/nph.14547>

Chaulagain, D., & Frugoli, J. (2021). The Regulation of Nodule Number in Legumes Is a Balance of Three Signal Transduction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), 1117. <https://doi.org/10.3390/ijms22031117>

Chung, M.-Y., Nath, U. K., Vrebalov, J., Gapper, N., Lee, J. M., Lee, D.-J., Kim, C. K., & Giovannoni, J. (2020). Ectopic expression of miRNA172 in tomato (*Solanum lycopersicum*) reveals novel function in fruit development through regulation of an AP2 transcription factor. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02489-y>

Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Gavrin, A., Chen, C., Brear, E. M., Day, D. A., & Smith, P. M. C. (2015). Proteomic analysis of the soybean symbiosome identifies new symbiotic proteins. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *14*(5), 1301-1322. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043166>

Cope, K. R., Bascaules, A., Irving, T. B., Venkateshwaran, M., Maeda, J., Garcia, K., Rush, T. A., Ma, C., Labbé, J., Jawdy, S., Steigerwald, E., Setzke, J., Fung, E., Schnell, K. G., Wang, Y., Schleif, N., Bücking, H., Strauss, S. H., Maillet, F., ... Ané, J.-M. (2019). The Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* Produces Lipochitooligosaccharides and Uses the Common Symbiosis Pathway to Colonize Populus Roots[OPEN]. *The Plant Cell*, *31*(10), 2386-2410. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00676>

Cucinotta, M., Manrique, S., Cuesta, C., Benkova, E., Novak, O., & Colombo, L. (2018). CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *69*(21), 5169-5176. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery281>

Cui, J., You, C., & Chen, X. (2017). The evolution of microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *35*, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.006>

Damodharan, S., Zhao, D., & Arazi, T. (2016). A common miRNA160-based mechanism regulates ovary patterning, floral organ abscission and lamina outgrowth in tomato. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *86*(6), 458-471. <https://doi.org/10.1111/tpj.13127>

Dávila-Delgado, R., Flores-Canúl, K., Juárez-Verdayes, M. A., & Sánchez-López, R. (2023). Rhizobia induce SYMRK endocytosis in *Phaseolus vulgaris* root hair cells. *Planta*, *257*(4), 83. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04116-0>

Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>

Dong, Q., Hu, B., & Zhang, C. (2022). microRNAs and Their Roles in Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 824240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824240>

Du, F., Gong, W., Boscá, S., Tucker, M., Vaucheret, H., & Laux, T. (2020a). Dose-Dependent AGO1-Mediated Inhibition of the miRNA165/166 Pathway Modulates Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Shoot Apical Meristem. *Plant Communications*, *1*(1), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100002>

Du, F., Gong, W., Boscá, S., Tucker, M., Vaucheret, H., & Laux, T. (2020b). Dose-Dependent AGO1-Mediated Inhibition of the miRNA165/166 Pathway Modulates Stem Cell Maintenance in *Arabidopsis* Shoot Apical Meristem. *Plant Communications*, *1*(1), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100002>

Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El, S., Hopkins, J., Hrouart, D., & Frendo, P. (2012). *The Legume Root Nodule: From Symbiotic Nitrogen Fixation to Senescence* (T. Nagata, Ed.). InTech. <https://doi.org/10.5772/34438>

Einsle, O., & Rees, D. C. (2020). Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chemical Reviews*, *120*(12), 4969-5004. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00067>

El Amrani, B. (2022). Aspects of the rhizospheric microbiota and their interactions with the soil ecosystem. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki I Seleksii*, *26*(5), 442-448. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-54>

Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *The Plant Cell*, *28*(2), 272-285. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>

Fedorova, E. E., de Felipe, M. R., Pueyo, J. J., & Lucas, M. M. (2007). Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells. *Journal of Experimental Botany*, *58*(8), 2225-2236. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm083>

Feijen, F. A. A., Vos, R. A., Nuytinck, J., & Merckx, V. S. F. T. (2018). Evolutionary dynamics of mycorrhizal symbiosis in land plant diversification. *Scientific Reports*, *8*, 10698. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28920-x>

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(1), 61-76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

Floss, D. S., Levy, J. G., Lévesque-Tremblay, V., Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2013). DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), E5025-5034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308973110>

Fonouni-Farde, C., Tan, S., Baudin, M., Brault, M., Wen, J., Mysore, K. S., Niebel, A., Frugier, F., & Diet, A. (2016). DELLA-mediated gibberellin signalling regulates

Nod factor signalling and rhizobial infection. *Nature Communications*, 7, 12636. <https://doi.org/10.1038/ncomms12636>

Fouracre, J. P., & Poethig, R. S. (2016). The role of small RNAs in vegetative shoot development. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.11.006>

Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., de Carvalho-Niebel, F., & Barker, D. G. (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 Physiology*, 167(4), 1233-1242. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253302>

Franssen, H. J., Xiao, T. T., Kulikova, O., Wan, X., Bisseling, T., Scheres, B., & Heidstra, R. (2015). Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. *Development (Cambridge, England)*, 142(17), 2941-2950. <https://doi.org/10.1242/dev.120774>

Garcia, A. K., McShea, H., Kolaczowski, B., & Kaçar, B. (2020). Reconstructing the evolutionary history of nitrogenases: Evidence for ancestral molybdenum-cofactor utilization. *Geobiology*, 18(3), 394-411. <https://doi.org/10.1111/gbi.12381>

Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J. S., Fahlgren, N., Gilbert, K. B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M. T., McGinn, M. G., Lowery, N., Martinez Baladejo, M. T., & Carrington, J. C. (2015). Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during Turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathogens*, 11(3), e1004755. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755>

Gavrin, A., Rey, T., Torode, T. A., Toulotte, J., Chatterjee, A., Kaplan, J. L., Evangelisti, E., Takagi, H., Charoensawan, V., Rengel, D., Journet, E.-P., Debellé, F., de Carvalho-Niebel, F., Terauchi, R., Braybrook, S., & Schornack, S. (2020). Developmental Modulation of Root Cell Wall Architecture Confers Resistance to an Oomycete Pathogen. *Current Biology: CB*, 30(21), 4165-4176.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.011>

Hao, K., Wang, Y., Zhu, Z., Wu, Y., Chen, R., & Zhang, L. (2022). miR160: An Indispensable Regulator in Plant. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 833322. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.833322>

He, J., Zhang, C., Dai, H., Liu, H., Zhang, X., Yang, J., Chen, X., Zhu, Y., Wang, D., Qi, X., Li, W., Wang, Z., An, G., Yu, N., He, Z., Wang, Y.-F., Xiao, Y., Zhang, P., & Wang, E. (2019). A LysM Receptor Heteromer Mediates Perception of Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Signal in Rice. *Molecular Plant*, *12*(12), 1561-1576. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.10.015>

Hoang, N. T., Tóth, K., & Stacey, G. (2020). The role of microRNAs in the legume-Rhizobium nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, *71*(5), 1668-1680. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa018>

Hofferek, V., Mendrinna, A., Gaude, N., Krajinski, F., & Devers, E. A. (2014). MiR171h restricts root symbioses and shows like its target NSP2 a complex transcriptional regulation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, *14*, 199. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0199-1>

Hossain, M. S., Hoang, N. T., Yan, Z., Tóth, K., Meyers, B. C., & Stacey, G. (2019). Characterization of the Spatial and Temporal Expression of Two Soybean miRNAs Identifies SCL6 as a Novel Regulator of Soybean Nodulation. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 475. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00475>

Jha, U. C., Nayyar, H., Parida, S. K., Deshmukh, R., von Wettberg, E. J. B., & Siddique, K. H. M. (2022). Ensuring Global Food Security by Improving Protein Content in Major Grain Legumes Using Breeding and «Omics» Tools. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14), 7710. <https://doi.org/10.3390/ijms23147710>

Jha, V., Bombaywala, S., Purohit, H., & Dafale, N. A. (2022). Differential colonization and functioning of microbial community in response to phosphate levels. *Journal of Environmental Management*, *321*, 115856. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115856>

Kawaharada, Y., Nielsen, M. W., Kelly, S., James, E. K., Andersen, K. R., Rasmussen, S. R., Füchtbauer, W., Madsen, L. H., Heckmann, A. B., Radutoiu, S.,

& Stougaard, J. (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nature Communications*, 8, 14534. <https://doi.org/10.1038/ncomms14534>

Kitaeva, A. B., Gorshkov, A. P., Kirichek, E. A., Kusakin, P. G., Tsyganova, A. V., & Tsyganov, V. E. (2021). General Patterns and Species-Specific Differences in the Organization of the Tubulin Cytoskeleton in Indeterminate Nodules of Three Legumes. *Cells*, 10(5), 1012. <https://doi.org/10.3390/cells10051012>

Kobayashi, H., Shoji, K., Kiyokawa, K., Negishi, L., & Tomari, Y. (2019). Iruka Eliminates Dysfunctional Argonaute by Selective Ubiquitination of Its Empty State. *Molecular Cell*, 73(1), 119-129.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.033>

Kohlen, W., Ng, J. L. P., Deinum, E. E., & Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: Indeterminate and determinate nodules. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 229-244. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx308>

Komiya, R., Ohyanagi, H., Niihama, M., Watanabe, T., Nakano, M., Kurata, N., & Nonomura, K.-I. (2014). Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 78(3), 385-397. <https://doi.org/10.1111/tpj.12483>

Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2010). TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(11), 3574-3588. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075598>

Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., & Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a000315. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315>

Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(5), 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

- Kyriakou, V., Garagounis, I., Vourros, A., Vasileiou, E., & Stoukides, M. (2020). An Electrochemical Haber-Bosch Process. *Joule*, 4(1), 142-158. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2019.10.006>
- Landthaler, M. (2010). Chaperones get RISC loaded. *Molecular Cell*, 39(2), 161-162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.009>
- Lebedeva, M., Azarakhsh, M., Sadikova, D., & Lutova, L. (2021). At the Root of Nodule Organogenesis: Conserved Regulatory Pathways Recruited by Rhizobia. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(12), 2654. <https://doi.org/10.3390/plants10122654>
- Lecampion, C., Lanet, E., & Robaglia, C. (2017). Detection of Argonaute 1 Association with Polysomes in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1640, 137-143. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7165-7_9
- Lepetit, M., & Brouquisse, R. (2023). Control of the rhizobium-legume symbiosis by the plant nitrogen demand is tightly integrated at the whole plant level and requires inter-organ systemic signaling. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1114840. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114840>
- Li, H., Chen, M., Duan, L., Zhang, T., Cao, Y., & Zhang, Z. (2018). Domain Swap Approach Reveals the Critical Roles of Different Domains of SYMRK in Root Nodule Symbiosis in *Lotus japonicus*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 697. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00697>
- Li, H., Deng, Y., Wu, T., Subramanian, S., & Yu, O. (2010). Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiology*, 153(4), 1759-1770. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156950>
- Li, J., Guo, G., Guo, W., Guo, G., Tong, D., Ni, Z., Sun, Q., & Yao, Y. (2012). miRNA164-directed cleavage of ZmNAC1 confers lateral root development in maize (*Zea mays* L.). *BMC Plant Biology*, 12, 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-220>
- Li, Z., Li, W., Guo, M., Liu, S., Liu, L., Yu, Y., Mo, B., Chen, X., & Gao, L. (2022). Origin, evolution and diversification of plant ARGONAUTE proteins. *The Plant*

Journal: For Cell and Molecular Biology, 109(5), 1086-1097.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15615>

Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314-1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

Liu, C., Xin, Y., Xu, L., Cai, Z., Xue, Y., Liu, Y., Xie, D., Liu, Y., & Qi, Y. (2018). *Arabidopsis* ARGONAUTE 1 Binds Chromatin to Promote Gene Transcription in Response to Hormones and Stresses. *Developmental Cell*, 44(3), 348-361.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.002>

Liu, C.-W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., Liu, M., Xie, F., Endre, G., de Carvalho-Niebel, F., Oldroyd, G. E. D., Udvardi, M. K., Fournier, J., & Murray, J. D. (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications*, 10, 2848. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10029-y>

Liu, J., Deng, J., Zhu, F., Li, Y., Lu, Z., Qin, P., Wang, T., & Dong, J. (2018). The MtDMI2-MtPUB2 Negative Feedback Loop Plays a Role in Nodulation Homeostasis. *Plant Physiology*, 176(4), 3003-3026. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01587>

Liu, M., Wu, H., Hong, N., Kang, B., Peng, B., Liu, L., & Gu, Q. (2023). Argonaute 1 and 5 proteins play crucial roles in the defence against cucumber green mottle mosaic virus in watermelon. *Molecular Plant Pathology*, 24(8), 961-972. <https://doi.org/10.1111/mpp.13344>

Liu, S., Ratet, P., & Magne, K. (2020). Chapter Five—Nodule diversity, evolution, organogenesis and identity. En P. Frenedo, F. Frugier, & C. Masson-Boivin (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 94, pp. 119-148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.009>

Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., Ronson, C. W., James, E. K., & Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1038/ncomms1009>

Mallory, A. C., Elmayan, T., & Vaucheret, H. (2008). MicroRNA maturation and action—The expanding roles of ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.008>

Mallory, A. C., Hinze, A., Tucker, M. R., Bouché, N., Gascioli, V., Elmayan, T., Lauressergues, D., Jauvion, V., Vaucheret, H., & Laux, T. (2009). Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genetics*, 5(9), e1000646. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000646>

Meng, Y., Mao, J., Tahir, M. M., Wang, H., Wei, Y., Zhao, C., Li, K., Ma, D., Zhao, C., & Zhang, D. (2020). Mdm-miR160 Participates in Auxin-Induced Adventitious Root formation of apple rootstock. *Scientia Horticulturae*, 270, 109442. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109442>

Merelo, P., Paredes, E. B., Heisler, M. G., & Wenkel, S. (2017). The shady side of leaf development: The role of the REVOLUTA/KANADI1 module in leaf patterning and auxin-mediated growth promotion. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.016>

Merelo, P., Ram, H., Pia Caggiano, M., Ohno, C., Ott, F., Straub, D., Graeff, M., Cho, S. K., Yang, S. W., Wenkel, S., & Heisler, M. G. (2016). Regulation of MIR165/166 by class II and class III homeodomain leucine zipper proteins establishes leaf polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), 11973-11978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516110113>

Mergaert, P. (2020). Chapter Six—Differentiation of symbiotic nodule cells and their rhizobium endosymbionts. En P. Frendo, F. Frugier, & C. Masson-Boivin (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 94, pp. 149-180). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.008>

Miguel, V. N., Manavella, P. A., Chan, R. L., & Capella, M. A. (2020). The AtHB1 Transcription Factor Controls the miR164-CUC2 Regulatory Node to Modulate Leaf Development. *Plant & Cell Physiology*, 61(3), 659-670. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz233>

Mistry, H., Thakor, R., & Bariya, H. (2022). Isolation and Identification of Associative Symbiotic N₂ Fixing Microbes: *Desulfovibrio*. En N. Amaresan, P. Patel, & D. Amin (Eds.), *Practical Handbook on Agricultural Microbiology* (pp. 77-83). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1724-3_10

Młodzińska, E., Kłobus, G., Christensen, M. D., & Fuglsang, A. T. (2015). The plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase AHA2 contributes to the root architecture in response to different nitrogen supply. *Physiologia Plantarum*, 154(2), 270-282. <https://doi.org/10.1111/ppl.12305>

Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-deBuen, A., & Sánchez-López, R. (2022). Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5267. <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>

Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current Biology: CB*, 16(20), R866-871. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.019>

Mott, J. L., & Mohr, A. M. (2015). Overview of MicroRNA Biology. *Seminars in liver disease*, 35(1), 3-11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>

Mus, F., Colman, D. R., Peters, J. W., & Boyd, E. S. (2019). Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radical Biology & Medicine*, 140, 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.050>

Mus, F., Crook, M. B., Garcia, K., Garcia Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M.-H., Oldroyd, G. E. D., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J.-M., & Peters, J. W. (2016). Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3698-3710. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>

Natarajan, B., & Banerjee, A. K. (2020). MicroRNA160 regulates leaf curvature in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée). *Plant Signaling & Behavior*, 15(5), 1744373. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1744373>

Niaz, S. (2018). The AGO proteins: An overview. *Biological Chemistry*, 399(6), 525-547. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0329>

Nicolas, A., Maugarny-Calès, A., Adroher, B., Chelysheva, L., Li, Y., Burguet, J., Bågman, A.-M., Smit, M. E., Brady, S. M., Li, Y., & Laufs, P. (2022). De novo stem cell establishment in meristems requires repression of organ boundary cell fate. *The Plant Cell*, 34(12), 4738-4759. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac269>

Nonomura, K.-I., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., & Kurata, N. (2007). A Germ Cell-Specific Gene of the ARGONAUTE Family Is Essential for the Progression of Premeiotic Mitosis and Meiosis during Sporogenesis in Rice. *The Plant Cell*, 19(8), 2583-2594. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053199>

Nova-Franco, B., Íñiguez, L. P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., Ramírez, M., Paul, S., Reyes, J. L., Girard, L., & Hernández, G. (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiology*, 168(1), 273-291. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255547>

Nowak, K., Morończyk, J., Grzyb, M., Szczygieł-Sommer, A., & Gaj, M. D. (2022). miR172 Regulates WUS during Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis* via AP2. *Cells*, 11(4), 718. <https://doi.org/10.3390/cells11040718>

Oliver, C., & Martinez, G. (2022). Accumulation dynamics of ARGONAUTE proteins during meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction*, 35(2), 153-160. <https://doi.org/10.1007/s00497-021-00434-z>

Oliver, C., Santos, J. L., & Pradillo, M. (2014). On the role of some ARGONAUTE proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00177>

Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M. J., Drews, G. N., & Clark, S. E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 25(2), 223-236. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00959.x>

Pawlowski, K., & Demchenko, K. N. (2012). The diversity of actinorhizal symbiosis. *Protoplasma*, 249(4), 967-979. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0388-4>

Pegler, J. L., Grof, C. P. L., & Eamens, A. L. (2019). The Plant microRNA Pathway: The Production and Action Stages. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1932, 15-39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_2

Pozas-Rodríguez, E. A. (2021). *Determinación del papel de ARGONAUTA 5 (AGO5) durante los eventos tempranos de la simbiosis leguminosa-rizobio*. <http://132.248.9.195/ptd2021/febrero/0809513/0809513.pdf>

Qiu, L., Lin, J.-S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T. L., Downie, J. A., & Xie, F. (2015). SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005623. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005623>

Quilbé, J., Lamy, L., Brottier, L., Leleux, P., Fardoux, J., Rivallan, R., Benichou, T., Guyonnet, R., Becana, M., Villar, I., Garsmeur, O., Hufnagel, B., Delteil, A., Gully, D., Chaintreuil, C., Pervent, M., Cartieaux, F., Bourge, M., Valentin, N., ... Arrighi, J.-F. (2021). Genetics of nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the rhizobium-legume symbiosis. *Nature Communications*, 12(1), 829. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21094-7>

Reis, R. S. (2017). The entangled history of animal and plant microRNAs. *Functional & Integrative Genomics*, 17(2-3), 127-134. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0513-0>

Reyero-Saavedra, M. D. R., Qiao, Z., Sánchez-Correa, M. D. S., Díaz-Pineda, M. E., Reyes, J. L., Covarrubias, A. A., Libault, M., & Valdés-López, O. (2017). Gene Silencing of Argonaute5 Negatively Affects the Establishment of the Legume-Rhizobia Symbiosis. *Genes*, 8(12), 352. <https://doi.org/10.3390/genes8120352>

Ribbe, M. W., Górecki, K., Grosch, M., Solomon, J. B., Quechol, R., Liu, Y. A., Lee, C. C., & Hu, Y. (2022). Nitrogenase Fe Protein: A Multi-Tasking Player in Substrate Reduction and Metallocluster Assembly. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(19), 6743. <https://doi.org/10.3390/molecules27196743>

Roussin-Léveillé, C., Silva-Martins, G., & Moffett, P. (2020). ARGONAUTE5 Represses Age-Dependent Induction of Flowering through Physical and Functional Interaction with miR156 in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, *61*(5), 957-966. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa022>

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, *32*(1), 15-41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

Ruffel, S., Freixes, S., Balzergue, S., Tillard, P., Jeudy, C., Martin-Magniette, M. L., van der Merwe, M. J., Kakar, K., Gouzy, J., Fernie, A. R., Udvardi, M., Salon, C., Gojon, A., & Lepetit, M. (2008). Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *146*(4), 2020-2035. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115667>

Rutledge, H. L., & Tezcan, F. A. (2020). Electron Transfer in Nitrogenase. *Chemical Reviews*, *120*(12), 5158-5193. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00663>

Sánchez-Correa, M. D. S., Isidra-Arellano, M. C., Pozas-Rodríguez, E. A., Reyero-Saavedra, M. D. R., Morales-Salazar, A., Del Castillo, S. M. L.-C., Sanchez-Flores, A., Jiménez-Jacinto, V., Reyes, J. L., Formey, D., & Valdés-López, O. (2022). Argonaute5 and its associated small RNAs modulate the transcriptional response during the rhizobia-Phaseolus vulgaris symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1034419. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1034419>

Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., Thomas, A., Luptak, J., Ramakrishnan, K., Carpenter, M. D., Mysore, K. S., Wen, J., Ahnert, S., Grieneisen, V. A., & Oldroyd, G. E. D. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Current Biology: CB*, *29*(21), 3657-3668.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.005>

Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., Guo, B., Sudini, H. K., Gopalakrishnan, S., DasGupta, M., Varshney, R. K., & Pandey, M. K. (2020). Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between Bradyrhizobium and «Crack-Entry» Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(2), 276. <https://doi.org/10.3390/plants9020276>

Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., & Parniske, M. (2014). CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.011>

Song, X., Li, Y., Cao, X., & Qi, Y. (2019). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant-Environment Interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 489-525. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100334>

Sorin, C., Declerck, M., Christ, A., Blein, T., Ma, L., Lelandais-Brière, C., Njo, M. F., Beeckman, T., Crespi, M., & Hartmann, C. (2014). A miR169 isoform regulates specific NF-YA targets and root architecture in *Arabidopsis*. *The New Phytologist*, 202(4), 1197-1211. <https://doi.org/10.1111/nph.12735>

Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *The New Phytologist*, 174(1), 11-25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x>

Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: From palaeomycology to phylogenomics. *The New Phytologist*, 220(4), 1012-1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>

Sun, Z., Su, C., Yun, J., Jiang, Q., Wang, L., Wang, Y., Cao, D., Zhao, F., Zhao, Q., Zhang, M., Zhou, B., Zhang, L., Kong, F., Liu, B., Tong, Y., & Li, X. (2019). Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of GmmiR156b. *Plant Biotechnology Journal*, 17(1), 50-62. <https://doi.org/10.1111/pbi.12946>

Svistoonoff, S., Hocher, V., & Gherbi, H. (2014). Actinorhizal root nodule symbioses: What is signalling telling on the origins of nodulation? *Current Opinion in Plant Biology*, *20*, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.03.001>

Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008a). The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant and Cell Physiology*, *49*(4), 493-500. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn043>

Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008b). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant & Cell Physiology*, *49*(4), 493-500. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn043>

Teotia, S., & Tang, G. (2015). To bloom or not to bloom: Role of microRNAs in plant flowering. *Molecular Plant*, *8*(3), 359-377. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.018>

Timmers, A. C., Auriac, M. C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development (Cambridge, England)*, *126*(16), 3617-3628. <https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3617>

Tiwari, M., Pandey, V., Singh, B., & Bhatia, S. (2021). Dynamics of miRNA mediated regulation of legume symbiosis. *Plant, Cell & Environment*, *44*(5), 1279-1291. <https://doi.org/10.1111/pce.13983>

Tóth, K., Stratil, T. F., Madsen, E. B., Ye, J., Popp, C., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Jensen, O. N., Schüßler, A., Parniske, M., & Ott, T. (2012). Functional Domain Analysis of the Remorin Protein LjSYMREM1 in *Lotus japonicus*. *PLoS ONE*, *7*(1), e30817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030817>

Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., Bhasin, H., Sexauer, M., Stougaard, J., & Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6411), 233-236. <https://doi.org/10.1126/science.aat6907>

Tsyganova, A. V., Brewin, N. J., & Tsyganov, V. E. (2021). Structure and Development of the Legume-Rhizobial Symbiotic Interface in Infection Threads. *Cells*, *10*(5), 1050. <https://doi.org/10.3390/cells10051050>

Tsyganova, A. V., & Tsyganov, V. E. (2018). *Plant Genetic Control over Infection Thread Development during Legume-Rhizobium Symbiosis*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70689>

Tucker, M. R., Okada, T., Hu, Y., Scholefield, A., Taylor, J. M., & Koltunow, A. M. G. (2012). Somatic small RNA pathways promote the mitotic events of megagametogenesis during female reproductive development in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)*, *139*(8), 1399-1404. <https://doi.org/10.1242/dev.075390>

Valdés-López, O., Formey, D., Isidra-Arellano, M. C., Reyero-Saavedra, M. del R., Fernandez-Göbel, T. F., & Sánchez-Correa, M. del S. (2019). Argonaute Proteins: Why Are They So Important for the Legume–Rhizobia Symbiosis? *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01177>

Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>

Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>

Wang, J., Tian, C., Zhang, C., Shi, B., Cao, X., Zhang, T.-Q., Zhao, Z., Wang, J.-W., & Jiao, Y. (2017). Cytokinin Signaling Activates WUSCHEL Expression during Axillary Meristem Initiation. *The Plant Cell*, *29*(6), 1373-1387. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00579>

Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W., & Chen, X.-Y. (2005). Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *17*(8), 2204-2216. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033076>

Wang, L., Sun, Z., Su, C., Wang, Y., Yan, Q., Chen, J., Ott, T., & Li, X. (2019). A GmNINa-miR172c-NNC1 Regulatory Network Coordinates the Nodulation and Autoregulation of Nodulation Pathways in Soybean. *Molecular Plant*, *12*(9), 1211-1226. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.002>

Wang, Y., Li, K., Chen, L., Zou, Y., Liu, H., Tian, Y., Li, D., Wang, R., Zhao, F., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M., & Li, X. (2015). MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors GmARF8a and GmARF8b Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Physiology*, *168*(3), 984-999. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00265>

Wang, Y., Wang, L., Zou, Y., Chen, L., Cai, Z., Zhang, S., Zhao, F., Tian, Y., Jiang, Q., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M., & Li, X. (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *The Plant Cell*, *26*(12), 4782-4801. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131607>

Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M. Y., & Hannoufa, A. (2015). Ectopic expression of miR156 represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *290*(2), 471-484. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0931-4>

Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., & Bisseling, T. (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development (Cambridge, England)*, *141*(18), 3517-3528. <https://doi.org/10.1242/dev.110775>

Xing, L., Zhang, L., Zheng, H., Zhang, Z., Luo, Y., Liu, Y., & Wang, L. (2023). ZmmiR169q/ZmNF-YA8 is a module that homeostatically regulates primary root growth and salt tolerance in maize. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1163228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163228>

Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M.-Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., & Poethig, R. S. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA

PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12(8), e1006263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>

Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244-267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>

Yang, J., Zhang, N., Zhang, J., Jin, X., Zhu, X., Ma, R., Li, S., Lui, S., Yue, Y., & Si, H. (2021). Knockdown of MicroRNA160a/b by STTM leads to root architecture changes via auxin signaling in *Solanum tuberosum*. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 166, 939-949. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.051>

Yang, X., Zhang, L., Yang, Y., Schmid, M., & Wang, Y. (2021). miRNA Mediated Regulation and Interaction between Plants and Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2913. <https://doi.org/10.3390/ijms22062913>

Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T. L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., & Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20540-20545. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806858105>

Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *The New phytologist*, 216(4), 1002-1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>

Yun, J., Sun, Z., Jiang, Q., Wang, Y., Wang, C., Luo, Y., Zhang, F., & Li, X. (2022). The miR156b-GmSPL9d module modulates nodulation by targeting multiple core nodulation genes in soybean. *The New Phytologist*, 233(4), 1881-1899. <https://doi.org/10.1111/nph.17899>

Zeng, M., Hause, B., van Dam, N. M., Uthe, H., Hoffmann, P., Krajinski, F., & Martínez-Medina, A. (2022). The mycorrhizal symbiosis alters the plant defence strategy in a model legume plant. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.14421>

Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., & Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *The New Phytologist*, 221(2), 1049-1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>

Zhang, X., Ward, B. B., & Sigman, D. M. (2020). Global Nitrogen Cycle: Critical Enzymes, Organisms, and Processes for Nitrogen Budgets and Dynamics. *Chemical Reviews*, 120(12), 5308-5351.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00613>

Zhang, Z., & Zhang, X. (2012). Argonautes compete for miR165/166 to regulate shoot apical meristem development. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(6), 652-658. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.007>

Zhang, Z.-L., Ogawa, M., Fleet, C. M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.-O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., & Sun, T. (2011). Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 2160-2165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012232108>

Zhu, Q.-H., & Helliwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 487-495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq295>