



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS GENÉTICOS QUE REGULAN EL  
ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS FRIJOL-RHIZOBIO EN  
CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE FÓSFORO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIÓL. MARIEL CAROLINA ISIDRA ARELLANO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ**

**(FES IZTACALA, UNAM)**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS CARDENAS TORRES (IBT, UNAM)  
DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES (IBT, UNAM)**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022.  
Octubre**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS GENÉTICOS QUE REGULAN EL  
ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS FRIJOL-RHIZOBIO EN  
CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE FÓSFORO.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIÓL. MARIEL CAROLINA ISIDRA ARELLANO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ**

**(FES IZTACALA, UNAM)**

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS CARDENAS TORRES (IBT, UNAM)  
DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES (IBT, UNAM)**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022.**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/876/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de agosto de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ISIDRA ARELLANO MARIEL CAROLINA** con número de cuenta **414021509** con la tesis titulada **“Determinación de los mecanismos genéticos que regulan el establecimiento de la simbiosis frijol-rhizobio en condiciones de deficiencia de fósforo.”**, realizada bajo la dirección del **DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ  
Vocal: DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO  
Vocal: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
Vocal: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
Secretario: DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 20 de septiembre de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos institucionales**

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto las puertas para formarme profesionalmente. Asimismo, agradezco a todas las autoridades y personal que son parte del programa las cuales siempre brindaron la mejor disposición a ayudar y asesorarnos en cada una de las etapas del posgrado.

También quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca Nacional No. CVU: 919676 y Apoyo CONACyT Ciencia Básica Proyecto No. A1-S-9454) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM No. IN213017 e IN201320) por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

Especialmente, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor el Dr. Oswaldo Valdés López quien con sus conocimientos me guió a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba. Su continuo apoyo y asesoramiento a lo largo de mi doctorado me han convertido en la científica que soy hoy. Por lo que no hay palabras suficientes para expresarle mi agradecimiento, cariño y admiración. Gracias por su dedicación y apoyo incondicional.

Finalmente, me gustaría agradecer a los miembros de mi comité tutorial la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles y al Dr. Luis Cardenas Torres a quienes admiro profundamente. Sus aportaciones a esta tesis han sido de mucha importancia, estoy particularmente agradecida por sus valiosas y constructivas sugerencias durante la planificación y desarrollo de este trabajo de investigación. La enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pudiera crecer profesionalmente. Gracias por su interés y apoyo al proyecto.

# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1.Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1.Capítulo I. Importancia de las leguminosas .....	3
1.2.Capítulo II. Importancia del Nitrógeno.....	6
1.3.Capítulo III. Fertilizantes nitrogenados sintéticos.....	8
1.4.Capítulo IV. Fijación Simbiótica de Nitrógeno.....	10
1.5.Capítulo V. Establecimiento de la simbiosis.....	12
1.6.Capítulo VI. Proceso de colonización.....	16
1.7.Capítulo VII. Desarrollo del nódulo.....	19
1.8.Capítulo VIII. Autorregulación de la nodulación.....	21
1.9.Capítulo IX. Importancia de Fósforo.....	26
<b>2.Antecedentes.....</b>	<b>30</b>
2.1 Impacto de la deficiencia de Pi en la simbiosis leguminosa-rhizobio.....	30
<b>3.Hipótesis.....</b>	<b>32</b>
<b>4.Objetivos.....</b>	<b>33</b>
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos Particulares.....	33
<b>5.Metodología.....</b>	<b>34</b>
5.1.Condiciones generales de crecimiento de plantas y bacterias.....	34
5.1.1.Material vegetal.....	34
5.1.2. Tratamientos para inducir deficiencia de Pi.....	34
5.1.3. Crecimiento de <i>R. tropici</i> .....	35
5.1.4. Generación de la cepa <i>R. tropici::uida</i> .....	35
5.2 Evaluación de eventos tempranos de la simbiosis.....	36
5.2.1.Análisis de la expresión de genes.....	36
5.2.2.Análisis de las deformaciones de los pelos radicales.....	37

5.3.3.Cuantificación del número de hilos de infección.....	38
5.3.RNaseq.....	38
5.3.1.Preparación y secuenciación RNA-Seq de mensajeros.....	38
5.3.2. Identificación de los genes diferenciados diferencialmente.....	39
5.3.3.Clasificación funcional de genes.....	39
5.4.Generación de plantas compuestas.....	39
5.4.1. Construcción de plásmidos para RNA de interferencia.....	39
5.4.2. Construcción de plásmidos para fusiones transcripcionales.....	40
5.4.3. Transformación genética mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	41
5.5. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	42
5.5.1.Sistema de expresión en <i>E. coli</i> .....	42
5.5.2.Purificación de la proteína PHR1 y EMSA.....	43
5.6.Análisis fisiológicos.....	43
5.6.1.Sistema de injertos. ....	44
5.6.2. Sistema de raíz dividida .....	44
5.7. Análisis estadísticos.....	45
<b>6.Resultados.....</b>	<b>46</b>
6.1. La deficiencia de fósforo afecta negativamente las etapas tempranas de la simbiosis entre <i>P. vulgaris</i> y rhizobios.....	46
6.1.1.La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes simbióticos.....	46
6.1.2.La deficiencia de Pi afecta la deformación de los pelos radicales.....	49
6.1.3. Efectos negativos de la deficiencia de Pi en la adhesión y formación de IT.....	51
6.1.4. Cambios transcripcionales globales de RNA mensajeros.....	53
6.1.5. Categorías funcionales afectadas por la deficiencia de Pi.....	55
6.1.6. La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes relacionados con auxinas y citocininas.....	56
6.1.7. La deficiencia de Pi incrementa la expresión de genes relacionados con etileno, jasmonato y ácido abscísico.....	58
6.1.8.La deficiencia de Pi aumenta la expresión de los genes <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> .....	60



6.1.9. Modelo: La deficiencia de fósforo afecta negativamente las etapas tempranas de la simbiosis.....	62
6.2. La deficiencia de Pi activa componentes de la vía de Autoregulación de la Nódulación.....	64
6.2.1. La deficiencia de Pi activa la expresión de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> .....	64
6.2.2. <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> regulan la nodulación en deficiencia de Pi.....	65
6.2.3. Las regiones promotoras de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> poseen sitios P1BS.....	67
6.2.4. Actividad transcripcional del promotor de <i>PvRIC1</i> en deficiencia de Pi.....	69
6.2.5. PHR1 se une a los sitios P1BS contenidos en el promotor de <i>PvRIC1</i> .....	70
6.2.6. PHR1 regula la expresión de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> .....	72
6.2.7. PHR1 regula la nodulación en deficiencia de Pi.....	74
6.2.8. La deficiencia de Pi también modula la expresión de <i>PvNIN</i> .....	75
6.2.9. La deficiencia de Pi también modula la expresión de <i>PvTML</i> .....	77
6.3. La inhibición de la nodulación de leguminosas por deficiencia de Pi depende de la vía de Autorregulación de la Nodulación.....	79
6.3.1. La deficiencia de Pi no afecta los procesos simbióticos en plantas mutantes <i>nark</i> .....	79
6.3.2. El efecto de la deficiencia de Pi en la nodulación es dependiente del receptor NARK.....	81
6.3.3. La deficiencia de Pi activa a los componentes de la AON local y sistémicamente.....	83
6.3.4. La deficiencia de Pi reduce sistémicamente el número de nódulos.....	85
6.3.5. Modelo propuesto “La inhibición de la nodulación de leguminosas por deficiencia de Pi depende de la vía de Autorregulación de la Nodulación”.....	87
6.4. PHR1 y NIN reguladores de la simbiosis leguminosa-rhizobio en deficiencia de Pi.....	89
6.4.1. PHR1 muestra patrones de expresión asociados a la simbiosis.....	89
6.4.2. Evolución de la región promotora de <i>PvPHR1</i> .....	91

6.4.3. La deficiencia de Pi genera cambios en los patrones de expresión de <i>PvNIN</i> .....	94
6.4.4. Región del promotor de <i>PvNIN</i> activada durante los eventos tempranos.....	97
6.4.5. La actividad de <i>PvNIN</i> se restablece en mutantes nark.....	99
<b>7.Discusión.....</b>	<b>101</b>
<b>8.Conclusiones.....</b>	<b>110</b>
<b>9.Perspectivas.....</b>	<b>111</b>
<b>10.Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>112</b>
<b>11.Información suplementaria.....</b>	<b>132</b>
Tabla Suplementaria S1.....	132
Tabla Suplementaria S2.....	133
Tabla Suplementaria S3.....	134
<b>12.Anexo.....</b>	<b>135</b>

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 1.1.</b> Producción de cultivos de leguminosas en América central y Caribe.....	5
<b>Figura 1.2.</b> Ciclo del Nitrógeno.....	7
<b>Figura 1.3.</b> Uso de fertilizantes nitrogenados por hectárea de tierra de cultivo.....	8
<b>Figura 1.4.</b> Fijación simbiótica de nitrógeno e intercambio de nutrientes.....	11
<b>Figura 1.5.</b> Diálogo molecular entre la leguminosa y rhizobios.....	15
<b>Figura 1.6.</b> Proceso de Infección.....	17
<b>Figura 1.7.</b> Desarrollo y tipos de nódulos en leguminosas. ....	20
<b>Figura 1.8.</b> La vía de autorregulación de la nodulación (AON).....	24
<b>Figura 1.9.</b> Vía de señalización que modulan la homeostasis de Pi en plantas.....	28
<b>Figura 5.2.1.</b> Zonas de la raíz.....	37
<b>Figura 5.4.3.</b> Transformación genética de <i>P. vulgaris</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i> .....	42
<b>Figura 6.1.1</b> La deficiencia de Pi reduce la activación de genes simbióticos tempranos.....	47
<b>Figura 6.1.2</b> La deficiencia de Pi afecta negativamente la deformación de los pelos radicales inducida por rhizobios.....	50
<b>Figura 6.1.3.</b> La deficiencia de Pi reduce la adhesión de los rhizobios y la formación de IT.....	52
<b>Figura 6.1.4.</b> Cambios transcripcionales globales de RNA mensajeros.....	54
<b>Figura 6.1.5.</b> Categorías funcionales afectadas por la deficiencia de Pi.....	56
<b>Figura 6.1.6.</b> La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes relacionados con auxinas y citocininas.....	57
<b>Figura 6.1.7.</b> La deficiencia de Pi incrementa la expresión de genes relacionados con etileno, jasmonato y ácido abscísico.....	59
<b>Figura 6.1.8.</b> La deficiencia de Pi aumenta la expresión de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> incluso en ausencia de rhizobios.....	61
<b>Figura 6.1.9.</b> Modelo propuesto de los efectos de la deficiencia de Pi en las primeras etapas de la simbiosis entre <i>P. vulgaris</i> y <i>R. tropici</i> .....	63
<b>Figura 6.2.1</b> La deficiencia de Pi activa la expresión de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> .....	64
<b>Figura 6.2.2.</b> <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> controlan la nodulación en deficiencia de Pi.....	66
<b>Figura 6.2.3.</b> Los promotores de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> contienen elementos regulatoris <i>cis</i> P1BS....	68

<b>Figura 6.2.4.</b> <i>PvRIC1</i> se expresa en las células del periciclo de la raíz en respuesta a la deficiencia de Pi.....	69
<b>Figura 6.2.5.</b> PHR1 se une a los sitios P1BS contenidos en el promotor de <i>PvRIC1</i> .....	71
<b>Figura 6.2.6.</b> PHR1 regula la expresión de <i>PvRIC1</i> y <i>PvRIC2</i> .....	73
<b>Figura 6.2.7.</b> PHR1 regula la nódulación en deficiencia de Pi.....	74
<b>Figura 6.2.8.</b> La deficiencia de Pi también modula la expresión de <i>PvNIN</i> .....	76
<b>Figura 6.2.9.</b> La deficiencia de Pi también modula la expresión de <i>PvTML</i> .....	78
<b>Figura 6.3.1.</b> La deficiencia de Pi no afecta los eventos simbióticos en plantas mutantes <i>nark</i> .....	80
<b>Figura 6.3.2.</b> El efecto negativo de la deficiencia de Pi en la nodulación de las leguminosas depende del receptor NARK .....	82
<b>Figura 6.3.3.</b> La deficiencia de Pi activa a los componentes de la AON local y sistémicamente.....	84
<b>Figura 6.3.4.</b> La deficiencia de Pi reduce sistémicamente el número de nódulos.....	86
<b>Figura 6.3.5.</b> Modelo: La inhibición de la nodulación de leguminosas por deficiencia de Pi depende de la vía de Autorregulación de la Nodulación. ....	88
<b>Figura 6.4.1a.</b> PHR1 muestra patrones de expresión asociados a la simbiosis.....	90
<b>Figura 6.4.1b.</b> La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de <i>PvPHR1</i> en raíces y nódulos de <i>P. vulgaris</i> .....	91
<b>Figura 6.4.2.</b> La actividad transcripcional del promotor de <i>AtPHR1</i> en <i>P. vulgaris</i> ausente en nódulos.....	93
<b>Figura 6.4.3a.</b> La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de <i>PvNIN</i> en raíces y nódulos de <i>P. vulgaris</i> .....	95
<b>Figura 6.4.3a.</b> La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de <i>PvNIN</i> en raíces y nódulos de <i>P. vulgaris</i> .....	96
<b>Figura 6.4.4.</b> Región del promotor de <i>PvNIN</i> activada durante los eventos tempranos y afectada por la deficiencia de Pi.....	98
<b>Figura 6.4.5.</b> La actividad transcripcional de <i>PvNIN</i> es dependiente del receptor NARK.....	100

## **Índice de abreviaturas**

N	Nitrógeno
N <sub>2</sub>	Nitrógeno dimolecular
P	Fósforo
Pi	Fosfato
FSN	Fijación Simbiótica de Nitrógeno
FNs	Factores de Nodulación
NIN	Nodule Inception
IT	Hilo de Infección
AON	Autoregulation of Nodulation
CLE	CLAVATA3/Embryo Surrounding Region
RIC	Rhizobia-Induced CLE
NARK	Nodule Autoregulation Receptor Kinase
SDI	Shoot-derived inhibitor
TML	Too Much Love
PHR1	Phosphate Starvation Response
P1BS	PHR1-binding site
OP	Optimal Phosphate
LP	Low Phosphate
PSR	Pi Starvation Responses
PSI	Pi Starvation-Induced Genes

## Resumen

El fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, no obstante las plantas toman el fósforo del suelo exclusivamente como fósforo inorgánico (Pi). Sin embargo, el Pi del suelo interactúa rápidamente con los iones  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$ , formando complejos que dificulta la absorción del Pi por la planta. Se ha demostrado que la deficiencia de Pi afecta negativamente la formación y el desarrollo de nódulos en diferentes especies de leguminosas, incluido el frijol. Se han realizado avances significativos en la comprensión de las respuestas genéticas que subyacen a la adaptación de los nódulos a la deficiencia de Pi. Sin embargo, aún no es claro si esta deficiencia nutricional interfiere con el diálogo molecular entre leguminosas y rhizobios. Asimismo, se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la reducción del número de nódulos bajo deficiencia de Pi. En este estudio, se proporciona evidencia que demuestra que la deficiencia de Pi afecta negativamente las respuestas moleculares y fisiológicas tempranas, las cuales son críticas para una simbiosis exitosa entre el frijol y los rhizobios. Los resultados obtenidos demuestran que se afecta la expresión de genes esenciales para la simbiosis como *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2*, ocasionando defectos en procesos relacionados con la adhesión y colonización del rhizobio. Estos defectos podrían desencadenarse por un desbalance hormonal. A través de un análisis transcriptómico se demostró que la expresión de genes relacionados con las hormonas auxinas y citocininas se afectan en deficiencia de Pi. Por el contrario, se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con etileno, jasmonato y ácido abscísico, que actúan como reguladores negativos de las etapas tempranas. Adicionalmente, se demostró que el factor de transcripción Phosphate starvation Response1 (PHR1) regula la simbiosis leguminosa-rhizobio bajo deficiencia de Pi. Se demostró que PHR1 activa la transcripción de los genes simbióticos *PvRIC1*, *PvRIC2*, y *PvTML*, los cuales son reguladores negativos de la formación de nódulos. Análisis fisiológicos, utilizando las técnicas de “raíz dividida” e “injertos”, indicaron que la deficiencia de Pi afecta la nodulación de forma sistémica. En conjunto, esta tesis proporciona una mayor comprensión sobre los mecanismos genéticos que controlan el establecimiento de la simbiosis bajo la deficiencia de Pi. Asimismo, los datos que se incluyen en esta tesis también evidencian la estrecha relación que mantiene el estatus de Pi con las interacciones entre las plantas y los microorganismos.

## Abstract

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth, but plants exclusively take up phosphorus from the soil as inorganic phosphorus (Pi). However, soil Pi rapidly interacts with  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Al}^{3+}$  ions, forming complexes making Pi unavailable for plant uptake. Pi deficiency reduces the formation and development of nodules in different legume species, including common bean. Significant advances have been made in understanding the genetic responses underlying the adaptation of nodules to Pi deficiency. However, it is still unclear whether this nutritional deficiency interferes with the molecular dialogue between legumes and rhizobia. Likewise, the molecular mechanisms that lead to the reduction in the number of nodules under Pi deficiency are unknown. In this study, evidence demonstrating that Pi deficiency negatively affects early molecular and physiological responses, which are critical for a successful symbiosis between common bean and rhizobia, is provided. It was shown that the expression of essential genes in the symbiosis such as *PvNSP2*, *PvNIN* and *PvFLOT2* is affected, causing defects in processes related to the adhesion and colonization of the rhizobia. These defects could be triggered by a hormonal imbalance. Through a transcriptomic analysis it was shown that the expression of genes related to auxin and cytokinin hormones are severely affected in Pi deficiency. In contrast, an increase in the expression of genes related to ethylene, jasmonate and abscisic acid, which are negative regulators of early stages, was observed. Additionally, it was shown that the transcription factor Phosphate starvation Response 1 (PHR1) regulates the legume-rhizobia symbiosis under phosphate-deficient conditions. In this study it was shown that PHR1 activates the transcription of *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML*, which all are negative regulators of nodule formation. Physiological analyses, using split-root and grafting approaches, indicated that Pi deficiency affects nodulation systemically. Overall, this thesis provides a better understanding of the genetic mechanisms that control the establishment of the symbiosis under Pi deficiency. Likewise, these data also show the close relationship between Pi status and plant-microorganism interactions.

# 1.Introducción

## 1.1.Capítulo I. Importancia de las leguminosas

Las leguminosas son un grupo diverso de plantas que pertenecen a la familia Fabaceae (The Legume Phylogeny Working Group, 2013; Bellucci *et al.*, 2014). El término “Leguminosa” hace referencia a todo grupo de plantas cuyo fruto crece dentro de una vaina. A este grupo pertenece el frijol, la soya, las habas, los garbanzos, las alubias, las lentejas, entre otros. Las leguminosas tienen una gran importancia agroalimentaria debido a su uso para consumo humano el cual impacta en la nutrición, en la salud y en la seguridad alimentaria de la población, así como una importancia ecológica que impacta en la fertilidad de los suelos y en el cambio climático (FAO, 2016).

En años recientes ha existido una preocupación en el mundo debido a los problemas alimenticios y metabólicos que enfrenta la humanidad. Alcanzar un equilibrio nutricional ha representado un reto importante. Desde este punto de vista las leguminosas representan un importante papel debido a que poseen un alto contenido nutricional. Su consumo aporta a la dieta un contenido alto de proteínas, vitaminas (del grupo B) y minerales (hierro, el potasio, el magnesio y el zinc). Esta calidad nutricional ha posicionado a las leguminosas como un alimento esencial para la dieta humana. Su alto contenido nutricional no solo refuerza la salud en general, sino que también ayuda a la prevención de enfermedades. Su consumo puede ayudar al control de peso debido a su bajo contenido de grasas, y por el contrario su alto contenido en fibra ayuda a reducir el colesterol previniendo cardiopatías. Además, su consumo aporta hierro y vitaminas como folatos, los cuales previenen enfermedades como la anemia y anomalías congénitas, respectivamente (Nutrition and Food Systems Division, 2017; Castro-Guerrero *et al.*, 2016 ).

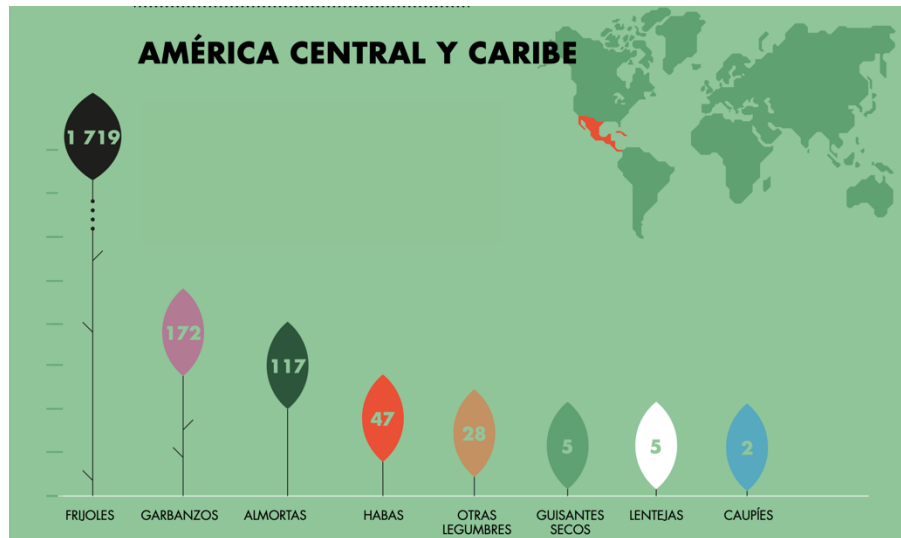
Por otra parte, la seguridad alimentaria es un aspecto de importancia mundial. Su deficiente distribución y/o su desperdicio excesivo son los problemas que enfrentan las naciones. Muchos países hoy en día se enfrentan al alza de los precios de alimentos como carnes, productos lácteos y pescados. Las leguminosas brindan una solución viable proporcionando una dieta saludable (rica en proteínas de origen no animal) a bajo costo. Se estima que para



el 2050 la producción agrícola de plantas leguminosas aumentara en un 70% para poder abastecer a la población (FAO *et al.*, 2021).

Adicionalmente, las leguminosas son un cultivo de gran interés por su adaptabilidad importante para enfrentar el cambio climático. Las consecuencias del cambio climático durante los últimos años han sido altas temperaturas, sequía, inundaciones, etc. Las leguminosas han desarrollado mecanismos adaptativos y de ajuste para contrarrestar los efectos de la sequía (Khatun *et al.*, 2021). Esta característica ha permitido cultivos de leguminosas en países en vías de desarrollo con problemas graves de escasez de agua. Se estima que casi el 90% de los cultivos de leguminosas se realizan en tierras con problemas de sequía, por lo que su estudio hoy en día es esencial para descubrir módulos genéticos importantes para mejorar la resistencia a la sequía, con el fin de poder enfrentar problemas futuros (FAO, 2016).

A pesar de que las actividades industriales han sido las más relacionadas con el cambio climático, hoy en día sabemos que los sectores de la ganadería y la agricultura también contribuyen de forma significativa a la emisión de gases de efecto invernadero. En el caso de la agricultura se conoce que la producción de los fertilizantes sintéticos requiere de una gran cantidad de quema de combustibles fósiles. Las leguminosas no requieren fertilizantes nitrogenados sintéticos debido a que a través de la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno fijan el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) obtienen el nitrógeno suficiente para crecer y desarrollarse. Por dicha característica, las leguminosas han sido utilizadas como cultivos de rotación, debido a que pueden añadir entre 30 y 40 kg de nitrógeno asimilable (e.g., amonía:  $NH_4$ ) por cada hectárea de suelo arable. Estas rotaciones estimulan la fertilidad y productividad del terreno, enriqueciéndola de fuentes de nitrógeno. Por esta razón, las leguminosas son cultivos muy importantes en los ecosistemas agrícolas, manteniendo los suelos viables y fértiles. Asimismo, contribuyen a la mitigación del cambio climático reduciendo la dependencia de los fertilizantes sintéticos utilizados para aportar nitrógeno al suelo (Jensen *et al.*, 2012).



**Figura 1.1. Producción de cultivos de leguminosas en América central y Caribe.** El frijol es la leguminosa más importante en América Central y el Caribe, a nivel mundial también es considerado uno de los principales cultivos. Proporciona proteínas, hidratos de carbono complejos y micronutrientes valiosos a más del 4% de la población global. En México, el frijol representa la leguminosa con mayor producción (1 719 mil toneladas al año) y es considerado la segunda fuente más importante de calorías después del maíz (Imagen tomada de FAO, 2016).

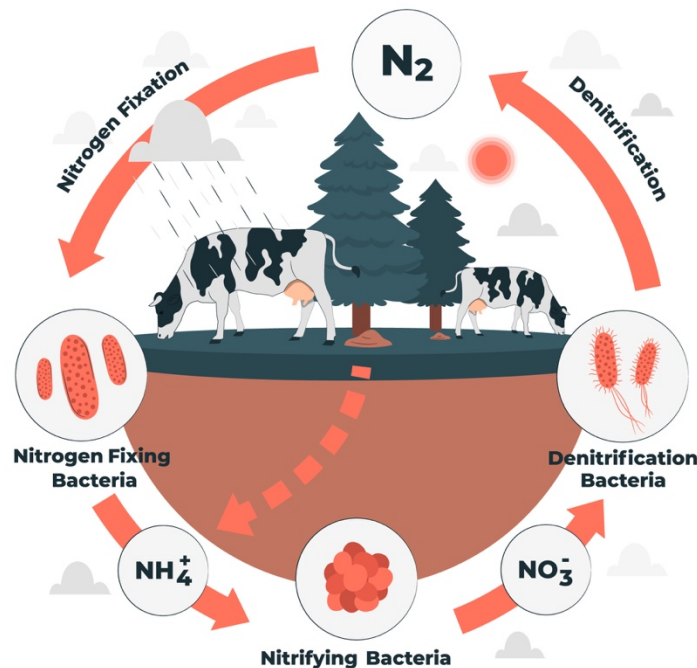
En México el frijol (*Phaseolus vulgaris*) se considera como un alimento básico e importante para el consumo humano (Castro-Guerrero *et al.*, 2016). Su origen y domesticación ha permitido incorporarlo por generaciones y de manera muy importante a la dieta de los mexicanos. En la figura 1.1 se muestra la producción de diversas leguminosas en América central y Caribe. El frijol es el cultivo de leguminosas con mayor producción en México. Representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas de la población, con consumo promedio anual de 10.5 kilogramos por persona. Debido a que México es uno de los dos centros de origen del frijol, hoy en día cuenta con la mayor diversidad de especies. Existen alrededor de 150 especies de frijol, de las cuales 70 se encuentran en México. Estos datos indican su importancia en México, por lo que su estudio es clave para preservar su diversidad y asegurar la producción por generaciones (SAGARPA, 2017).

## 1.2. Capítulo II. Importancia del nitrógeno.

Las plantas incluyendo las leguminosas, requieren de nutrimentos que son indispensables para su crecimiento y desarrollo. Estos nutrimentos los obtienen del suelo a través de sus raíces. Uno de los elementos más importantes para el desarrollo de las plantas es el nitrógeno. Las plantas pueden tomar el nitrógeno del suelo en forma inorgánica como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), o de forma orgánica como aminoácidos y urea. Sin embargo, el  $\text{NO}_3^-$  es la principal forma en la que las plantas captan y asimilan el N (Xu *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2016). La absorción de  $\text{NO}_3^-$  por las raíces se logra mediante el transporte activo, posteriormente es reducido a  $\text{NO}_2^-$  y finalmente transportado hacia órganos demandantes (Xu *et al.*, 2012).

El nitrógeno es uno de los elementos más dinámicos en el suelo; es decir, es un nutriente que se convierte en múltiples formas químicas. Como se muestra en la figura 1.2, durante el ciclo del nitrógeno algunas bacterias, a partir de materia orgánica, convierten los compuestos nitrogenados en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Posteriormente, las bacterias nitrificantes convierten el  $\text{NH}_4^+$  en nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitritos. Algunos organismos procariontes desnitrificantes convierten los  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{N}_2$ . Finalmente el  $\text{N}_2$  puede ser reincorporado al suelo a través de procesos abióticos y bióticos. Los procesos abióticos que logran incorporar el N al suelo son los rayos. Los procesos bióticos son a través de organismos diazotófos que fijan el N por medio de la enzima nitrogenasa (Bernhard, 2010).

A pesar de que el nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, con frecuencia se encuentra poco disponible o inaccesible en el suelo. Su baja disponibilidad limita el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que la disponibilidad de nitrógeno es el factor más limitante en los cultivos agrícolas. El nitrógeno es un elemento que se encuentra de forma abundante en la atmósfera en su forma dimolecular ( $\text{N}_2$ ), constituyendo casi el 80 % de la composición total de los gases atmosféricos. Sin embargo, existen muy pocos organismos capaces de tomar el  $\text{N}_2$  e incorporarlo en biomoléculas.

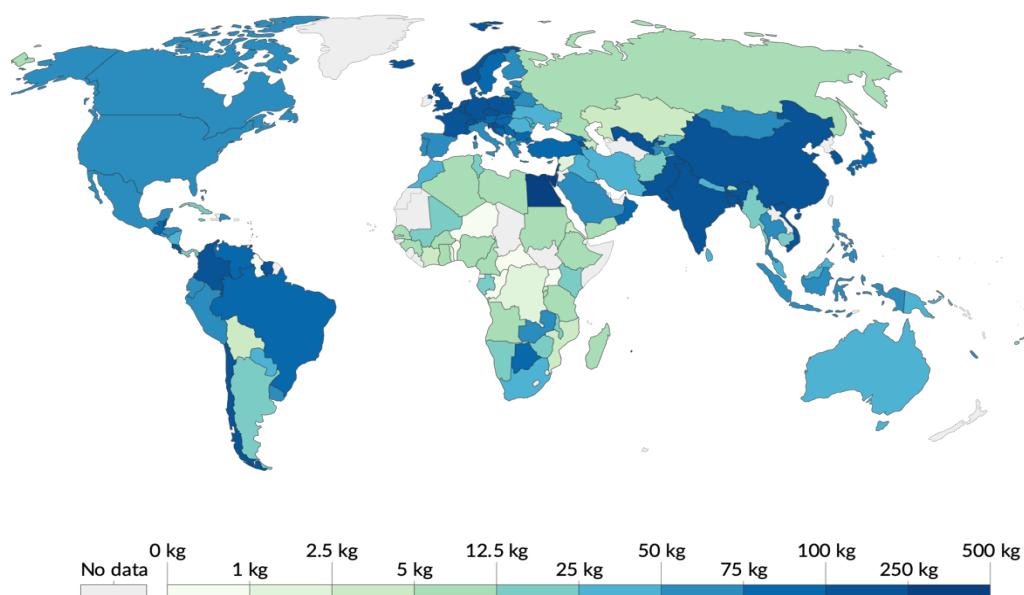


**Figura 1.2. Ciclo del Nitrógeno.** El ciclo del nitrógeno está compuesto por distintas etapas como; 1) Fijación. La fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico a las plantas, gracias a algunos microorganismos. Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ). 2) Nitrificación o mineralización. El amonio se convierte a nitrato gracias a los microorganismos por medio de la nitrificación. 3) Desnitrificación. La reducción de los nitratos ( $NO_3^-$ ) a nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ), y amonio ( $NH_4^+$ ) a amoníaco ( $NH_3$ ), se llama desnitrificación (Imagen tomada de recursos freepik.com).

Los organismos capaces de fijar el  $N_2$  se denominan diazotrofos, cuyo genoma codifica para los componentes del complejo enzimático nitrogenasa. La nitrogenasa es un complejo enzimático que cataliza la reducción de  $N_2$  a amonio (Isidra *et al.*, 2021). Algunos de estos organismos pueden fijar el  $N_2$  en vida libre enriqueciendo los suelos para el crecimiento de las plantas. Mientras que otros organismos fijan  $N_2$  en asociaciones simbióticas con plantas, principalmente del grupo de las leguminosas.

### 1.3. Capítulo III. Fertilizantes nitrogenados sintéticos

En 1905, Fritz Haber desarrolló una tecnología que revolucionó al mundo logrando fijar el  $N_2$  en amonio. A través del empleo de altas temperaturas y alta presión logró combinar el hidrógeno y el  $N_2$ . Años después, este proceso fue mejorado a una escala industrial por Carl Bosch. Ante tales contribuciones, a esta tecnología se le conoció como el “Proceso Haber-Bosh”, por lo que ambos investigadores recibieron el Premio Nobel de Química en 1918 y en 1931, respectivamente. Este descubrimiento fue considerado por muchos como uno de los avances más significativos del siglo XX. Este proceso permitió la producción en masa de fertilizantes nitrogenados sintéticos y condujo a un aumento masivo de la producción agrícola para consumo humano.



**Figura 1.3. Uso de fertilizantes nitrogenados por hectárea de tierra de cultivo.** Mapa mundial que muestra el uso fertilizante nitrogenados por país. La escala de color indica cantidades de fertilizante en kg por hectárea de tierra de cultivo. Esta escala va desde el color blanco que indica 0 kg/ha hasta color azul oscuro que indica 500 kg/ha. México representa uno de los países con alto nivel en uso de fertilizantes nitrogenados para la agricultura en un rango de uso de 75 kg a 100 kg por hectárea de tierra de cultivo (Imagen tomada de FAO, 2017).

Hoy en día el proceso Haber-Bosh produce más del 90% del amonio del mundo, y alimenta al 40% de la población mundial (Cherkasov *et al.*, 2015). En la figura 1.3 se muestra el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos en todo el mundo, donde México aplica cerca de 50 a 100 kg de fertilizante por hectárea de cultivo. Durante décadas se creyó que el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos resolvería definitivamente el problema de escasez de nitrógeno en suelos arables. Sin embargo, esta producción también tiene un alto costo, se estima que consume alrededor del 2% de la energía global disponible cada año. Dado que esta energía proviene de la quema de combustibles fósiles, este proceso emite más de 300 millones de toneladas de dióxido de carbono al año (Tanabe *et al.*, 2013). Adicionalmente, la quema de combustible también genera la emisión de óxido nitroso, que es uno de los principales gases de efecto invernadero. Se estima que cerca del 74 % de la emisión total de este gas se genera en la producción de fertilizantes sintéticos.

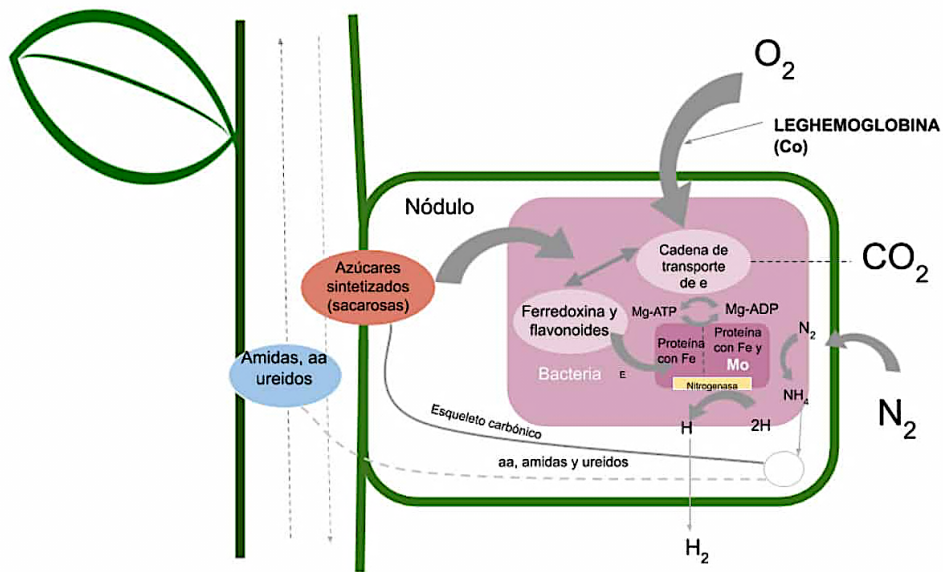
Es difícil estimar el aprovechamiento de los fertilizantes sintéticos en los sistemas agrícolas. Sin embargo, se estima que las plantas únicamente aprovechan entre el 25% y 50% del total del fertilizante aplicado. El resto del fertilizante se lixivia a los mantos acuíferos, lagos y costas cercanos a las zonas de cultivo (Hirel *et al.*, 2011). Esto causa un problema muy severo en el medio ambiente contribuyendo de forma significativa al calentamiento global y a la contaminación de áreas naturales. Se estima que el 52% de los problemas relacionados con la contaminación de tierras, mantos acuíferos y la lluvia ácida es ocasionada por el proceso Haber-Bosh (Voet, 1996). Si consideramos que las leguminosas fijan alrededor de 60 millones de toneladas métricas de nitrógeno fijado al año a nivel mundial (Smil,1999), comprender y mejorar estas asociaciones simbióticas podría representar importantes beneficios nutricionales, económicos y ambientales para el mundo.

#### 1.4. Capítulo IV. Fijación Simbiótica de Nitrógeno

Como ya se mencionó anteriormente, las leguminosas como *P. vulgaris* desarrollaron la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (rhizobios). Este proceso es conocido como Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) y es uno de los procesos más importantes que permite la conversión de  $N_2$  a formas asimilables como amonio. Para este proceso, las leguminosas desarrollan un nuevo órgano llamado nódulo. El nódulo es un órgano especializado, donde se albergan los rhizobios para llevar a cabo la FSN.

Una vez formado el nódulo, se ejerce un constante intercambio de nutrientes y fuentes de carbono entre ambos simbioses. La eficiencia de este intercambio es crítica para mantener la simbiosis. Como se muestra en la figura 1.4, por una parte la planta transporta fuentes de carbono (derivados de la fotosíntesis) y diferentes nutrimentos minerales (e.g., fósforo, hierro y molibdeno) hacia los rhizobios. El carbono transportado hacia los rhizobios se encuentra principalmente en forma de malato proveniente del ciclo del ácido tricarboxílico. Este aporte es fundamental para que los rhizobios obtengan la energía necesaria para la síntesis y ensamblaje del complejo de la nitrogenasa, así como para reducir el  $N_2$  en formas asimilables como amonio. Esta enzima está conformada por dos subunidades; la subunidad catalítica denominada dinitrogenasa, y la subunidad donadora de electrones dependiente de ATP denominada dinitrogenasa reductasa.

Para que la enzima nitrogenasa trabaje de manera óptima se requiere controlar los niveles de  $O_2$  en el nódulo. Las altas concentraciones de  $O_2$  pueden inactivar de manera irreversible a la nitrogenasa; sin embargo, el  $O_2$  es necesario para cubrir la demanda energética de las células del nódulo durante el proceso de fijación. Para poder controlar los niveles exactos de  $O_2$  en el nódulo se requiere de una proteína especializada conocida como leghemoglobina. La función de esta hemoproteína es transportar de manera muy eficiente el  $O_2$  hacia las mitocondrias para la respiración celular, y evitar un aumento en el  $O_2$  libre. De esta manera la función de la leghemoglobina permite el óptimo funcionamiento de la enzima nitrogenasa durante la FSN (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Fijación simbiótica de nitrógeno e intercambio de nutrientes.** Durante la FSN se lleva a cabo un intercambio activo de nutrientes entre la leguminosa y los bacteroides. La planta transporta azúcares derivados de la fotosíntesis hacia los nódulos. Dentro del nódulo se lleva a cabo la fijación de nitrógeno a través de la enzima nitrogenasa. La leghemoglobina transporta el  $O_2$  dentro del nódulo para la respiración celular con el fin de obtener energía. Una vez fijado el N, es incorporado a aminoácidos y a ureidos, los cuales posteriormente son transportados hacia los demás órganos de la planta (Imagen tomada de Agroestrategias consultores).

Una vez que el  $N_2$  se fija, el amonio se transporta al citoplasma de las células vegetales. Posteriormente el amonio se incorpora a aminoácidos (como asparagina y glutamina) en el caso de *M. truncatula* o a ureidos (alantoína y alantoato) como en el caso de *P. vulgaris* (Figura 1.4). Este proceso se realiza a través del ciclo Glutamina sintetasa (GS)-Glutamato sintetasa (GOGAT: GS/GOGAT), en donde la enzima glutamina sintetasa es un componente clave en la asimilación de amonio en las células vegetales. En una reacción dependiente de ATP, esta enzima cataliza la condensación del glutamato y el amonio para formar glutamina. La inhibición de la actividad de esta enzima afecta el crecimiento y desarrollo de nódulos, desencadenando la senescencia de los mismos. Esto refuerza que el intercambio de nutrientes es clave durante esta simbiosis. Finalmente, cuando el amonio se incorpora a aminoácidos o ureidos, éstos se exportan hacia los diferentes órganos de la planta, principalmente a las hojas (Udvardi *et al.*, 2013).



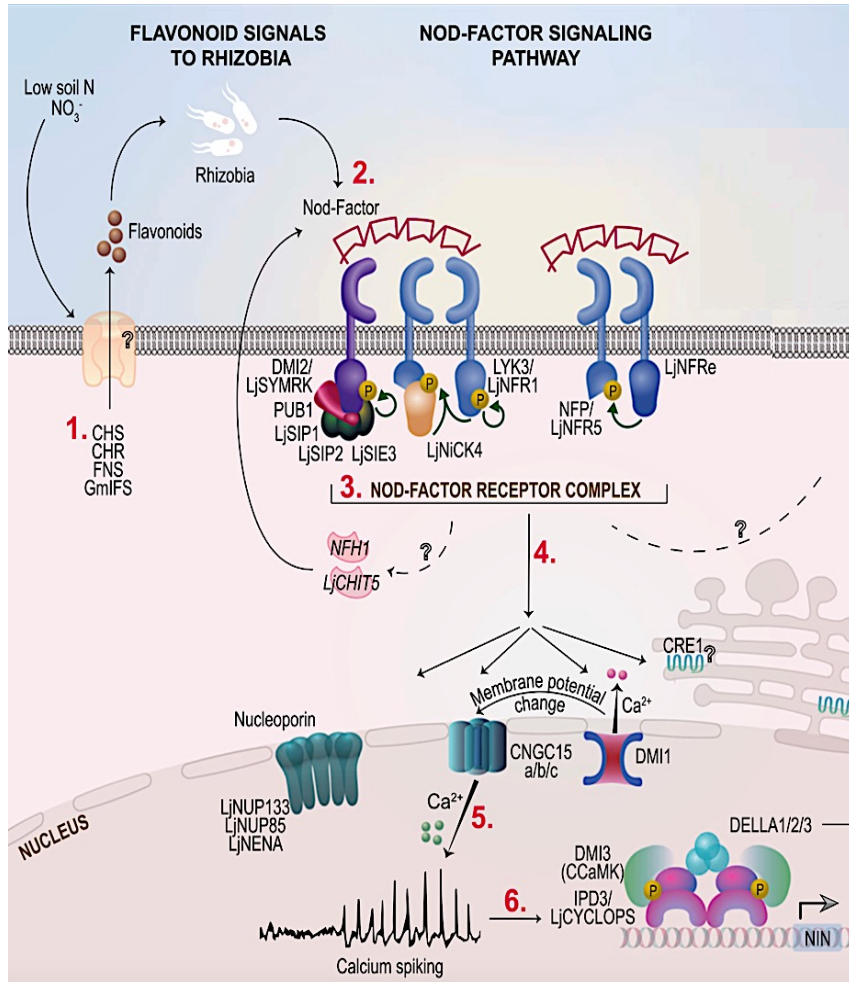
## 1.5. Capítulo V. Establecimiento de la simbiosis

El establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rhizobios se da únicamente cuando la planta hospedera experimenta deficiencia de nitrógeno. Ante esta situación, la leguminosa se comunica molecularmente con los rhizobios de la rizósfera. Para ello, la leguminosa hospedera secreta flavonoides e isoflavonoides (Venkateshwaran *et al.*, 2013; Oldroyd, 2013). Estos metabolitos secundarios son detectados por los rhizobios compatibles, los cuales, en respuesta, secretan lipo-chito-oligosacaridos con diversas decoraciones químicas denominados Factores de Nodulación (FNs) (Dénarié *et al.*, 1996). Los flavonoides e isoflavonoides, además de activar la biosíntesis de los FNs, quimioatraen a los rhizobios hacia la parte apical de los pelos radicales, en donde secretan los FNs. Estas moléculas rhizobiales son el producto de la expresión de los genes bacterianos *nod*, y su estructura química determina la compatibilidad con la leguminosa hospedera (Dénarié *et al.*, 1996). Como se muestra en la figura 1.5, los FNs se detectan en los pelos radicales a través de los receptores heterodiméricos tipo cinasa, tales como *LjNFR1* y *LjNFR5* (por sus siglas en inglés: Nod Factor Receptor 1/5) en *L. japonicus* y *MtLYK3* (por sus siglas en inglés: LysM Receptor Kinase 3) y *MtNFP* (por sus siglas en inglés: Nod Factor Perception) en *M. truncatula*. Así como por el receptor NFR<sub>e</sub> (por sus siglas en inglés de Nod Factor Receptor epidermal). Estos receptores membranales son de tipo cinasa y contienen motivos tipo lisina, que forman dominios extracelulares (Radutoiu *et al.*, 2003; Broghammer *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2018). Para la transducción de la señal de los FNs, se requiere el acoplamiento de una proteína cinasa que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK). Esta proteína se conoce como *LjSYMRK* en *L. japonicus* y *MtDMI2* (por sus siglas en inglés: Does not Make Infections 2) en *M. truncatula* y su función principal es actuar como correceptor de los FNs, así como participar en la transducción de la señal a través de su actividad cinasa, fosforilando componentes río abajo (Figura 1.5). Uno de los componentes que se activan por *MtDMI2* es *MtPUB1* (por sus siglas en inglés PLANT U-BOX PROTEIN1) la cual es una ubiquitina E3 ligasa inducida por FNS. Las mutantes *Mtpub1-1* muestran un mayor número de nódulos así como un mayor número de eventos de infección. Por lo que se puede concluir que esta proteína actúa como regulador

negativo de la nodulación. Su silenciamiento afecta la actividad de otras proteínas asociadas a *MtDMI2* como SIPs (por sus siglas en inglés SYMRK INTERACTING PROTEINS), *LjSIP2* y *LjSIE3* (por sus siglas en inglés SYMRK INTERACTING E3 UBIQUITIN LIGASE). Esto sugiere que su actividad esta asociada a un complejo proteico como se muestra en la figura 1.5.

Posteriormente, la percepción de los FNs desencadena flujos calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el núcleo, las cuales se conocen como oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ehrhardt *et al.*, 1996; Kosuta *et al.*, 2008; Sieberer *et al.*, 2009). Los patrones de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se generan por la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  *LjCASTOR* y *LjPOLLUX / MtDMI1* (por sus siglas en inglés: Does not Make Infections 1) (Ané *et al.*, 2004; Kanamori *et al.*, 2006; Charpentier *et al.*, 2016). También participan los canales *MtCNGC* (por sus siglas en inglés CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNELS), así como las subunidades de Nucleoporinas como lo son *LjNENA*, *LjNUP85* y *LjNUP133* (NUCLEOPORIN).

Se ha propuesto que la enzima *MtHMGR1* (methylglutaryl-coenzyme A reductase 1) que participa en la biosíntesis de mevalonato puede activar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kevei *et al.*, 2007; Capoen *et al.*, 2011). Se ha propuesto que su principal papel podría ser la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo central para la trasmisión de la señal de la membrana plasmática hacia el núcleo. Se ha demostrado que el silenciamiento del gen que codifica para esta enzima afecta de forma significativa la activación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kevei *et al.*, 2007; Capoen *et al.*, 2011). Su función desencadena la activación de ENOD11(Early nodulin-11), una nodulina temprana que se activa a través de esta vía. Por lo que su función esta localizada río abajo de *MtDMI2* y río arriba de *MtDM1*(Venkateshwaran *et al.*, 2015). A pesar de estas evidencias, aún no se conoce como es que *MtHMGR1* se activa por *MtDMI2* ni tampoco se conoce la forma en que activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el núcleo. Otras investigaciones, han propuesto a otro regulador conocido como EPP1 (por sus siglas en inglés: Early Phosphorylated Protein 1). A diferencia de *MtHMGR1*, se ha comprobado que EPP1 y *MtDMI2* interaccionan físicamente. Esta proteína se identificó a través de un estudio fosfoproteómico en *M. truncatula* (Rose *et al.*, 2012). En este estudio se demostró EPP1 se fosforila inmediatamente después de la percepción de los NFs. Adicionalmente, su silenciamiento génico inhibe por completo las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Valdés-López *et al.*, 2019).



**Figura 1.5. Vía de señalización temprana para la activación de genes esenciales en la simbiosis.** En las primeras etapas de la simbiosis la leguminosa libera a la rizosfera flavonoides. En respuesta el rhizobio produce Factores de Nodulación. La detección de los Factores de Nodulación a través de receptores (NFR1 y NFR1) y co-receptores (SYMRK) membranales. La detección de los Factores de Nodulación activa una serie de eventos moleculares, que incluye la fosforilación de proteínas y oscilaciones de  $Ca^{2+}$  nuclear. Las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  se activan por canales de  $Ca^{2+}$  (DMI1 y CNGC15), así como por nucleoporinas (NUP133, NUP85 y NENA). Es necesaria la decodificación de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  para la activación de diversos factores de transcripción (e.g., NIN) que, a su vez, son necesarios para activar los programas de infección rhizobial y desarrollo de los nódulos. (Imagen tomada de Roy *et al.*, 2020).

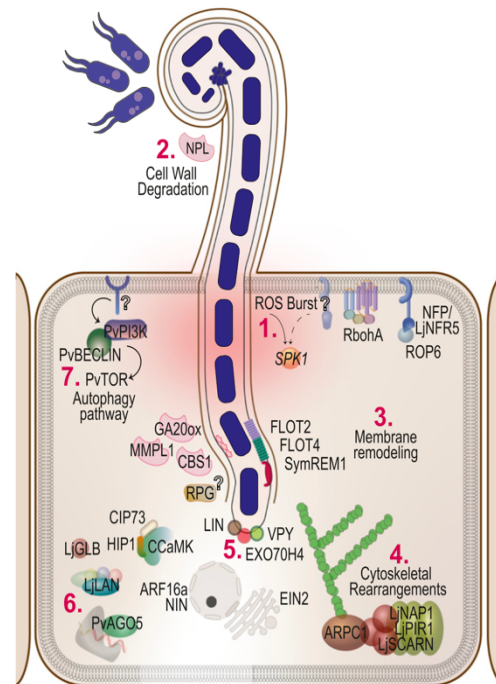
La mutación de EPP1 que genera una versión fosforilada activa o fosfomutante puede restablecer las deformaciones de los pelos radicales en las mutantes de *dmi2*. Asimismo, EPP1 es capaz de activar genes simbióticos en este mismo fondo genético mutante de *dmi2*. Estos estudios exhiben la importancia de EPP1, sin embargo, hasta el día de hoy se mantienen investigaciones con el fin de precisar el papel que tiene EPP1 en la decodificación de los NFs.

Una vez que se activan las oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , la señal es decodificada en el núcleo por *LjCCaMK /MtDMI3* (Swainsbury *et al.*, 2012). *LjCCaMK /MtDMI3* es una proteína de tipo cinasa dependiente de calmodulina (CaM) y  $Ca^{2+}$  que actúa como sensor del aumento de  $Ca^{2+}$  en el núcleo. Una vez activa, *LjCCaMK /MtDMI3* interactúa con el factor de transcripción *LjCYCLOPS/MtIPD3* formando un complejo preensamblado inactivo (Figura 1.5). Posteriormente, *LjCCaMK /MtDMI3* fosforila a *LjCYCLOPS/MtIPD3*, lo que genera un cambio conformacional que libera el dominio de unión al ADN de este factor de transcripción. Este cambio conformacional permite que *LjCYCLOPS/MtIPD3* se una a las cajas CYC presentes en el promotor del gen *NIN* (por sus siglas en inglés: Nodule Inception), un factor transcripcional con un papel determinante en esta simbiosis (Miller *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014). La activación del factor transcripcional NIN es un paso esencial en la cascada de señalización debido a que coordina la transcripción de una red de genes con diversas funciones en prácticamente cada etapa de esta simbiosis. Entre los genes que activa NIN de forma directa se encuentran *NF-YA*, *NF-YB* y *NF-YC* (por sus siglas en inglés: Nuclear Factor Y Complex A/B/C) (Soyano *et al.*, 2013). Esto lo hace a través de su dominio RWP-RK de unión al ADN, y lo hace en sitios conocidos como NBSs (por sus siglas en inglés NIN-Binding nucleotide Sequences) (Schauser *et al.*, 1999). Existen muchos más genes que se regulan de forma directa e indirecta por NIN, y que además están involucrados en cada una de las etapas de la simbiosis (Figura 1.5). NIN regula genes asociados a la colonización del rhizobio, a la organogénesis del nódulo, al proceso de Autorregulación de la Nodulación (AON), a procesos de mantenimiento del rhizobio, a la fijación de nitrógeno y también relacionados a la senescencia del nódulo (Yoro *et al.*, 2014; Soyano *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). Por las razones antes expuestas, NIN se considera como el regulador maestro en esta simbiosis y su participación se abordará a detalle en los capítulos siguientes.

## 1.6. Capítulo VI. Proceso de colonización

Las respuestas moleculares anteriormente descritas forman parte del primer programa genético, el cual controla las etapas iniciales de esta simbiosis, incluyendo el proceso de colonización/infección rhizobial. Este programa regula principalmente la reorganización del citoesqueleto del pelo radical, permitiendo que éstos se deformen y atrapen al rhizobio como se muestra en la figura 1.6. Para que esto ocurra, se generan estallidos rápidos y transitorios de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son importantes para la formación de una estructura conocida como “cámara infectiva” (Marino *et al.*, 2011; Arthikala *et al.*, 2017). En esta fosa de infección es donde queda atrapada una unidad formadora de colonias de rhizobios (Marino *et al.*, 2011; Arthikala *et al.*, 2017). Subsecuentemente, ocurre la invaginación de la pared y membrana celular del pelo radical, lo cual da paso a la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección “IT” (por sus siglas en inglés Infection Thread). Para este proceso, la pared celular se modifica mediante la enzima NODULE PECTATE LYASE (NPL), (Figura 1.6) (Xie *et al.*, 2012). En *P. vulgaris*, se conoce que RbohA, enzima generadora de ROS, juega un papel importante en la colonización rhizobial. Durante la interacción con rhizobios, RbohA se localiza tanto en la cámara infectiva como en el hilo de infección. Su silenciamiento génico atenúa la progresión del hilo de infección por donde ingresan los rhizobios (Arthikala *et al.*, 2017). Esto demuestra la importancia de ROS durante los procesos de colonización para establecer la simbiosis. La importancia de este hilo de infección es que a través del mismo los rhizobios son guiados hasta las células corticales de la raíz (Haney *et al.*, 2011). Existen otros componentes esenciales para la formación del hilo de infección, los cuales participan principalmente en la reorganización celular del pelo radical. Las proteínas SCAR / WAVE son elementos que impulsan el ensamblaje de actina, para la posterior formación de microfilamentos (Yokota *et al.*, 2009). Adicionalmente, durante el proceso de formación del hilo de infección participan proteínas de tráfico de membranas como FLOT2 y FLOT4. Las flotilinas son proteínas membranales que forman microdominios y participan en la invaginación de la pared celular (Haney *et al.*, 2010). En el caso particular de FLOT2 desempeña un papel en la invaginación de la membrana plasmática para la formación del

IT, mientras que FLOT4 desempeña un papel clave en el alargamiento y en la progresión del IT (Figura 1.6) (Winzer *et al.*, 1999; Haney *et al.*, 2010).



**Figura 1.6. Proceso de Infección.** El proceso de colonización por parte del rizobio hacia la planta se realiza a través de los pelos radicales. Este proceso inicia con la deformación del pelo radical, esta deformación que consiste en un enroscamiento del ápice del pelo radical que permite agrupar a los rizobios en el centro. Posteriormente a través de la degradación de la pared celular se forma la cámara de infección y subsecuentemente se forma el hilo de infección. Estas estructuras permiten a los rizobios penetrar hacia las células del córtex. Este proceso está coordinado por muchos componentes como se muestra en la imagen. Este proceso incluye la degradación de la pared celular, el remodelaje de la membrana, el reacomodo del citoesqueleto, entre otros (Imagen tomada de Roy *et al.*, 2020).

Otros de los componentes genéticos clave en la progresión del hilo de infección son VAPYRIN (VPY), Lumpy Infection (LIN) y EXO70 H4 (Kuppusamy *et al.*, 2004; Pumplin *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2011). Estos tres componentes forman un complejo conocido como “infectosoma”, que participa en el crecimiento polar y alargamiento del IT hacia las células corticales (Liu *et al.*, 2019). La función de estos componentes se descubrió debido a

que la mutación en cualquiera de estos componentes impide el alargamiento del hilo de infección, por lo que su función es importante para que los rhizobios ingresen hasta las células del córtex (Liu *et al.*, 2019).

Finalmente, cuando el hilo de infección llega hasta las células del córtex se ramifica para permitir la liberación de los rhizobios en estas células. Para que esto ocurra, los rhizobios son recubiertos por una membrana vegetal (Roth *et al.*, 1989), a lo que se le conoce como “simbiosoma” (Roth *et al.*, 1989). Una vez que los rhizobios son recubiertos por estas membranas se liberan en las células del córtex, a través de exocitosis. En donde a través del transporte y fusión de vesículas los rhizobios se reparten a las distintas células vegetales (Ivanov *et al.*, 2012). Este proceso está mediado por los complejos SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Protein Receptor) (Ivanov *et al.*, 2012). En *M. truncatula* se han identificado dos complejos SNARE; MtVAMP721d y MtVAMP721e (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN). El silenciamiento de los genes que codifican para estos complejos bloquea la liberación de los rhizobios del IT hacia las células del córtex e impiden la formación del simbiosoma (Ivanov *et al.*, 2012). En *L. japonicus* se identificaron LjVAMP72a y LjVAMP72b, cuyo silenciamiento afecta el número de bacteroides resultando en una reducción significativa en la FSN (Figura 1.6) (Hakoyama *et al.*, 2012; Sogawa *et al.*, 2019).

Por su parte los rhizobios dentro de los simbiosomas se diferencian, crecen y se dividen. El proceso de diferenciación implica la elongación del rhizobio, endoreduplicación del DNA y pérdida de viabilidad como organismo de vida libre (Mergaert *et al.*, 2006). Cuando ocurre esta diferenciación los rhizobios se convierten en “bacteroides” (Cebolla *et al.*, 1999; Mergaert *et al.*, 2006). Estos cambios permiten que los bacteroides activen la síntesis y ensamblaje del complejo de la enzima nitrogenasa. Para que, posteriormente una vez formado el nódulo, los rhizobios fijen el N atmosférico y lo liberen en forma de amonio, a cambio de fuentes de carbono derivados de la fotosíntesis (Udvardi *et al.*, 2013).

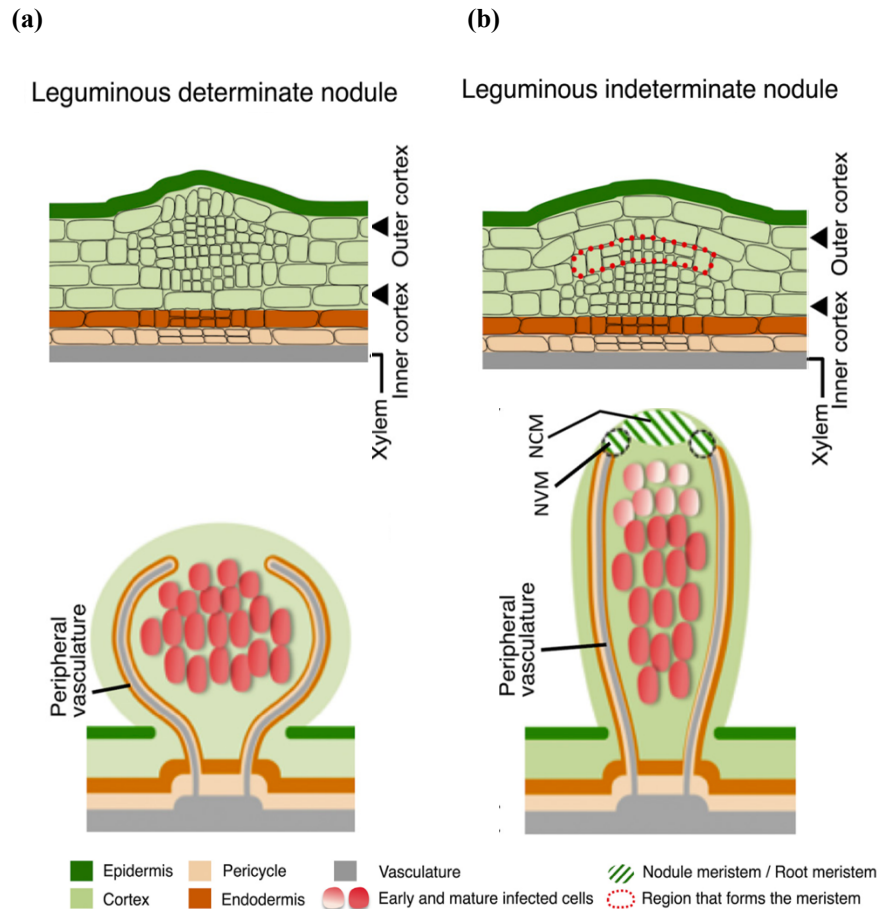
## 1.7. Capítulo VII. Desarrollo del nódulo

Para que el proceso de organogénesis del nódulo ocurra, se requiere que las células de la epidermis, córtex y del periciclo estén comunicadas. Esta comunicación se regula por la actividad de la enzima MtBG2 ( $\beta$ -1,3-glucanase) y por el factor de transcripción NIN. En *M. truncatula* se ha demostrado que la enzima BG2 promueve la conectividad simplástica a través de la degradación de calosa (Gaudioso-Pedraza *et al.*, 2018). Esta conectividad permite que la transcripción de *NIN* se active nuevamente, pero ahora en las células del córtex y periciclo. Esta activación transcripcional de *NIN* puede estar mediada por las citocininas (Liu *et al.*, 2019). A través de esta señalización, NIN activa la expresión de genes que codifican para otros factores de transcripción como NF-YA, NF-YB y NF-YC. Estos factores de transcripción forman un complejo heterotrimérico, el cual se une al elemento *cis CCAAT* y coordinan la transcripción de nodulinas (Soyano *et al.*, 2013). Estas nodulinas promueven la división de células corticales activando la organogénesis del nódulo.

Durante este proceso las hormonas también juegan un papel esencial. La concentración y el balance hormonal entre las citocininas y auxinas es muy importante para llevar a cabo la organogénesis del nódulo (Heckmann *et al.*, 2011). Por un lado, las citocininas regulan la división celular que conduce a la formación del primordio nodular. La biosíntesis de citocininas está mediada por isopentenil transferasa 3 (IPT3) (Chen *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2017; Mens *et al.*, 2018). Su percepción es mediada por el receptor *MtCRE1 / LjLHK1*, lo cual es determinante para la activación de la división celular (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007). La sola sobreexpresión de *MtCRE1 / LjLHK1* conduce a la formación de primordios nodulares sin la presencia de rhizobios, sugiriendo que las citocininas tienen un papel principal en el desarrollo del nódulo (Held *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2017). Para el caso de las auxinas, se ha propuesto que juega un papel importante tanto en el proceso de infección como en la organogénesis (Roy *et al.*, 2017). Inclusive, se ha demostrado que esta fitohormona, en etapa tempranas de esta simbiosis, se acumula en los pelos radicales (Breakspear *et al.*, 2014). Su biosíntesis tiene un papel funcional en la promoción de eventos de infección simbiótica en la epidermis (Breakspear *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2017). Por otro lado, durante la organogénesis del nódulo también juega un papel importante



debido a que también muestra una acumulación local en células del periciclo, endodérmicas y corticales internas (Breakspear *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2017).



**Figura 1.7. Formación y tipos de nódulos.** El desarrollo de nódulos inicia cuando las células del córtex se activan y comienzan a dividirse. Existen dos tipos de nódulos de acuerdo con la persistencia del meristemo nodular. (a) Los nódulos determinados; los cuales se desarrollan a partir del córtex medio y externo y son formados por un meristemo transitorio, el cual desaparece en nódulos maduros. Poseen una forma predominantemente esférica y se componen de una sola zona donde ocurre la fijación de nitrógeno. (b) Los nódulos indeterminados; se forman a partir de células del córtex interno, y se caracterizan por mantener su meristemo durante toda la simbiosis. Adicionalmente, los nódulos indeterminados poseen una forma alargada y diferentes zonas bien diferenciadas: meristemo (zona I), zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV) (Imagen tomada de Soyano *et al.*, 2021).

Tanto las auxinas como las citocininas mantienen una estrecha relación. Como ya se ha mencionado anteriormente, las citocininas promueven la transcripción de *NIN* en células del periciclo (Schiessl *et al.*, 2019). A su vez *NIN* regula la transcripción del gen *LOB-DOMAIN PROTEIN 16* (*LBD16*). Este gen promueve la biosíntesis de auxinas a través de la regulación de *STYLISH* (*STY*) y *YUCCA* (*YUC*) importantes en este proceso (Schiessl *et al.*, 2019). Lo anterior indica que las citocininas facilitan la acumulación de auxina local a través de la promoción de *NIN* y de *LBD16*.

Todos estos procesos de señalización son importantes para la organogénesis del nódulo. A pesar de que estos programas están conservados, las leguminosas desarrollan dos tipos de nódulos como se muestra en la figura 1.7. Los nódulos determinados que poseen una forma esférica, y que se desarrollan en plantas asociadas a climas cálidos como *P. vulgaris*, *G. max* y *L. japonicus*. Los nódulos indeterminados que poseen una forma alargada, y se desarrollan en plantas asociadas a climas templados como *M. truncatula* (Figura 1.7) (Hadri *et al.*, 1998; Oldroyd *et al.*, 2011). Otra de las diferencias entre estos nódulos, es que los indeterminados poseen zonas en el nódulo bien diferenciadas y un meristemo persistente, mientras que los nódulos determinados carecen de dicha estructura y meristemo. Las zonas que posee el nódulo indeterminado se clasifican en: Zona meristemática (Zona I), Zona de infección (Zona II), Zona de fijación de nitrógeno (Zona III) y la Zona de senescencia (Zona IV). En el nódulo determinado no hay zonas diferenciadas, únicamente hay una zona homogénea en la parte central del nódulo donde se lleva a cabo la FSN (Figura 1.7).

## **1.8. Capítulo VIII. Autorregulación de la nodulación**

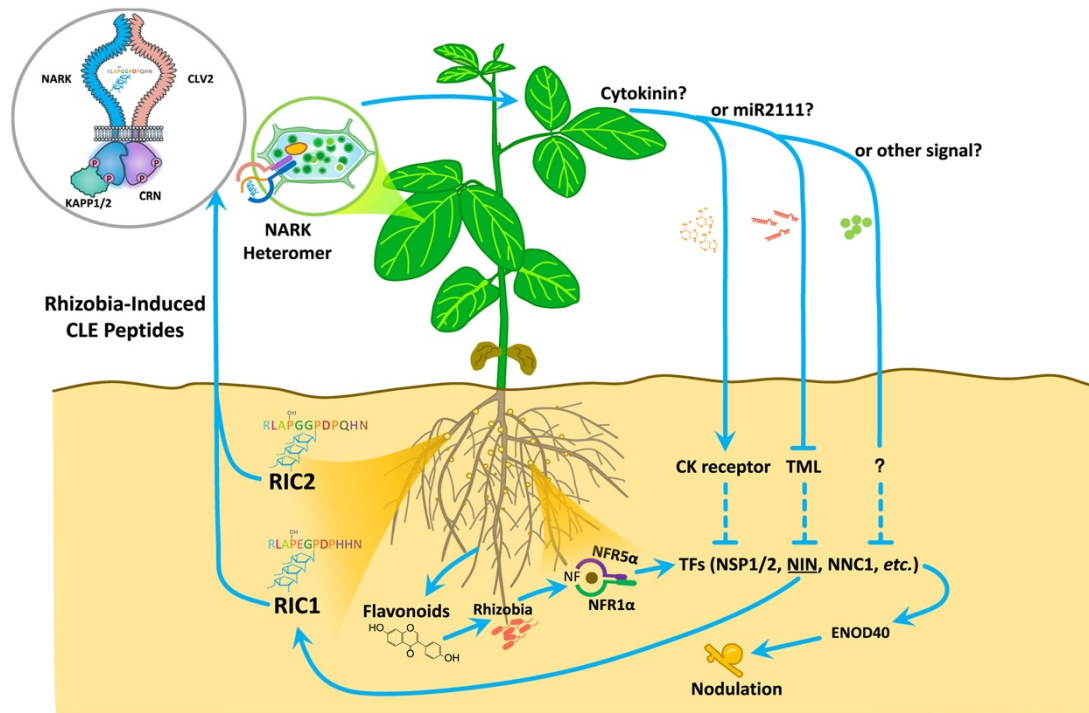
Se estima que las leguminosas destinan aproximadamente 6 g de carbono fotosintético para obtener un gramo de N fijado mediante la simbiosis con rizobios (Vance *et al.*, 1991). En términos de energía en forma de ATP, se estima que para fijar una molécula de  $N_2$  atmosférico se requiere invertir 16 ATPs. Sin embargo, si se considera el costo energético asociado al complejo nitrogenasa y al reciclado de residuos tóxicos del proceso de la FSN, se requieren 30 ATPs por molécula de  $N_2$  atmosférico (diCenzo *et al.*, 2020). Por lo

anterior, la FSN es un proceso energéticamente costoso para la leguminosa hospedera. Ante esta situación, las leguminosas han desarrollado mecanismos que le permiten regular el número de nódulos que puede formar sin comprometer su desarrollo. Esta regulación la realiza a través de la activación de un proceso conocido como Autorregulación de la Nodulación “AON”( por sus siglas en inglés Autoregulation Of Nodulation) (Ferguson *et al.*, 2019). Como se muestra en la figura 1.8, el inicio de la AON se caracteriza por la producción de moléculas señales móviles, que permiten una comunicación constante con el vástago (tallo y hojas) (Mortier *et al.*, 2010). De acuerdo con estudios en diferentes leguminosas, NIN participa en la activación de la AON (Soyano *et al.*, 2014). Además de su papel en la activación del proceso de organogénesis del nódulo e infección rhizobial, NIN activa la transcripción de dos genes que codifican para péptidos de la familia CLE (por sus siglas en inglés CLAVATA3-Endosperm Surrounding Region) (Soyano *et al.*, 2014). Puesto que su expresión se activa en respuesta a rhizobios, a estos genes se les denomina *RIC1* y *RIC2* (del inglés Rhizobia Induced CLE peptide 1 y 2) en *G. max* y en *P. vulgaris*, *CLE-RS1/CLE-RS2* en *L. japonicus* y *CLE12/CLE13* en *M. truncatula* (Figura 1.8). Estos péptidos derivan de precursores de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y mediante un procesamiento proteolítico surgen cadenas de péptidos de 12-13 aminoácidos (Mortier *et al.*, 2010). Posteriormente, se glicosilan por una arabinosiltransferasa conocida como PLENTY en *L. japonicus* o RND1 en *M. truncatula* (Schnabel *et al.*, 2011; Kassaw *et al.*, 2017; Yoro *et al.*, 2019).

Los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13* maduros se transportan vía xilema hacia la parte aérea de la planta y se perciben por un receptor tipo cinasa denominado en *P. vulgaris* y *G. max* como “Nodulation Autoregulation Receptor Kinase” (NARK), “Hypernodulation and Aberrant Root Formation1” (HAR1) en *L. japonicus* y “Super Numeric Nodules” (SUNN) en *M. truncatula* (Nishimura *et al.*, 2002; Searle *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011; Ferguson *et al.*, 2014). La importancia de la percepción y decodificación del mensaje de los péptidos *RIC1* y *RIC2* en la AON se demostró en las mutantes *nark/har1/sunn* las cuales exhiben fenotipos de supernodulación debido a que no pueden detectar estos péptidos (Nishimura *et al.*, 2002; Searle *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2005; Okamoto *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2011; Ferguson *et al.*, 2014).

Posterior a la detección de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13, en el tallo se activa la biosíntesis de una molécula señal inhibitoria “SDI”( por sus siglas en inglés: Shoot Derived Inhibitory signal), cuya identidad química aún es cuestión de debate. Esta molécula señal producida en el tallo viaja vía floema hacia la raíz de la leguminosa, en donde activa un programa genético que inhibe la formación de nódulos (Ferguson *et al.*, 2019). En los últimos años se han realizado diversos esfuerzos para descubrir la identidad química de la señal inhibitoria que viaja de la parte aérea hacia la raíz. Anteriormente, se había propuesto que esta molécula señal podría ser la fitohormona citocinina, de la cual se ha observado que en altas concentraciones inhibe la actividad meristemática en las raíces (Ferguson *et al.*, 2019) Además, en *L. japonicus* también se demostró que un aumento en la producción de citocininas inhibe la formación de nódulos (Sasaki *et al.*, 2014; Miri *et al.*, 2019). Sin embargo, es muy importante aclarar que las citocininas también juegan un rol positivo en la formación de nódulos. Por lo que es necesario considerar que la concentración y etapa de acumulación de esta hormona es determinante para actuar como regulador positivo o negativo (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Miri *et al.*, 2019).

Además de la citocininas, también se ha propuesto que el microRNA (miRNA) miR2111 puede ser la señal derivada del tallo y que inhibe la formación de nódulos. Este microRNA se sintetiza y madura en las células acompañantes del floema y de allí viaja a las raíces (Tsikou *et al.*, 2018; Okuma *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). En respuesta a la inoculación con rizobios, este miRNA se regula negativamente provocando que su acumulación disminuya conforme transcurren los días post-inoculación nódulos (Tsikou *et al.*, 2018; Okuma *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Por el contrario, esto genera la acumulación de su RNA mensajero blanco denominado TML (por sus siglas en inglés Too Much Love) (Tsikou *et al.*, 2018). *TML* codifica para una Ubiquitina E3 ligasa de la familia proteica “Kelch repeat-containing F-box”. La función de los miembros de esta familia proteica está asociada a la ubiquitinación de proteínas para su degradación (Takahara *et al.*, 2013). Por lo anterior, se ha propuesto que TML puede regular factores de transcripción relacionados con la formación de nódulos (Takahara *et al.*, 2013). Adicionalmente, el silenciamiento génico de *TML* genera un fenotipo de supernodulación (Takahara *et al.*, 2013). Por tal motivo TML se considera un regulador negativo de la simbiosis; sin embargo, hasta el día de hoy se desconoce la o las proteínas que son reguladas por TML.



**Figura 1.8. La vía de autorregulación de la nodulación (AON).** Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides, que atraen a los rhizobios compatibles y estimulan la producción de FNs. Éstos se perciben por los receptores NFR1/NFR5. Tras la percepción se activa la transcripción de *NSP1/NSP2* y *NIN*. Estos factores de transcripción activan a genes esenciales como *ENOD40*, que participa en la organogénesis del nódulo. Posteriormente, se producen los péptidos CLE supresores de la nodulación (llamados RIC1 y RIC2 en *P. vulgaris* y en *G. max*), que se modifican después de la traducción y se transportan a la parte aérea de la planta a través del xilema. Donde se perciben por el receptor de autorregulación de la nodulación “NARK”, que esta conformado por un complejo heterodímero con CLAVATA2, CORYNE y/o KLAVIER. Las proteínas fosfatasa asociadas a la quinasa (KAPP1 y KAPP2) fosforilan y desfosforilan el dominio quinasa de NARK para transmitir la percepción de los péptidos CLE. Esto regula la producción de una señal inhibitoria (posiblemente las citocininas, miRNA2111 o algún otro factor) que se transporta en el floema a la raíz donde interactúa con otros factores, como la proteína F-box TML y NIN (Imagen tomada de Ferguson *et al.*, 2019).

La AON también se activa por altas concentraciones de nitrato. Sin embargo, a diferencia lo ocurrido en presencia de rhizobios, la regulación es a nivel local e inhibe completamente la formación de nódulos (Ferguson *et al.*, 2019). La activación de la AON por nitrato se regula por diferentes péptidos de la familia CLE. Por ejemplo, en *G. max* se ha demostrado que la alta concentración de NO<sub>3</sub> activa en la raíz la producción del péptido CLE denominado NIC1 (Nitrogen Induced CLE peptide 1) y CLE35 en *M. truncatula* (Ferguson *et al.*, 2019; Mens *et al.*, 2021). En *L. japonicus* se ha demostrado que CLE-RS2 no solamente se produce en respuesta a rhizobios, sino que también a la alta disponibilidad de NO<sub>3</sub> (Nishida *et al.*, 2016). En este caso la detección de estos péptidos se realiza de forma local, es decir, en la raíz.

A pesar de que inicialmente se había descrito el papel de miR2111 en respuesta a la interacción con rhizobios, investigaciones recientes también lo vinculan al NO<sub>3</sub> (Moreau *et al.*, 2021). Se conoce que la baja disponibilidad de NO<sub>3</sub> activa un proceso contrario a la AON, en el cual se promueve de forma significativa la nodulación con el fin de obtener fuentes de NO<sub>3</sub>. En este proceso también participan unos péptidos, en este caso denominados C-Terminally Encoded Peptide 1” (CEP1) (Imin *et al.*, 2013; Okamoto *et al.*, 2016). De igual manera, estos péptidos viajan vía xilema a la parte aérea de la planta, pero en este caso son detectados por el receptor “Compact Root Architecture 2” (CRA2) (Huault *et al.*, 2014; Mohd-Radzman *et al.*, 2016). En este sentido, algunas evidencias recientes sugieren que CRA2 activa la biosíntesis de miR2111 (Gautrat *et al.*, 2020). Asimismo, su expresión se encuentra vinculada a la disponibilidad de NO<sub>3</sub>, en este caso en respuesta a los bajos niveles de NO<sub>3</sub> (Moreau *et al.*, 2021). Las plantas que sobreexpresan este microRNA muestra un fenotipo de supernodulación (Tsikou *et al.*, 2018). En conjunto, estas evidencias demuestran que miR2111 es un regulador positivo que permite a las leguminosas establecer simbiosis con rhizobios.

Bajo este contexto la AON y la regulación positiva de la nodulación regulada por CRA2 muestran una relación entre sí. La sola sobreexpresión de NARK/HAR1/SUNN conduce a la disminución de nódulos y la sobreexpresión de CRA2 promueve de forma significativa la formación de nódulos. Sin embargo, la sobreexpresión simultánea de ambos receptores SUNN/ CRA2 atenúa los fenotipos que muestran por si solos (Laffont *et al.*, 2019). Lo

anterior demuestra que ambas vías de señalización mantienen una estrecha relación, en la cual miR2111 es un regulador esencial para interpretar las necesidades de nitrógeno de la planta. Sin embargo, hasta el momento se mantienen las investigaciones para conocer más a detalle la vía de AON, principalmente cómo TML regula la actividad meristemática en las raíces.

## **1.9. Capítulo IX. Importancia de Fósforo**

La asociación simbiótica de leguminosas con rizobios da una ventaja para adquirir N atmosférico, dejando el fósforo (P) como el principal macronutriente limitante para el crecimiento de las plantas (Broughton *et al.*, 2003). Las plantas absorben el P en su forma inorgánica (ortofosfato Pi) (von Wandruszka *et al.*, 2006). Sin embargo, el Pi tiene una alta reactividad y forma compuestos químicos con otros iones (i.e., Mg, Ca), lo que lo hace inaccesible para la mayoría de las plantas (Vance *et al.*, 2003). Al igual que en el caso de N, se ha implementado la utilización de fertilizantes sintéticos con el fin de mitigar la falta de este nutriente en el suelo (Cordell *et al.*, 2019). Estos fertilizantes son producidos a través de la extracción de depósitos de rocas fosfóricas. Estos depósitos se conocen así debido a que contienen una alta concentración de minerales de fosfato como  $P_2O_5$ . Los depósitos más importantes a nivel mundial se encuentran en Marruecos así como en algunos países africanos, de Estados Unidos de América y de China. Sin embargo, es importante considerar que estos depósitos son finitos y se calcula que estos se agotarán a finales de este siglo (Gilbert *et al.*, 2019). Como en el mismo caso del N, se estima que el 80% del fertilizante aplicado que contiene Pi se precipita en el suelo como formas insolubles o se lixivia a los mantos freáticos, contaminando de manera importante suelos y cuerpos de agua.

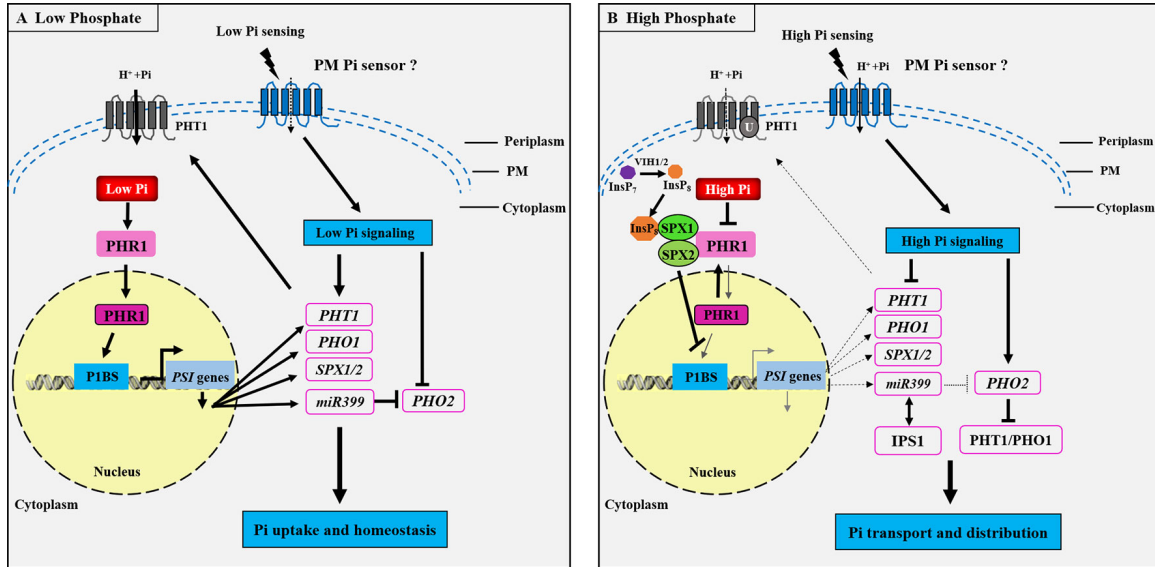
Ante un ambiente deficiente de Pi, las plantas activan diversas estrategias adaptativas morfológicas, metabólicas y genéticas que les permiten hacerle frente. A este conjunto de respuestas se le denomina como Respuestas ante la Deficiencia de Pi “PSR” (por su siglas en inglés Phosphate Starvation Response) (Zhang *et al.*, 2014). Parte de estas estrategias adaptativas fisiológicas están orientadas a la modificación de la arquitectura radical (Peret

*et al.*, 2014). Estas modificaciones se basan en la reducción del crecimiento de la raíz primaria, y un aumento en el desarrollo de raíces laterales. Asimismo, un aumento en la longitud y densidad de los pelos radicales (Peret *et al.*, 2014). Estas modificaciones le permiten a la planta explorar y ampliar el área de contacto en busca de fuentes de Pi en el suelo.

Adicional a estas modificaciones, las raíces secretan protones y compuestos orgánicos (malato y citrato) con el fin de solubilizar el Pi del suelo para captarlo (Kochian *et al.*, 2015). Cuando se logra solubilizar el Pi, se activan las respuestas fisiológicas de las plantas orientadas a optimizar la captación y utilización del Pi (Kochian *et al.*, 2015). Estas respuestas fisiológicas implican la activación de transportadores de Pi de alta afinidad, el reciclaje de Pi a partir de los fosfolípidos de las membranas y la redistribución de Pi desde los órganos más viejos a los más jóvenes. Todas estas estrategias fisiológicas y metabólicas están coordinadas por la activación de vías de señalización locales y sistémicas, reguladas genéticamente.

Las plantas pueden detectar el Pi interno a través de los niveles de inositol polifosfato (InsPs), es decir, la concentración InsPs cambia o es dependiente de la disponibilidad de Pi (Zhang *et al.*, 2014). Las proteínas capaces de sensar el InsPs se conocen como SPX (SYG1-PHO81-XPR1) (Wild *et al.*, 2016). Estas proteínas juegan un papel muy importante en la detección de los niveles de Pi citosólico y por lo tanto en la homeostasis de Pi (Wild *et al.*, 2016). Las proteínas SPX interactúan con el factor de transcripción PHR1 (Phosphate Starvation Response 1) (Rubio *et al.*, 2011). PHR1 es uno de los componentes más importantes en las plantas para hacer frente a la deficiencia de Pi. Como se muestra en la figura 1.9, PHR1 controla y activa la expresión de genes inducidos por la deficiencia de Pi conocidos como PSI (por sus siglas en inglés Pi Starvation-Induced Genes), uniéndose a los elementos *cis* P1BS (por sus siglas en inglés PHR1-Binding Sites) de los promotores (Rubio *et al.*, 2011).





**Figura 1.9. Vía de señalización que modula la homeostasis de Pi en plantas.** (a) Bajo la deficiencia de Pi, un conjunto de genes se activa por la inanición de fosfato (*PSI*). Estos genes se activan transcripcionalmente mediante la unión del factor de transcripción PHR1 al elemento *cis* P1BS presente en la región promotora de los genes *PSI*. Posteriormente se induce la expresión de *PHT1* y *PHO1* necesarios para la captación y translocación de Pi en las raíces. Los genes *SPX1/2* y miR399 también se activan por PHR1 durante la inanición de Pi. Posteriormente miR399 inhibe a PHO2 que es una conjugasa ubiquitina E2, esto conduce a la activación de transportadores de alta afinidad (PHT). Finalmente los transportadores activos PHT toman el Pi. (b) En condiciones normales de Pi, las proteínas *SPX1/2* se asocian a PHR1. Esta interacción conduce a la inhibición de la unión de PHR1 al elemento *cis* P1BS presente en la región promotora de los genes *PSI*. Por lo tanto, los genes *PSI*, incluidos *PHT1*, *PHO1* y miR399, se reprimen transcripcionalmente, mientras que PHO2 se activa para ser responsable de la ubiquitinación de las proteínas PHT1 y PHO1 promoviendo la degradación de los transportadores de alta afinidad Pi (Imagen tomada de Xie *et al.*, 2019).

Bajo condiciones óptimas de Pi, SPX y PHR1 se encuentran unidos, limitando que PHR1 pueda unirse a estos sitios P1BS, evitando que se activen los genes PSI. Por otro lado, cuando los niveles de Pi son bajos, las proteínas SPX se degradan vía proteosoma, lo que permite que PHR1 se una a los sitios P1BS activando el sistema PSR (Figura 1.9). Este sistema incluye la activación de dos microRNAs; miR399 y miR827. La activación de estos microRNAs en respuesta a los bajos niveles de Pi, genera la degradación del mensajero de los genes *PHO2* y *NLA1*, respectivamente (Chiou *et al.*, 2011; Pant *et al.*, 2008). *PHO2* es una E2 conjugasa, la cual marca a las proteínas para su degradación vía proteosoma. El silenciamiento génico de *PHO2* genera plantas hiperacumuladores de Pi, debido a que mantienen activos a los transportadores de alta afinidad generando un transporte activo de Pi, la proteína *PHO2* es un regulador esencial de la homeostasis de Pi. Por su parte *NLA1* (por sus siglas en inglés NITROGEN LIMITATION ADAPTATION 1) codifica una proteína con un dominio SPX en el N-terminal y un dominio RING con actividad de ubiquitina E3 ligasa en el C-terminal (Peng *et al.*, 2007). Inicialmente se reportó como regulador en las respuestas adaptativas a la limitación de nitrógeno en *Arabidopsis*, sin embargo las mutantes *nlp1* muestran hiperacumulación de Pi. Su actividad ha sido estrechamente vinculada a ambas condiciones, sugiriendo que *NLA1* es una pieza clave en la regulación estrecha que mantiene las respuestas de N y de Pi (Figura 1.9) (Kant *et al.*, 2011). Recientemente se demostró que *NLA1* y *PHO2* actúan de forma sinérgica en la participación de la degradación de transportadores de alta afinidad (Lin *et al.*, 2013). La regulación post-transcripcional de *PHO2* y *NLA1* permite la actividad de los transportadores de alta afinidad como PHT1;8 y PHT1;9 (Bari *et al.*, 2006), lo cual permite la captación y el transporte activo de Pi hacia la planta.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Impacto de la deficiencia de Pi en la simbiosis leguminosa-rhizobio

La deficiencia de Pi disminuye significativamente el desarrollo y productividad de las plantas (Cordell *et al.*, 2009). En plantas leguminosas se ha documentado que la deficiencia de Pi afecta negativamente la simbiosis con rhizobios, reduciendo drásticamente la tasa de nodulación y la FSN. Por ejemplo, en *P. vulgaris* se ha registrado una reducción de más del 60% en el número de nódulos por planta (Hernández *et al.*, 2009; Valdés-López *et al.*, 2010). Además, se ha observado el envejecimiento prematuro de los nódulos de plantas deficientes de Pi. (Hernández *et al.*, 2009; Valdés-López *et al.*, 2010; Sulieman *et al.*, 2013). Esta reducción y envejecimiento prematuro puede deberse al incremento de la permeabilidad del oxígeno en el nódulo y la consecuente inactivación de la enzima nitrogenasa (Lazali and Devron *et al.*, 2014; Nasr Esfahani *et al.*, 2016). La permeabilidad se debe a la remodelación de los lípidos de la membrana del nódulo durante el estrés por Pi, en donde los fosfolípidos se reemplazan por galactolípidos (Dokwal *et al.*, 2021). Un análisis transcriptómico en *M. truncatula* demostró que la inactivación de la enzima nitrogenasa también puede deberse a la disminución de la expresión de los genes que codifican para la nicotianamina sintasa y leghemoglobina en deficiencia de Pi (Liese *et al.*, 2017). La nicotianamina sintasa favorece la movilidad celular del hierro, esencial para la formación de la enzima nitrogenasa. Por su parte, la baja actividad de la legemoglobina conlleva al aumento en el oxígeno libre y provoca la inhibición de la actividad de la nitrogenasa en los nódulos. Estudios transcripcionales y metabólicos en distintas leguminosas también han contribuido a entender los mecanismos moleculares que suceden en el nódulo para hacer frente a la deficiencia de Pi (Hernández *et al.*, 2007; Sulieman *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022). En nódulos de *P. vulgaris*, los análisis transcriptómicos han identificado más de 100 genes regulados por la baja disponibilidad de Pi, entre los que destacan PHR1 y el microRNA miR399 (Hernández *et al.*, 2009, Valdés-López *et al.*, 2008). La activación de estos genes es esencial para la activación del sistema PSI, el cual controla las respuestas adaptativas ante la deficiencia de Pi. Estas estrategias incluyen la activación de transportadores de alta afinidad, los cuales se expresan en las membranas plasmáticas en células de la raíz. Su principal función es la absorción del Pi, permitiendo el transporte de Pi desde la raíz hacia los nódulos. Entre los transportadores de

Pi, la familia Pht1 es la más estudiada en plantas (Qin *et al.*, 2012). En *P. vulgaris*, *G. max* y *M. truncatula* se han caracterizado transportadores de Pi, los cuales se expresan en el área de unión entre las raíces y los nódulos jóvenes, y funcionan principalmente en el transporte de Pi de las raíces a los nódulos (Liu *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2016). Asimismo, perfiles transcriptómicos en nódulos de *Cicer arietinum* (garbanzo) muestran la activación de diversos genes relacionados con regulación transcripcional y transporte de iones/nutrientes, así como la señalización y removilización de Pi, bajo condiciones de deficiencia de Pi (Nasr Esfahani *et al.*, 2016-2017). Estos datos en conjunto demuestran que la mayoría de las respuestas moleculares del nódulo están orientadas a la captación, uso eficiente y mantenimiento de la homeostasis del Pi (Hernández *et al.*, 2009; Cabeza *et al.*, 2014). Sin embargo, muy pocos estudios han analizado las respuestas generadas durante las primeras etapas de la simbiosis ante la deficiencia de Pi. Un análisis transcripcional en *M. truncatula* sugiere que la deficiencia de Pi apaga la expresión de genes relacionados a la síntesis de flavonoides e isoflavonoides, esenciales para iniciar el diálogo molecular con el rhizobio. En este mismo estudio también se observó el incremento de la expresión de genes asociados a la síntesis de etileno, hormona que efecta la nodulación (Cabeza *et al.*, 2014). A pesar de estos avances, en este estudio se usaron raíces noduladas, por lo que no se consideraron los eventos tempranos del diálogo entre *M. truncatula* y rhizobio, cruciales para que se dé una simbiosis exitosa reflejada en la formación de un nódulo funcional (Cabeza *et al.*, 2014). Estas pocas evidencias sugieren que la deficiencia de Pi afecta el diálogo molecular entre leguminosas y rhizobios, lo que conlleva a una reducción en la tasa de nodulación. A pesar de que se conocen en detalle los mecanismos que permiten adaptar el funcionamiento del nódulo a la deficiencia de Pi, poco se sabe acerca de los mecanismos genéticos que controlan el establecimiento de esta simbiosis en condiciones deficientes de Pi. Algunas de las preguntas que no habían sido investigadas son: ¿Qué parte del diálogo molecular entre *P. vulgaris* y los rhizobios se ve afectada? ¿Se activa prematuramente el mecanismo de autorregulación de la nodulación? ¿Se activa prematuramente la síntesis de los péptidos RIC1 y RIC2 provocando la reducción del desarrollo de nódulos? Responder estas preguntas contribuirá a entender cómo se establece la simbiosis entre *P. vulgaris* y rhizobios bajo condiciones deficientes de Pi. Contar con esta información podrá contribuir en hacer eficiente la FSN en condiciones deficientes de Pi.

### **3.Hipótesis**

Para abordar este proyecto, se han planteado las siguientes hipótesis:

- La deficiencia de Pi interrumpe el diálogo molecular entre *P. vulgaris* y *R. tropici*, afectando la expresión de genes esenciales y por lo tanto los procesos simbióticos.
- La deficiencia de Pi activa prematuramente el proceso de Autorregulación de la Nodulación.
- La deficiencia de Pi activa reguladores y mecanismos que controlan la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* que aún no han sido identificados.

## 4.Objetivos

De acuerdo con los antecedentes descritos en los capítulos anteriores, esta tesis doctoral se realizó bajo los siguientes objetivos:

### 4.1. Objetivo General

Determinar los mecanismos genéticos que regulan el establecimiento de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* en condiciones deficientes de Pi.

### 4.2. Objetivos Particulares

- Identificar la etapa del diálogo molecular entre *P. vulgaris* y *R. tropici* se efecta por la deficiencia de Pi.
- Identificar los eventos simbióticos tempranos que se afectan por la deficiencia de Pi (deformación de pelos radicales, formación de hilos de infección y liberación de rhizobios a células del nódulo).
- Identificar genes reguladores del establecimiento de la simbiosis en respuesta ante la deficiencia de Pi.
- Caracterizar funcionalmente la participación del gen o los genes que pudieran jugar un papel en la regulación del establecimiento de la simbiosis *P. vulgaris* y *R. tropici* bajo condiciones de deficiencia de Pi.
- Proponer un modelo con el que se expliquen los mecanismos genéticos que regulan el establecimiento de la simbiosis *P. vulgaris* y *R. tropici* bajo condiciones de deficiencia de Pi.

## 5. Metodología

### 5.1. Condiciones generales de crecimiento de plantas y bacterias

#### 5.1.1. Material vegetal

Para los siguientes experimentos se utilizaron plantas silvestres de *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Glycine max* (soya) de las variedades Negro Jamapa y Williams82, respectivamente. También se usaron plantas mutantes *nark* tanto en el fondo genético *P. vulgaris* variedad OAC Rico y *G. max* variedad Bragg. Las mutantes *Pvnark* fueron proporcionadas por el Dr. Brett Ferguson de la Universidad de Queensland, Australia, mientras que las *Gmnark* por el Dr. Ramiro Lascano de la Universidad de Córdoba, Argentina. Las semillas se desinfectan con alcohol al 70% durante 1 minuto, posteriormente en cloro al 10% durante 10 minutos, después se realizan lavados para quitar el exceso de cloro. Finalmente se germinan en cajas Petri que contenían papel para germinación, dos días posteriores a la germinación se transfirieron a los diferentes sistemas y tratamientos.

#### 5.1.2 Tratamientos para inducir deficiencia de Pi

Para la inducción de deficiencia de Pi se utilizaron dos sistemas, uno *in vitro* en cajas Petri de 25x25 cm que contenían medio sólido Fahræus con concentraciones óptimas (1 mM) o limitantes (5 µM) de Pi. En este sistema se utiliza papel de germinación que permite que las raíces puedan absorber el agua de una manera más eficiente. Una vez colocado el papel de germinación se transfieren los germinados de *P. vulgaris* de dos días de edad y se sometieron a estas condiciones durante tres días. Posteriormente, se inoculan con la cepa *Rhizobium tropici* CIAT899. Con este sistema se evaluaron los efectos de la deficiencia de Pi en los eventos tempranos de la simbiosis *P. vulgaris*-rhizobio. Los parámetros evaluados fueron: expresión de genes simbióticos, deformaciones de pelos radicales, y formación de hilos de infección. Para la evaluación de la expresión de genes las raíces se colectaron 1, 24 y 48 hpi, para las deformaciones e hilos de infección se colectaron las raíces 48 hpi.

Para el restablecimiento de Pi, se utilizaron plántulas de *P. vulgaris* de dos días de edad las cuales fueron colocadas en placas de medio sólido Fahræus con concentraciones óptimas de Pi (1 mM) o de bajo Pi (5 µM). Tres días después de iniciar los tratamientos, las plántulas que crecieron en condiciones deficientes de Pi se transfirieron durante 24 horas a

placas con concentraciones óptimas de Pi. Las plantas control de igual manera se transfirieron a las mismas condición de Pi que ya tenían. Transcurridas las 24 horas las raíces se colectaron en nitrógeno líquido y se procesaron para la evaluación de expresión de genes simbióticos.

El segundo sistema se realizó en macetas con perlita. En este sistema se transfirieron los germinados de *P. vulgaris* de dos días de edad a macetas con agrolita. Posteriormente, se realizaron riegos con la solución nutritiva de Sumerfield con concentraciones óptimas (1mM) o limitantes (5  $\mu$ M) de Pi. Finalmente, las plantas fueron inoculadas con la cepa *R. tropici* CIAT899, después de 20 días post inoculación, se evaluó la formación de nódulos.

#### 5.1.3. Crecimiento de *Rhizobium tropici*

Se utilizó la cepa de *R. tropici* CIAT899 como simbiote de *P. vulgaris*, tanto para Negro Jamapa como para la variedad OAC Rico y la mutante *Pvnark*. Para *G. max* se utilizó la cepa *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 como simbiote tanto para la variedad Bragg y para la mutante de *Gmnark*. La cepa *R. tropici* CIAT899 se creció durante dos días a 30 ° C en medio PY (5 g L<sup>-1</sup> de peptona y 3 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 0.7 M y 20 mg / ml de ácido nalidíxico. Mientras que la cepa *B. diazoefficiens* USDA110 se cultivó durante dos días a 30 ° C en medio YEM (10 g L<sup>-1</sup> manitol, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> extracto de levadura, pH 7)

#### 5.1.4. Generación de la cepa *R. tropici::uidA*

Adicionalmente, se desarrolló una cepa de *R. tropici* CIAT899 que expresa un gen reportero a través del plásmido pFAJ1700::*pLacZ::uidA*, esta cepa nos permitió evaluar formaciones de ITs. La cepa *R. tropici::uidA* se obtuvo por apareamiento triparental usando la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  que porta el plásmido pFAJ1700::*pLacZ::uidA*, con el gen *uidA* bajo el promotor *lacZ* como donante y el pRK2013 como auxiliar de conjugación. Para este objetivo, las tres cepas (*R. tropici* CIAT899, DH5 $\alpha$ /pFAJ::*placZgusA* y DH5 $\alpha$ /pRK2013) crecieron en medio sólido durante dos días. *R. tropici* CIAT899 en medio sólido PY suplementado con CaCl<sub>2</sub> 0.7 M y 20 mg / ml de ácido nalidíxico a 30°C. La cepa DH5 $\alpha$ /pFAJ::*placZgusA*, en medio sólido Lb (10 g L<sup>-1</sup> de triptona, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl y 5 g L<sup>-1</sup>



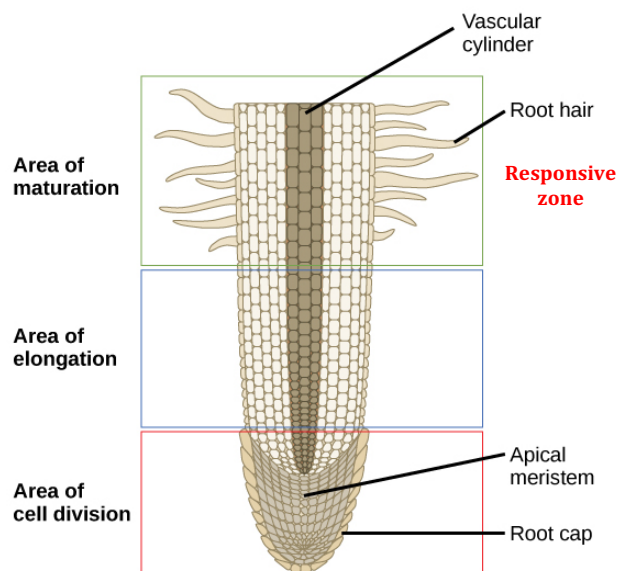
de extracto de levadura), suplementado con 10 mg / ml de tetraciclina. Por último, DH5a/pRK2013, en medio sólido Lb suplementado con 10 mg / ml de kanamicina. Posteriormente, se inoculan cultivos líquidos para cada una de las cepas con sus respectivos antibióticos, agitación 180 rpm durante toda una noche a 30°C y 37°C. Al día siguiente en un tubo de 2 ml se realizó la cruza, se agregó 300 ul de la receptora (*R. tropici*), 150 ul de la donadora (DH5a/pFAJ::placZgusA) y 75 µl de la auxiliar (DH5a/pRK2013). La cruza se cultivó en una caja de PY Ca<sup>2+</sup> (sin antibiótico) a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente se tomó la cruza y en una solución de MgSO<sub>4</sub> (10 mM) + Tween 0.01% y posteriormente se hicieron diluciones hasta llegar 10<sup>-4</sup>. Finalmente, se plaqueó en medio PY Ca<sup>2+</sup> Sm50 Nal 20 Tc10. Como control se consideran las tres cepas (donadora, receptora y helper) las cuales se cultivaron en medio PY Ca<sup>2+</sup> Sm50 Nal 20 Tc10. Posterior a los dos días, se observó el crecimiento de colonias y se eligieron algunas para hacer un ensayo de tinción de GUS y de deformación de pelos radicales.

## 5.2 Evaluación de eventos tempranos de la simbiosis

### 5.2.1. Análisis de la expresión de genes

Para el análisis de los eventos tempranos se consideró la zona responsiva de la raíz identificada en la figura 5.2.1. Para evaluar la expresión de los genes *PvNSP2*, *PvNIN*, *PvFLOT2*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, *PvTML* y *PvPHR1* se diseñaron primers específicos (Tabla Suplementaria S1). Posteriormente se colectó la zona responsiva de las raíces de plantas sometidas a los diferentes tratamientos en nitrógeno líquido. Posteriormente, se extrajo RNA total utilizando el ZR Plant Kit RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este RNA total se incubó con DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para eliminar el DNA genómico. Se utilizó 1 µg de RNA total libre de DNA genómico para sintetizar cDNA usando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) Las muestras de cDNA se utilizaron para analizar la expresión de los genes antes mencionados, mediante qRT-PCR en un termociclador Step-One qPCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). El gen *PvActin* se utilizó para normalizar los niveles de expresión génica. El nivel de expresión de diferentes genes se calculó de acuerdo con la ecuación  $E = nP_{\text{eff}}^{(-\Delta Ct)}$

(Ramakers *et al.*, 2003). Para este experimento se incluyeron cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía raíces de cuatro plántulas diferentes.



**Figura 5.2.1. Zonas de la raíz:** La raíz posee tres zonas diferenciadas; las zonas de división celular, zona de elongación y zona de maduración. La zona de maduración o también conocida como zona responsiva es la zona donde se encuentran los pelos radicales. Los pelos radicales son extensiones largas y tubulares de células epidérmicas que participan en la captación de agua y nutrientes, en la secreción de compuestos orgánicos y en las interacciones con los microorganismos del suelo, particularmente con rhizobios (Imagen tomada de Dutra *et al.*, 2021).

### 5.2.2. Análisis de las deformaciones de los pelos radicales

Para este análisis se utilizó el sistema de inducción de deficiencia de Pi *in vitro*. Posterior a tres días de tratamiento en condiciones óptimas y deficientes de Pi en medio sólido Fahræus, las plántulas de *P. vulgaris* se inoculan con 2 ml de suspensión de *R. tropici* ( $OD_{600nm} = 0.4$ ) por cada raíz. Cuarenta y ocho horas posteriores a la inoculación, se recolectaron las raíces y se tiñeron con azul de metileno para maximizar el contraste. Estas raíces teñidas se observaron con un microscopio de campo claro. Para este experimento se

evaluaron un total de cinco réplicas biológicas independientes, cada una de las cuales incluía diez plantas.

### 5.2.3. Cuantificación del número de hilos de infección

Para cuantificar el número de hilos de infección por raíz se utilizó el sistema de inducción de deficiencia de Pi *in vitro*. Tres días de tratamiento en condiciones óptimas y deficientes de Pi en medio sólido Fahræus. Posteriormente, las plántulas de *P. vulgaris* se inoculan con 2 ml de suspensión de *R. tropici* ( $OD_{600nm} = 0.4$ ) por cada raíz. Tres días posteriores a la inoculación con rhizobios, las zonas susceptibles y las raíces fueron incubadas en la solución de tinción GUS [0.05% de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolxil-bD-glucurónico, buffer de fosfato de sodio 100 mM (pH 7), 0.5 ferrocianuro de potasio 0.5 mM, ferricianuro de potasio 0.5 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM y Triton X-100 al 0.1%] durante 2 horas a 37° C. Posteriormente, las raíces se examinaron en microscopio óptico. Para este experimento se evaluaron un total de cinco réplicas biológicas independientes, con diez plantas cada una.

## 5.3. RNAseq

### 5.3.1. Preparación y secuenciación RNA-Seq de mensajeros

Para el RNAseq se utilizaron germinados de *P. vulgaris* creciendo durante tres días en condiciones óptimas y deficientes de Pi, posteriormente se inoculan con H<sub>2</sub>O vs con rhizobio (48 hpi). Se colectó únicamente la zona responsiva de las raíces (Figura 5.2.1) de los diferentes tratamientos, las cuales fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. Posteriormente, se extrajo RNA total utilizando el ZR Plant Kit RNA Miniprep (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de estas muestras se generaron librerías utilizando 1.5 µg de RNA total libre de gDNA de cada condición experimental y se utilizó el kit TruSeq RNA Sample Prep (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se procesaron y los datos resultantes del análisis de RNA-seq se analizaron utilizando las herramientas de FASTQ y trim-galore con el fin de eliminar lecturas de mala calidad y así como las secuencias de los adaptadores.

### 5.2.2. Identificación de los genes diferenciados diferencialmente

Las secuencias resultantes se mapearon en el genoma de *P. vulgaris* versión 2.1. Después del mapeo, se cuantificó el nivel de expresión de cada transcrito, esto se hace a través de la herramienta Cufflinks (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) midiendo el nivel de alineaciones de cada secuencia (Trapnell *et al.*, 2012). El nivel de expresión cuantificado se representó mediante fragmentos por kilobase de valores de transcripción por millón de lecturas mapeadas (FPKM). Este análisis se genera a partir de la comparación de la expresión de un gen de las muestras control con las del tratamiento. Se establecieron los umbrales para Cuffdiff, para que un gen se exprese diferencialmente se necesita un cambio de 2 veces y un valor  $q \leq 0.05$ . Los datos obtenidos de este análisis de expresión diferencial se validaron de forma independiente mediante qRT-PCR.

### 5.2.3. Clasificación funcional de genes

Para darle el sentido biológico a los datos generados del RNA-seq con los genes diferencialmente expresados, se realizó un análisis de enriquecimiento de la función génica utilizando el método Singular Enrichment Analysis (SEA) disponible en la herramienta AgriGo (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) y ontología génica REVIGO (<http://revigo.irb.hr>) (Du *et al.*, 2010; Supek *et al.*, 2011). Además, se utilizó la clasificación funcional de genes utilizando el programa MapMan (<https://mapman.gabipd.org>). Para el análisis de MapMan, se utilizó el archivo de mapeo de *P. vulgaris*, disponible en el sitio web de MapMan (Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2009). Los datos resultantes de todos los análisis se mostraron en gráficas de color y diagramas de función.

## 5.4. Generación de plantas compuestas

### 5.4.1. Construcción de plásmidos para RNA de interferencia

Para generar las construcciones de silenciamiento génico a través del diseño de RNA de interferencia, se utilizó la tecnología Gateway. Inicialmente se diseñaron primers específicos para *PvRIC1*, *RIC2* y *PvPHR1* (Tabla Suplementaria S1). Estas construcciones

fueron generadas en el vector pK7GWIWG2(II)-RR que contenía la proteína DsRED fluorescente expresada constitutivamente. La fluorescencia de la proteína DsRED se usó como marcador visual para seleccionar las raíces transgénicas que expresaban las construcciones genéticas. Para generar la construcción de RNAi contra *PvRIC1* se amplificó un fragmento específico de 114 pb de la región 3'-UTR usando primers específicos para este gen. Para *PvRIC2* se amplificó un fragmento específico de 427 pb de la región 3'-UTR usando primers específicos para este gen. Finalmente, para generar una construcción de RNAi contra *PvPHR1*, se amplificó un fragmento específico de 213 pb de la región 3'-UTR usando primers específicos para este gen. Para verificar la orientación correcta por PCR se utilizaron los primers Forward-Intron (5'-GCACACCAGAGCATATATTGGTGG-3') y Reverse-35SPromoter (5'-CCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCC-3'). Cada una de las construcciones se secuenciaron para confirmar la ausencia de errores en la secuencia amplificada por PCR. Finalmente, las construcciones se insertaron por electroporación a *Agrobacterium rhizogenes* K599. Las cepas resultantes se usaron para inducir la formación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* siguiendo el protocolo descrito por (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

#### 5.4.2. Construcción de plásmidos para fusiones transcripcionales

Para analizar la actividad de los promotores de los genes *PvRIC1*, *PvRIC2*, *PvNIN* y *PvPHR1* se realizaron diversas fusiones transcripcionales de los promotores de estos genes con el gen reportero GUS ( $\beta$ -glucuronidasa). Para este propósito, se amplificó por PCR un fragmento de DNA genómico del promotor de cada uno de estos genes. Para *PvRIC1* (*PvRIC1::GUS*) se clonó 1273 pb que incluyó la región -1 al -1273 río arriba del codón de inicio (Tabla Suplementaria S1). Para *PvNIN* se clonaron dos grandes regiones una de 1583 pb (-1 al 1583pb) nombrada como *PvNIN (Cyclops)* y 798 pb (-5838 al -6636 pb) nombrada como *PvNIN(PIBS)*. Posteriormente, con el propósito de identificar la región que se regula por niveles de fosfato, la región *PvNIN (Cyclops)* se fragmentó en tres regiones; la primera del -1 al 498 pb (*pNINa*), la segunda del -476 al -1107 (*pNINb*) y la tercera del -1086 al -1583 pb (*pNINc*) arriba del ATG (Tabla Suplementaria S1). Finalmente, para el gen *PvPHR1* se clonaron dos regiones del -1 al -1878pb nombrada

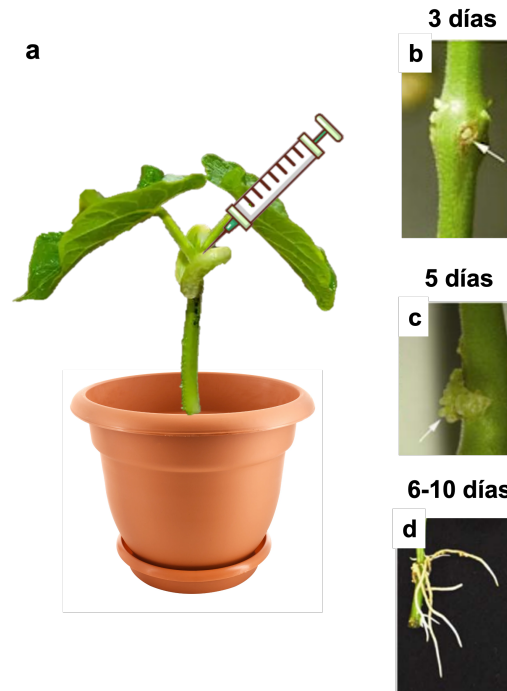
*PvPHR1(Intron)* y otra del -4362 al -6084 pb arriba del ATG nombrada *PvPHR1(P1BS)*(Tabla Suplementaria S1).

Los fragmentos amplificados se clonaron individualmente en el vector pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los plásmidos resultantes se recombinaron en el vector binario pKGWFS7 que contiene el marco de lectura abierto de los genes *GUS* y *eGFP*. Como resultado de cada recombinación se generaron las fusiones transcripcionales: *pPvRIC1::eGFP::GUS*, *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS*, *pPvNIN(a)::eGFP::GUS*, *pPvNIN(b)::eGFP::GUS*, *pPvNIN(c)::eGFP::GUS*, *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS*, *pPvPHR1 (Intron)::eGFP::GUS* y *pPvPHR1(P1BS)::eGFP::GUS*. Cada una de estas construcciones genéticas se insertaron por electroporación a *Agrobacterium rhizogenes* K599. Las cepas resultantes se usaron para generar plantas compuestas con raíces transgénicas en el fondo genético silvestre de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa y OAC RICO, así como en el fondo genético mutante *P. vulgaris nark*.

#### 5.4.3. Transformación genética mediante *Agrobacterium rhizogenes*

Para la generación de plantas compuestas de *P. vulgaris* (plantas con la parte aérea silvestre y con el sistema radical transgénico) se infectaron plántulas de *P. vulgaris* de siete días de edad con un cultivo de *A. rhizogenes* K599, esta infección se realizó en los cotiledones utilizando una jeringa (Figura 5.4.3.) Posteriormente a la infección, se cubrieron las macetas con bolsa de plástico para mantener una alta humedad. Después cinco a ocho días, se desarrolló un tumor en el tallo en el sitio de la herida de las plántulas. Las raíces transgénicas visibles emergieron del tumor diez días después de la infección con *A. rhizogenes* como se muestra en la figura 5.4.3 (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007). Las raíces transgénicas que expresaban el vector vacío (EV: control) y las construcciones (*GUS* y *RNAi*) se sometieron a dos tratamientos unas en condiciones óptimas de Pi (1mM) y otras en condiciones deficientes de Pi (5µM) durante tres días. Asimismo, dependiendo del objetivo del experimento, algunas se inoculan con rhizobio y se evaluaron días post inoculación. Las raíces transgénicas se detectan mediante fluorescencia (*GFP* y *RFP*) usando un microscopio estereoscópico de epifluorescencia. Posteriormente, las raíces se

colectaron en nitrógeno líquido para el análisis de expresión de genes y a otras raíces se evaluó el número de nódulos formados.



**Figura 5.4.3. Transformación genética de *P. vulgaris* mediada por *A. rhizogenes*.** (a) Los germinados de dos días de edad de *P. vulgaris* se plantan en macetas con vermiculita. Posterior a los cinco días de edad, se preparó una suspensión bacteriana de *A. rhizogenes* y utilizando una jeringa se infecta el tallo en la base de los cotiledones. Finalmente, la maceta se cubre con una bolsa plástica para mantener la humedad. (b y c) La formación de callos se empieza a observar a partir del día tres a cinco días posteriores de la infección. (d) Las raíces transgénicas se empiezan a observar entre el día seis-diez posterior a la infección. Una vez formadas las raíces el tallo se corta 1 cm debajo de estas raíces y se elimina el sistema radical primario para posteriormente trasplantar las raíces nuevas (Imagen tomada de Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

## 5.5. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

### 5.5.1. Sistema de expresión en *E. coli*

Mediante tecnología Gateway se clonó la clona completa de *PvPHR1* y se generó la construcción de pDEST-PHR1::6xHis. Esta construcción se generó en el vector

pDEST<sup>TM</sup>17 el cual permite la producción de proteínas etiquetadas en este caso con una cola de 6XHis en el N-terminal. Esta construcción fue introducida a la cepa de *E. coli* BL21, la cual permite expresar proteínas recombinantes en *E. coli*. Para expresar la proteína, se inició un pre-cultivo en LB 50% sal (10g/ 1 triptona, 5g/ 1 NaCl y 5 g / 1 extracto de levadura) suplementado con 100 mg/ml de carbenicilina. Al día siguiente se inoculó un cultivo de 30 ml, al que llamamos cultivo de inducción, con 70 µl del pre-cultivo. Después de 4-5 horas se midió la densidad óptica hasta alcanzar O.D.<sub>600nm</sub>=0.4, posteriormente se inició la inducción de la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a 0.2mM, y finalmente se incubó el cultivo durante 24 hrs a 37°C.

#### 5.5.2. Purificación de la proteína PHR1 y EMSA

Transcurridas las 24 hrs pos-inducción se recolectó el cultivo y se empastilló a 3800 rpm durante 20 minutos a 4°C. Después se resuspendió la pastilla en el buffer de unión a His, según el protocolo descrito por el Kit; His-Spin Protein Miniprep<sup>TM</sup> (Zymo Research). Esta suspensión bacteriana fue lisada por sonicación y centrifugado a 12000g por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante para la purificación de la proteína. Finalmente, el lisado se pasó por una columna de níquel siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta obtener la proteína purificada. Posteriormente se realizó una electroforesis (SDS PAGE 15%) y el gel fue teñido con azul de Coomassie. Para el ensayo de movilidad electroforética se utilizó el kit LightShift Chemiluminescent EMSA (Thermo Fisher), donde se siguió el protocolo del fabricante. Para tal propósito, se utilizó la proteína PHR1 purificada, la región del promotor (1200 pb) de *PvRIC1* biotinilada (20 fmol) y no biotinilada (4 pmol), la membrana fue revelada en una cámara de CCD.

### 5.6. Análisis fisiológicos

#### 5.6.1. Sistema de injertos

Para los experimentos de injertos se utilizaron las semillas del cultivar OAC Rico de tipo silvestre de *P. vulgaris* y el cultivar Bragg de tipo silvestre de *G. max*, así como las mutantes *Pvnark* y *Gmnark*. Las plántulas de dos días de edad se transfirieron a macetas de 1 L que contenían perlita húmeda. Cuando las plántulas tenían 7 días y contenían hojas



cotiledóneas, se cortó una muesca en forma de 'V' en el tallo por encima de los cotiledones. Luego, un vástago en forma de cuña se conectó al tallo y la unión se sostuvo con un cordón de algodón de 2 cm de largo. Las plantas injertadas se mantuvieron en bolsas de plástico transparente y se regaron según fuera necesario para mantener un alto nivel de humedad, que es fundamental para que se formen las uniones de injerto. Después de siete días, se retiraron las bolsas de plástico y las plantas se inoculan con 4 ml de cultivo de rhizobios. A partir de los dos días posteriores a la inoculación, las plantas se regaron cada dos días con solución nutritiva Summerfield suplementada con 1 mM de Pi (condiciones óptimas de Pi) o 5  $\mu$ M de Pi (condiciones de bajo Pi). Quince días después del tratamiento se evaluó el número de nódulos por planta. Para este experimento, se establecieron los siguientes injertos recíprocos: silvestre (vástago)/silvestre (raíz), *nark* (vástago)/*nark* (raíz), silvestre (vástago)/*nark* (raíz) y *nark* (vástago)/silvestre (raíz). Para cada injerto recíproco, se generaron independientemente cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía tres plantas injertadas diferentes.

#### 5.6.2. Sistema de raíz dividida

Para los experimentos de raíz dividida, se utilizaron las semillas del cultivar OAC Rico de tipo silvestre de *P. vulgaris* y el cultivar Bragg de tipo silvestre de *G. max*, así como las mutantes *Pvnark* y *Gmnark*. Después de dos días de germinación, la punta de la raíz de cada plántula se cortó con una hoja de bisturí estéril y la zona herida se cubrió con una punta de pipeta de 100  $\mu$ l. Las plántulas cortadas se transfirieron inmediatamente a placas con Fahræus sólido. Después de tres días, se usaron plántulas con al menos cuatro raíces laterales para establecer el sistema de raíz dividida. Para ello se unieron dos macetas de 0.5 L, luego se colocó una plántula en la unión de las dos macetas y se colocaron dos raíces laterales por cada maceta unida, dividiendo el sistema radical de la misma plántula. Finalmente, las raíces laterales se cubrieron con perlita húmeda. Tres días después del trasplante, se retiraron cuidadosamente los cotiledones de cada planta y se establecieron los siguientes tratamientos: (i) ambos sistemas de raíces se regaron con solución nutritiva Summerfield suplementada con 1 mM de Pi (condiciones óptimas de Pi), (ii) ambos sistemas de raíces se regaron con solución nutritiva Summerfield suplementada con 0.5  $\mu$ M de Pi (condiciones de bajo Pi) y (iii) un sistema radical se regó con solución nutritiva

Summerfield suplementada con 1 mM Pi, y el otro sistema radical se regó con solución nutritiva Summerfield suplementada con 0.5  $\mu$ M Pi. Tres días después del tratamiento, las plantas se inoculan con 4 ml de cultivo de *R. tropici*. Un día después de la inoculación se restablecieron los tratamientos con Pi. Después de 15 días de tratamiento con deficiencia de Pi, se evaluó el número de nódulos por planta. Para cada sistema de raíz dividida, se generaron de forma independiente cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía cuatro plantas diferentes.

### **5.7. Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de todos los resultados se realizó con el software R, versión 3.01. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística de las diferencias en la expresión de genes, número de deformaciones inducidas por rhizobio, ITs y número de nódulos.

## 6.Resultados

### 6.1 La deficiencia de fósforo afecta negativamente las etapas tempranas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y rhizobios.

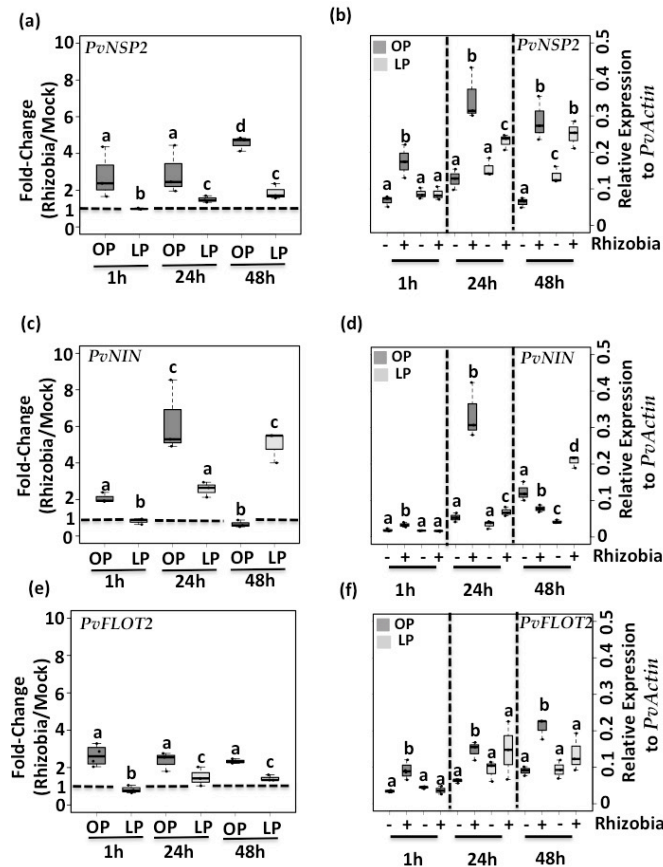
#### 6.1.1. La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes simbióticos

La comunicación molecular y los eventos fisiológicos tempranos son cruciales para el establecimiento de la simbiosis entre leguminosas y rhizobios. Se ha demostrado que la deficiencia de Pi afecta significativamente el proceso de nodulación (Hernández *et al.*, 2009), Sin embargo, no está claro si este estrés nutricional interfiere con el diálogo molecular entre *P. vulgaris* y los rhizobios. Por lo tanto, las etapas precisas de este diálogo molecular que se afectan por la deficiencia de Pi aún se desconocen.

Para caracterizar mejor el efecto de la deficiencia de Pi en la relación entre *P. vulgaris* y rhizobios, primero se desarrolló un sistema que permite rastrear las respuestas moleculares y fisiológicas tempranas inducidas por rhizobios en condiciones limitantes de Pi. Este sistema permite el crecimiento de plántulas de *P. vulgaris* de dos días de edad en condiciones óptimas (1 mM) o limitantes (5  $\mu$ M) de Pi, bajo un ambiente estéril y controlado. Una vez establecido el sistema para inducir deficiencia de Pi, las plántulas se inoculan con la cepa de *R. tropici* y después de una, 24 y 48 horas post-inoculación (hpi) se evaluaron los eventos simbióticos tempranos.

Con el fin de caracterizar e identificar los procesos simbióticos que se afectan por este estrés nutricional, se realizó un análisis de la expresión de genes simbióticos tempranos tales como *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2*. La acción coordinada de diferentes factores de transcripción es esencial para una simbiosis exitosa con los rhizobios. Tras la percepción de FNs, los factores de transcripción NSP2 y NSP1 forman un complejo de unión al DNA (Smit *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2009). Este complejo regula positivamente la expresión del factor de transcripción NIN, el cual a su vez es esencial para activar la expresión de diferentes genes implicados en los procesos de infección y colonización de rhizobios. Entre los genes activados se encuentra el gen *FLOT2*, el cual codifica para una Flotilina que desempeña un papel crucial en la invaginación de la membrana plasmática para la formación del IT. Por su importancia se evaluó la expresión de estos genes; *PvNSP2*

(Phvul.009G122700), *PvNIN* (Phvul009G115800), y *PvFLOT2* (Phvul.009G090700) en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas y deficientes de Pi e inoculadas con rizobios (1, 24 y 48 hpi).



**Figura 6.1.1 La deficiencia de Pi reduce la activación de genes simbióticos tempranos.**

Cambios en la expresión de los genes *PvNSP2* (a), *PvNIN* (c) y *PvFLOT2* (e) en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones OP o LP e inoculadas 1, 24 y 48 horas con rizobios. Niveles de expresión de los genes *PvNSP2* (b), *PvNIN* (d) y *PvFLOT2* (f) en plántulas de *P. vulgaris* cultivadas en condiciones OP (gris oscuro) o LP (gris claro) e inoculadas con rizobios simulados (-) o (+). Los datos que se muestran se obtuvieron de cinco réplicas independientes, cada una de las cuales contenía zonas susceptibles de cuatro plantas diferentes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Este análisis reveló que el cambio de expresión (Fold change) de estos tres genes relacionados con la simbiosis se mostró a una, 24 y 48 h después de la inoculación con *R. tropici* en plántulas de *P. vulgaris* que crecieron en condiciones óptimas de Pi con respecto a las plántulas control (Figura 6.1.1). En contraste, observamos una reducción del 50% en la expresión de estos tres genes simbióticos en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones deficientes en Pi en los tres tiempos post inoculación con *R. tropici* (Figura 6.1.1). Para el caso particular de *PvNIN*, mostró un aumento en su acumulación a las 48 h posteriores a la inoculación con *R. tropici* en plántulas con deficiencia de Pi (Figura 6.1.1).

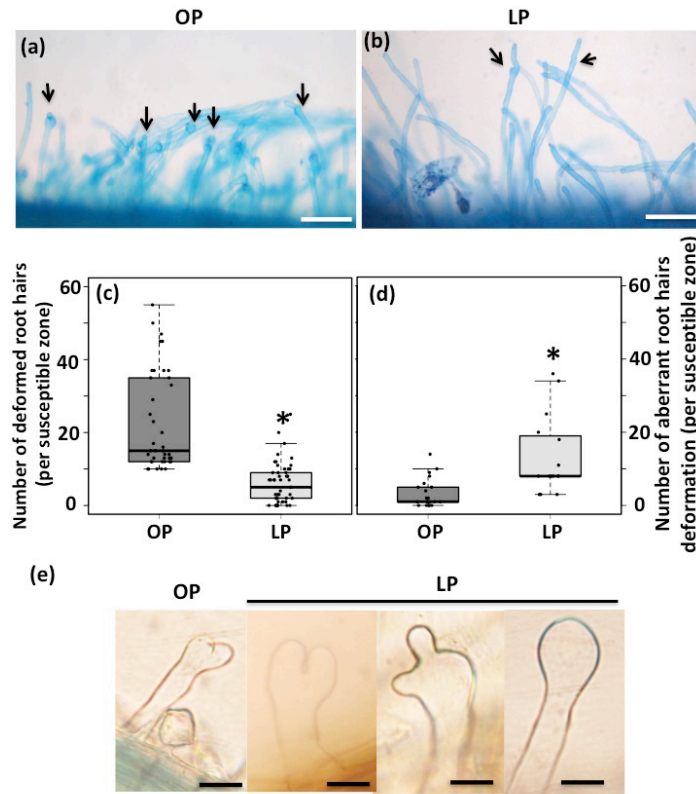
Para explorar el mecanismo detrás de los cambios en la expresión de estos tres genes relacionados con la simbiosis en respuesta a la deficiencia de Pi analizamos los niveles de expresión (Relative expression) de cada tratamiento. Para el caso de *PvNSP2* y *PvNIN* observamos el mayor incremento de expresión en respuesta a *R. tropici* a las 24 horas post inoculación en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas de Pi (Figura 6.1.1). Para el caso de *PvFLOT2* observamos el mayor incremento en su expresión a las 48 horas post inoculación en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas de Pi. En contraste, observamos que el incremento en la expresión de estos tres genes es abatida en un 50%-100% en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones deficientes de Pi a una, 24 y 48 horas post inoculación con *R. tropici* (Figura 6.1.1). Con excepción de *PvNIN* que muestra un incremento en su expresión en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones deficientes de Pi a las 48 horas post inoculación. Asimismo, se observó un aumento gradual en la expresión de *PvNIN* en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones deficientes de Pi sin inocular.

En conjunto, estos análisis de expresión demuestran que la deficiencia de Pi afecta la expresión de genes simbióticos tales como *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2* en plántulas de *P. vulgaris*. La activación ineficiente de factores de transcripción críticos como *PvNIN* y *PvNSP2*, y genes simbióticos como *PvFLOT2* sugieren posibles defectos en los procesos de colonización del rhizobio en la planta, debido a que los tres genes coordinan y activan dicho proceso.

### **6.1.2. La deficiencia de Pi afecta la deformación de los pelos radicales**

Los procesos de infección que inician con la deformación de pelos radicales y progresan hasta la formación del IT están coordinados en gran medida por la actividad de estos tres genes; *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2* (Hirsch *et al.*, 2009; Haney *et al.*, 2010; Soyano *et al.*, 2013). Previamente se ha reportado que la regulación negativa o silenciamiento de estos genes afecta significativamente la deformación de los pelos radicales y la formación de IT inducidos por rhizobios (Hirsch *et al.*, 2009; Haney *et al.*, 2010; Soyano *et al.*, 2013). Para determinar si la baja expresión de estos genes causada por la deficiencia de Pi afecta los procesos de colonización, se realizó un análisis del número de deformaciones de pelos radicales en plántulas de *P. vulgaris* en ambas condiciones de Pi e inoculadas con rhizobios (48 hpi).

Este análisis reveló que cerca del 95% (n = 200) de las raíces evaluadas de plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas de Pi mostraron numerosas deformaciones, las cuales mostraban una morfología normal; es decir, que muestran un enroscamiento (curly) de la zona apical del pelo radical como se muestra en la figura 6.1.2. Estas deformaciones se consideran efectivas debido a que progresan a la formación del IT. En contraste, solo el 50% (n = 200) de las plántulas de *P. vulgaris* en condiciones deficientes en Pi mostraron pelos radicales deformados (Figura 6.1.2). Sin embargo, estas deformaciones mostraron una morfología anormal o aberrante como se muestra en la figura 6.1.2. Por lo que se evaluó el número de deformaciones aberrantes, el 95% (n = 200) de las raíces evaluadas mostraron este tipo de deformaciones no efectivas deficiencia de Pi (Figura 6.1.2)



**Figura 6.1.2. La deficiencia de Pi afecta negativamente la deformación de los pelos radicales inducida por rizobios.** Pelos radicales inducidos por rizobios en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones óptimas de Pi;OP (a) o bajo Pi;LP (b). Las barras de escala en el panel representan 100  $\mu$ m. Las flechas indican algunos ejemplos de pelos radicales inducidos por rizobios observados en OP o LP. ( c ) Número de deformaciones de pelos radicales inducidas por rizobios en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en OP o LP. ( d ) Número de deformaciones aberrantes inducidas por rizobios en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones OP o condiciones LP. ( e ) Tipos de deformación aberrante de los pelos radicales inducidos por rizobios observados en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones de LP. Las barras de escala en el panel representan 50  $\mu$ m. El asterisco indica una diferencia significativa según el análisis de varianza (ANOVA) unidireccional (valor  $p < 0.001$ ). Los datos que se muestran se obtuvieron de 20 repeticiones biológicas, cada una con 10 raíces de diferentes plántulas de frijol.

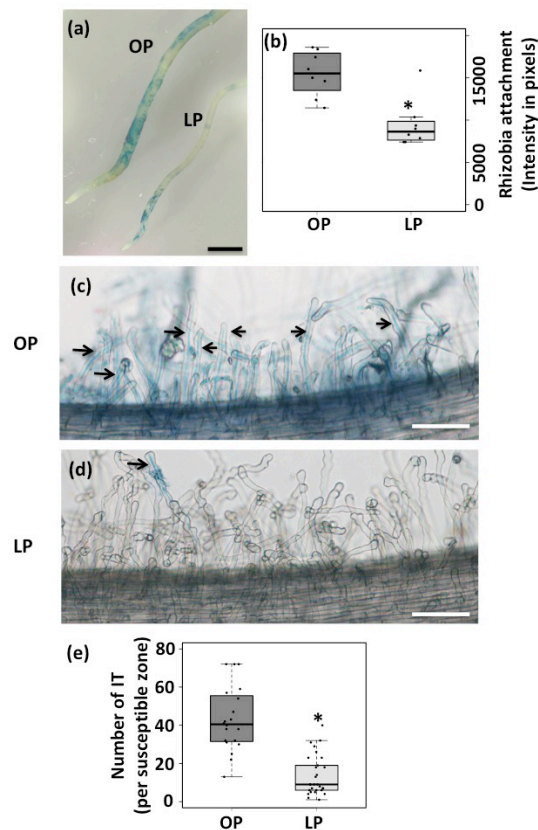
En conjunto estos datos demuestran que la deficiencia de Pi provoca una disminución en el número de deformaciones efectivas y en consecuencia un aumento de deformaciones aberrantes. Estos datos sugieren que la reducción en la expresión de *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2* por la deficiencia de Pi desencadena defectos en las primeras etapas del proceso de infección lo que probablemente conduce a una disminución en la formación de IT.

### **6.1.3. Efectos negativos de la deficiencia de Pi en la adhesión y formación de IT**

Para comprobar que la deficiencia de Pi no solo genera una disminución en la deformación de pelos radicales sino que también conduce a una disminución de la formación de ITs, se utilizó la cepa *R. tropici* CIAT899::*uidA*. Esta cepa expresa el gen *uidA* permite evaluar visiblemente la formación de microcolonias de *R. tropici* así como su ingreso a las células del córtex a través del IT. Esta cepa también permitió evaluar la adhesión de los rizobios hacia las raíces de *P. vulgaris* en condiciones óptimas vs deficientes de Pi. En la figura 6.1.3.a podemos observar la tinción azul (producto de la actividad del gen *uidA*) sobre las raíces de *P. vulgaris* en ambas condiciones de Pi. La adhesión de *R. tropici* en las raíces se evaluó a través de cuantificación de píxeles, este análisis reveló una alta adhesión del rizobio en la zona responsiva de las raíces en condiciones óptimas de Pi. En contraste encontramos una reducción del 50% en la adhesión del rizobio en raíces en condiciones deficientes de Pi (Figura 6.1.3).

Posteriormente se evaluó la formación de ITs, para este fin, también se utilizó la cepa *R. tropici* CIAT899::*uidA*. En la figura 6.1.3 c y d se observa la formación de ITs en condiciones óptimas y deficientes de Pi, respectivamente. Similar a los resultados obtenidos de las deformaciones de pelos radicales y en la adhesión, se observó que las plántulas de *P. vulgaris* creciendo en condiciones deficientes de Pi desarrollaron un 60% menos de IT que las plántulas que crecieron en condiciones óptimas de Pi (Figura 6.1.3).





**Figura 6.1.3. La deficiencia de Pi reduce la adherencia de los rizobios y la formación de IT.** ( a – b) Adhesión de rizobios en raíces de plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones de óptimas de Pi (OP) o bajo Pi (LP). La tinción representa microcolonias formadas a los largo de la raíz, principalmente en la zona responsiva. Las barras de escala en el panel representan 2 mm. Formación de IT en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en OP (c) o LP (d). Las flechas indican algunos ejemplos del hilo de infección observado en OP o LP. Las barras de escala en el panel representan 100  $\mu$ m. (e) Número de ITs por zona susceptible. El asterisco indica una diferencia significativa según el análisis de varianza (ANOVA) unidireccional (valor  $p < 0.001$ ). Los datos que muestran se obtuvieron de 10 repeticiones biológicas, cada una de las cuales contenía diez raíces de diferentes plántulas de *P. vulgaris*.

En conjunto estos datos indican que la deficiencia de Pi afecta los eventos fisiológicos tempranos tales como la adhesión del rhizobio hacia la raíz, la deformación de los pelos radicales, así como la formación de hilos de infección. La disminución en la formación de IT no genera defectos en la estructura y formación de nódulos, pero si impide que los rhizobios ingresen hasta las células del córtex generando nódulos poco infectados o vacíos.

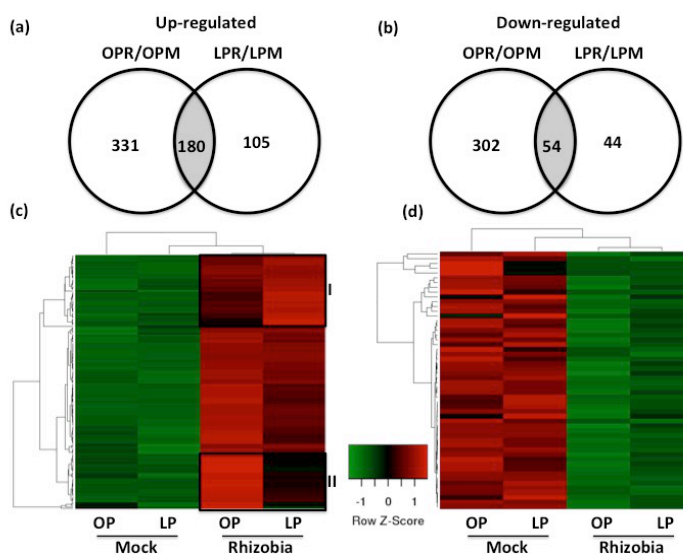
#### **6.1.4. Cambios transcripcionales globales en respuesta a la deficiencia de Pi**

Para obtener una mejor comprensión de las respuestas genéticas de las plantas de *P. vulgaris* que conducen a la reducción de los procesos simbióticos tempranos, realizamos un análisis de mRNA-seq. Con este análisis transcripcional se pretendió determinar 1) Si la deficiencia de Pi genera cambios transcripcionales durante las etapas tempranas de la simbiosis 2) Cuáles son los módulos transcripcionales con mayor respuesta a la deficiencia de Pi 3) Cuáles son los reguladores genéticos durante las primeras etapas de la simbiosis en deficiencia de Pi. Para este análisis transcripcional de todo el genoma, según nuestros datos transcripcionales obtenidos por qRT-PCR, seleccionamos 48 horas después de la inoculación para capturar más respuestas transcripcionales a los rhizobios. Para este fin, se generaron 12 bibliotecas de ADNc a partir de raíces de control (óptimo Pi: OP) y deficientes en Pi (bajo Pi: LP) inoculadas durante 48 h control/mock (OPM o LPM) o con *R. tropici* (OPR o LPR). Para este experimento se generaron tres réplicas biológicas independientes para cada condición.

Este análisis transcripcional permitió identificar 867 transcritos diferencialmente regulados; 511 positivamente y 356 negativamente, en raíces con condiciones óptimas de Pi sin inocular (OPM; Optimal Pi Mock) e inoculadas con rhizobios (OPR; Optimal Pi Rhizobia), es decir (OPR/OPM). Estas comparaciones permiten identificar respuestas transcripcionales globales asociadas a la simbiosis leguminosa-rhizobio en condiciones óptimas de Pi.

Por otro lado, se identificaron 383 transcritos diferencialmente regulados: 285 positivamente y 98 negativamente en raíces deficientes de Pi sin inocular (LPM; Low Pi Mock) e inoculadas con rhizobios (LPR; Low Pi Rhizobia), es decir (LPR/LPM). Estas comparaciones permiten identificar respuestas transcripcionales globales asociadas a la simbiosis leguminosa-rhizobio en condiciones deficientes de Pi.

Para identificar transcritos diferencialmente asociados únicamente a la deficiencia de Pi, se compararon las raíces en condiciones óptimas de Pi sin inocular e inoculadas con rhizobios (OPR/OPM) con raíces en condiciones deficientes de Pi sin inocular e inoculadas con rhizobios (LPR/LPM). Este análisis comparativo reveló que 234 transcritos (180 regulados positivamente y 54 regulados negativamente) regulados en ambas condiciones de Pi e inoculadas con rhizobio (Figura 6.1.4). Por el contrario, 633 transcritos (331 regulados positivamente y 302 regulados negativamente) regulados únicamente en OP y 149 transcritos (105 regulados positivamente y 44 regulados negativamente) regulados únicamente en LP (Figura 6.1.4).



**Figura 6.1.4. Cambios transcripcionales globales de RNA mensajeros.** Genes regulados positivamente (a) y negativamente (b) en raíces de *P. vulgaris* comparando las condiciones óptimas y deficientes de Pi e inoculadas con rhizobio (48 hpi). Mapa de calor que muestra los niveles de expresión de genes regulados positivamente (c) o genes regulados negativamente (d) de plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones OP o LP e inoculadas con rhizobio (48 hpi). La escala de color muestra en rojo valores altos de expresión mientras el verde representa los valores bajos de expresión. Los datos que se muestran se generaron a partir de tres réplicas biológicas, cada una con raíces de tres plantas.

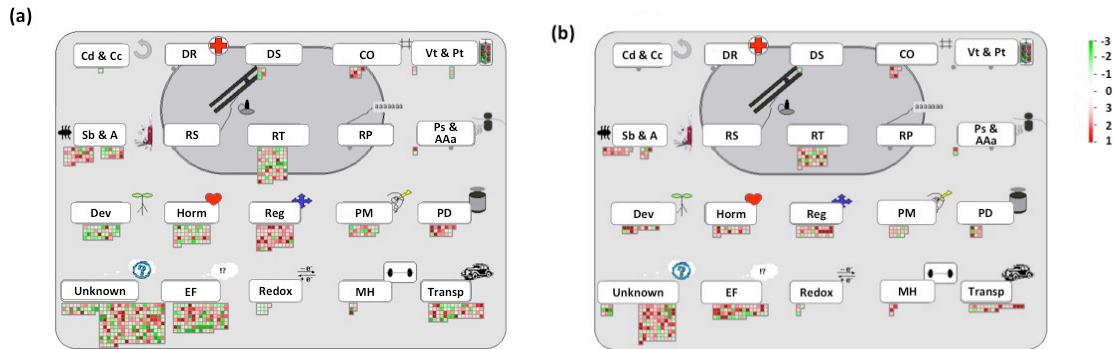
Los datos obtenidos de estas comparaciones se mostraron en mapas de calor, ya que permite ver de forma global los cambios en la expresión de genes en ambas condiciones de Pi. En donde el color verde representa genes de baja expresión, el color rojo representa genes de alta expresión y el negro representa la expresión sin cambios.

Estos mapas de calor nos permitieron visualizar e identificar grupos de transcritos que se acumulan en condiciones deficientes de Pi (Clúster I) y los grupos de transcritos que se disminuyen en deficiencia de Pi (Clúster II) como se muestra en la figura 6.1.4.c.

Los datos obtenidos evidencian que la deficiencia de Pi genera cambios transcripcionales durante las primeras etapas de la simbiosis (48 hpi) entre *P. vulgaris* y *R. tropici*.

### **6.1.5. Categorías funcionales afectadas por la deficiencia de Pi**

Para obtener más información acerca de las funciones de los genes diferencialmente regulados bajo deficiencia de Pi, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes y una clasificación funcional en MapMan, esta clasificación funcional se muestra en la figura 6.1.5. Este análisis reveló que las categorías funcionales más representativas las cuales mostraron cambios significativos relacionados con la deficiencia de Pi fueron: regulación de la transcripción, biosíntesis y regulación de hormonas, transducción de señales, transporte, interacciones bióticas y la modificación/degradación de proteínas. Estos datos muestran un panorama global de las respuestas adaptativas de las plantas que se son determinadas por el estrés nutrimental de Pi.

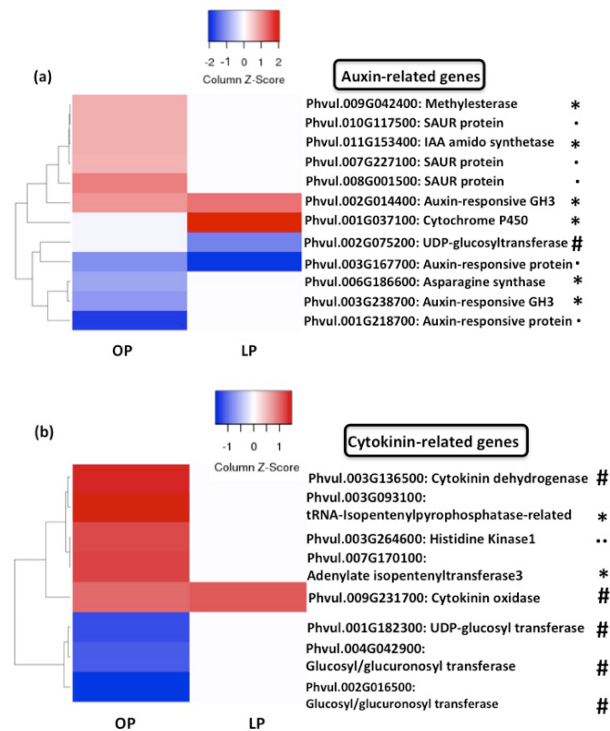


**Figura 6.1.5. Categorías funcionales afectadas por la deficiencia de Pi.** Estos diagramas muestran las diferencias en las categorías funciones asociadas a los genes diferencialmente regulados entre plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones OP (a) o LP (b) e inoculadas durante 48 h con rhizobios. Las categorías se agrupan en Cd y Cc: división celular y ciclo celular; DR: reparación del ADN; SD: síntesis de ADN; CO: organización celular; Vt y Pt: transporte de vesículas y direccionamiento de proteínas; Sb y A: estrés biótico y abiótico; RS: síntesis de ARN; RT: regulación de la transcripción; PR: procesamiento de ARN; Ps y AAa: síntesis de proteínas y activación de aminoácidos; Dev: desarrollo; Hormona: hormonas; Reg: regulación; PM: modificación de proteínas; PD: degradación de proteínas; Desconocido: sin clasificar sin ontología y desconocido; EF: familias de enzimas; MH: manipulación de metales; Transporte: transporte; Redox: reacciones de oxidación–reducción.

### 6.1.6. La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes relacionados con auxinas y citocininas

Con el propósito de determinar si la deficiencia de Pi afecta la simbiosis a través de un posible desbalance hormonal, se localizaron los aquellos transcritos asociados a la biosíntesis y percepción de auxinas y citocininas. Las hormonas juegan un papel fundamental en las diferentes etapas de la simbiosis entre las leguminosas y rhizobios (Liu *et al.*, 2018). Se ha demostrado que el balance hormonal entre auxinas y citocininas es esencial durante este proceso (Liu *et al.*, 2018). Diversas evidencias experimentales indican que ambas hormonas regulan positivamente la expresión de genes que conforman la vía de señalización en la simbiosis (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Schiessl *et al.*, 2019). Las

citocininas coordinan procesos importantes como la comunicación celular desde la epidermis hasta el córtex, así como la organogénesis del nódulo. Mientras que las auxinas son importantes durante la formación del IT y el desarrollo del nódulo (Roy *et al.*, 2017). El análisis transcriptómico mostró una abundancia diferencial en 20 transcritos en raíces de *P. vulgaris* los cuales están relacionados con la biosíntesis, homeostasis y transducción de auxinas y citocininas. En la figura 6.1.6. podemos observar el mapa de calor que representa a los genes asociados a estas hormonas en donde el color azul representa genes que disminuyen su expresión, el color rojo representa genes que aumentan su expresión y el blanco representa la expresión sin cambios.



**Figura 6.1.6. La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes relacionados con auxinas y citocininas.** Mapa de calor que muestra el cambio de expresión de genes involucrados en la biosíntesis (\*), homeostasis (#), transducción de señales (..) de auxina (a) o citocinina (b) en plántulas de *P. vulgaris* que crecen bajo condiciones OP o LP e inoculadas durante 48 h con rizobios. La escala de calor muestra en rojo valores de alta acumulación mientras el azul representa los valores de baja acumulación.

Para el caso de auxinas (Figura 6.1.6 a) se encontraron 12 transcritos diferencialmente expresados en deficiencia de Pi; seis de ellos involucrados en la biosíntesis, uno involucrado en la homeostasis y cinco asociados a la transducción de señales. De manera interesante, de los 12 transcritos relacionados con auxinas cinco de ellos muestran una disminución en su acumulación en condiciones deficientes de Pi (2 genes relacionados con biosíntesis y 3 genes relacionados a la transducción de señales).

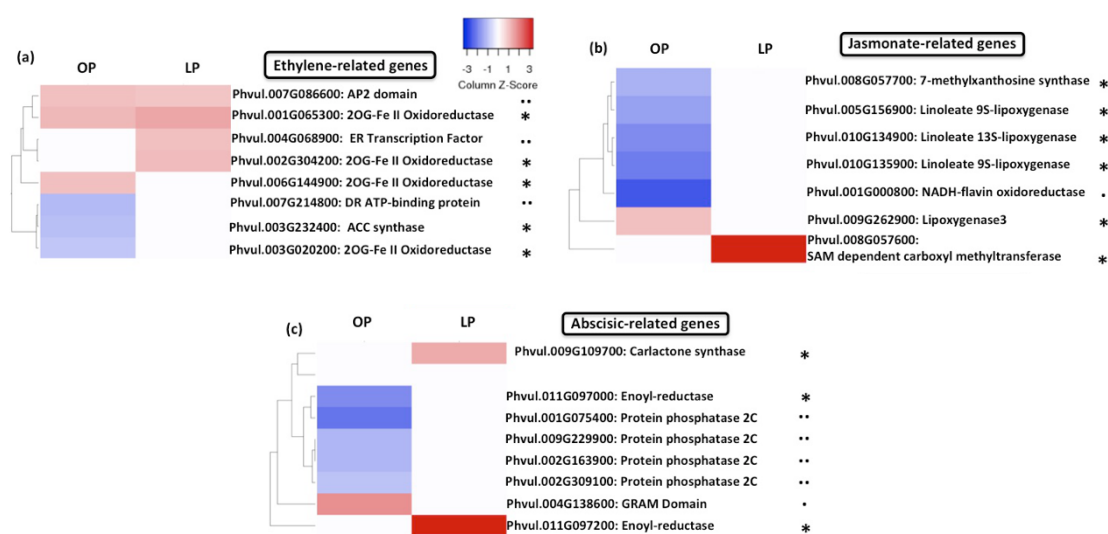
En el caso de las citocininas (Figura 6.1.6 b) se encontraron ocho transcritos; dos de ellos involucrados en biosíntesis, cinco involucrados en homeostasis y uno involucrado en la señalización. De manera interesante, siete de estos transcritos muestran una alta acumulación en condiciones óptimas de Pi, sin embargo en deficiencia de Pi muestran una baja acumulación. La deficiencia de Pi genera cambios en la acumulación de transcritos relacionados con las citocininas.

Estos datos indican que la deficiencia de Pi no solo afecta la organogénesis del nódulo, sino que también impacta en procesos implicados en las etapas iniciales de la simbiosis. El análisis transcriptómico revela que la deficiencia de Pi causa cambios en la acumulación de transcritos principalmente relacionados con biosíntesis y señalización de auxinas y citocininas. Esta baja acumulación podría desencadenar una regulación negativa de las hormonas generando defectos en los eventos moleculares tempranos impidiendo la activación de la expresión de genes simbióticos y en consecuencia defectos en la colonización.

### ***6.1.7 La deficiencia de Pi incrementa la expresión de genes relacionados con etileno, jasmonato y ácido abscísico***

Las citocininas y auxinas no son las únicas hormonas importantes y determinantes durante la simbiosis leguminosa-rhizobio. Existen otras hormonas como; etileno, ácido abscísico y jasmonato, la alta acumulación de estas hormonas conlleva a una reducción en la formación de IT y de nódulos (Liu *et al.*, 2018). El análisis transcriptómico de este estudio reveló ocho transcritos relacionados con etileno; cinco relacionados a biosíntesis y tres a la transducción de señales como se muestra en la figura 6.1.7 a. De estos genes, cuatro de ellos se acumulan

en condiciones deficientes de Pi; dos relacionados a biosíntesis y dos a señalización. Asimismo, se encontraron siete transcritos relacionados con jasmonato; seis de ellos involucrados en la biosíntesis y uno relacionado con la transducción de señales como se muestra en la figura 6.1.7 b. Uno de ellos relacionado con biosíntesis se induce de manera drástica en deficiencia de Pi. Finalmente se encontraron ocho genes relacionados con ácido abscísico; donde tres genes están relacionados a biosíntesis y cinco de ellos a señalización. En este caso observamos que dos de estos transcritos relacionados con biosíntesis de ácido abscísico se acumulan en condiciones de deficiencia de Pi como se muestra en la figura 6.1.7 c.



**Figura 6.1.7. La deficiencia de Pi incrementa la expresión de genes relacionados con etileno, jasmonato y ácido abscísico.** Mapa de calor que muestra el cambio de expresión de genes involucrados en la biosíntesis (\*), homeostasis (#), transducción de señales (..) de etileno (a), jasmonato (b) y ácido abscísico (c) en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en OP o LP e inoculadas durante 48 h con rhizobios. La escala de calor muestra en rojo valores de alta acumulación mientras el azul representa los valores baja de acumulación.

En conjunto estos datos indican que la deficiencia de Pi generará el incremento en los niveles de los transcritos relacionados con biosíntesis de etileno, jasmonato y ácido abscísico. Este aumento podría desencadenar el aumento en la acumulación de estas hormonas, lo que muy

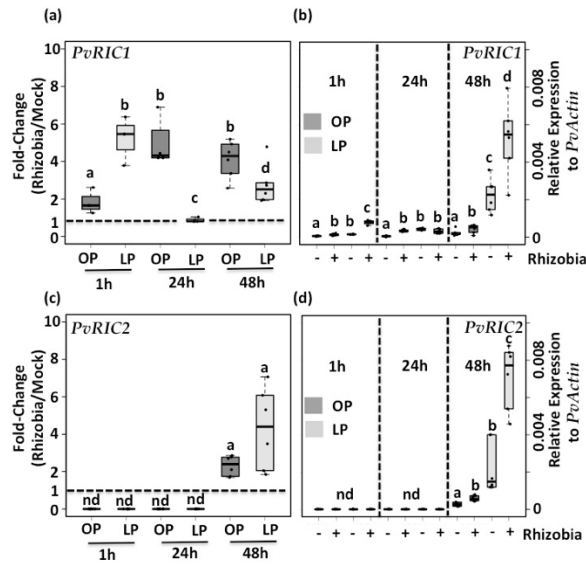


probablemente conduzca a la inhibición de los eventos tempranos tales como la expresión de genes simbióticos así como el proceso de colonización. Es importante resaltar que a pesar de que los eventos tempranos están estrechamente relacionados con la organogénesis del nódulo, ambos eventos están coordinados por dos programas genéticos distintos. Los resultados que se muestran en este apartado permiten explicar parcialmente como se afecta la simbiosis en deficiencia de Pi. Sin embargo aún no es claro si estos eventos iniciales que son afectados por la deficiencia de Pi determinan la reducción en el número de nódulos. Para encontrar respuestas asociadas al control del número de nódulos se evaluó la expresión de genes relacionados con la AON.

#### **6.1.8. La deficiencia de Pi aumenta la expresión de los genes *PvRIC1* y *PvRIC2***

Con base en el hecho de que la deficiencia de Pi desencadena una reducción en el número de nódulos en *P. vulgaris* (Hernández *et al.*, 2009) y que los péptidos *PvRIC1* y *PvRIC2* participan activamente en el proceso de AON, se planteó la hipótesis de que la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* podría verse afectada en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones deficientes de Pi. Para probar esta hipótesis, se evaluó la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en plántulas de *P. vulgaris* cultivadas en condiciones óptimas y deficientes de Pi, sin inocular e inoculadas con *R. tropici* a 1, 24 y 48 horas post-inoculación.

Este análisis reveló que la expresión de *PvRIC1* efectivamente se induce de manera gradual a la 1, 24 y 48 hpi en plántulas de *P. vulgaris* bajo la interacción con rhizobios en condiciones óptimas de Pi como se muestra en la figura 6.1.8. a y b. Por otro lado, la expresión de *PvRIC1* es más alta en plántulas creciendo en condiciones deficientes de Pi en comparación con plántulas en condiciones óptimas de Pi ambas inoculadas con rhizobio. Sorprendentemente logramos observar un incremento en la expresión de *PvRIC1* en plántulas en condiciones de deficiencia de Pi control, el aumento ocurre con y sin rhizobios.



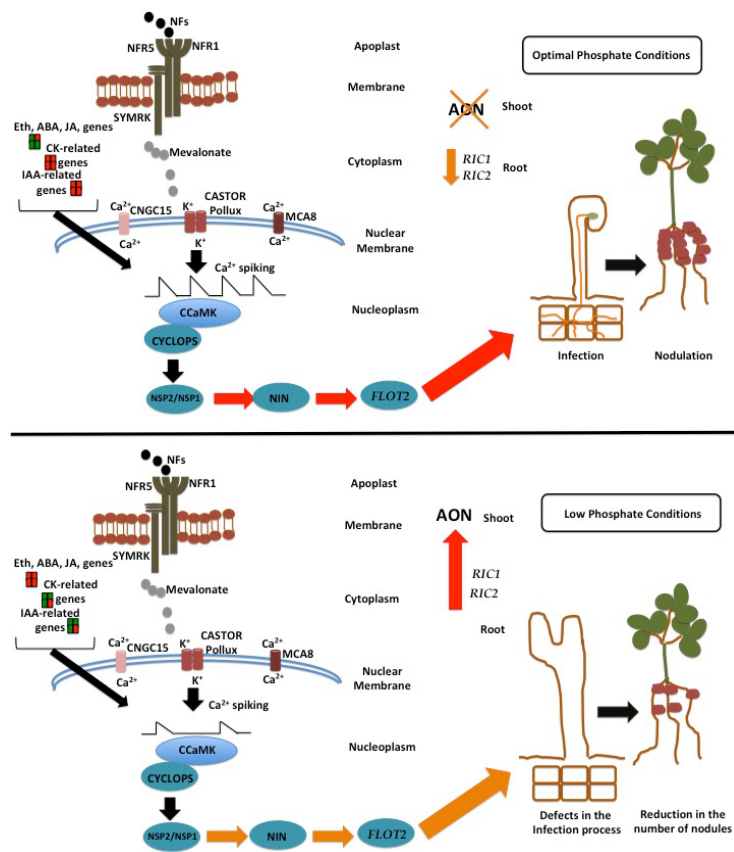
**Figura 6.1.8. La deficiencia de Pi aumenta la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* incluso en ausencia de rhizobios.** Expresión desencadenada por rhizobios de los genes *PvRIC1* (a) y *PvRIC2* (c) en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en OP o LP. Los datos que se muestran son los cambios de expresión (Tratamiento /Control) obtenidos de cuatro réplicas independientes, cada una de las cuales contiene zonas susceptibles de cuatro plantas diferentes. La línea discontinua muestra la expresión basal (por ejemplo, sin inducción desencadenada por rhizobios). Niveles de expresión de *PvRIC1* (b) y *PvRIC2* (d) inoculadas control (-) o y a diferentes tiempos 1, 24 y 48 hpi con rhizobios (+) en plántulas de *P. vulgaris* que crecen en condiciones OP (gris oscuro) o LP (gris claro). Expresión no detectada: ND de *PvRIC2* en una y 24 h después de la inoculación con rhizobios. Los datos que se muestran se obtuvieron de cuatro repeticiones independientes, cada una de las cuales contenía zonas susceptibles de cuatro plantas diferentes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no mostraron diferencias significativas.

En el caso de *PvRIC2* observamos un aumento en su expresión en plántulas creciendo en condiciones óptimas de Pi hasta las 48 hpi con rhizobios como se muestra en la figura 6.1.8. c y d. Asimismo, encontramos que la expresión de *PvRIC2* es más alta en plántulas creciendo en condiciones deficientes de Pi en comparación con plántulas en condiciones óptimas de Pi ambas inoculadas con rhizobio. Sorprendentemente también logramos observar un incremento en la expresión de *PvRIC2* en plántulas en condiciones de deficiencia de Pi control, es decir sin la presencia de rhizobios.

En conjunto, estos datos indican que la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* aumenta en respuesta a los rhizobios en plántulas de *P. vulgaris* deficientes en Pi vs condiciones óptimas de Pi. Asimismo, se demostró que la deficiencia de Pi por sí sola induce la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en ausencia de rhizobios.

### ***6.1.9 Modelo: La deficiencia de fósforo afecta negativamente las etapas tempranas de la simbiosis***

Los datos presentados hasta este momento nos llevan a concluir que la deficiencia de Pi afecta negativamente los eventos tempranos de la simbiosis entre leguminosas y rhizobios, desencadenando una disminución en la expresión de genes esenciales como *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2*. Esta disminución podría contribuir a la disminución de la colonización de las raíces de la leguminosa (Figura 6.1.9.). Estos efectos negativos en la simbiosis podrían desencadenarse por un desequilibrio hormonal entre las auxinas y las citocininas, así como por la activación de la vía de señalización relacionada con el etileno, el jasmonato y ácido abscísico, que son reguladores negativos de las eventos moleculares de esta simbiosis (Figura 6.1.9.). Finalmente, la reducción en el número de nódulos observados en condiciones deficientes en Pi también puede explicarse por una activación constitutiva del proceso AON a través de la activación de *PvRIC1* y *PvRIC2* (Figura 6.1.9.); sin embargo, se necesita más experimentación para confirmar esta hipótesis.



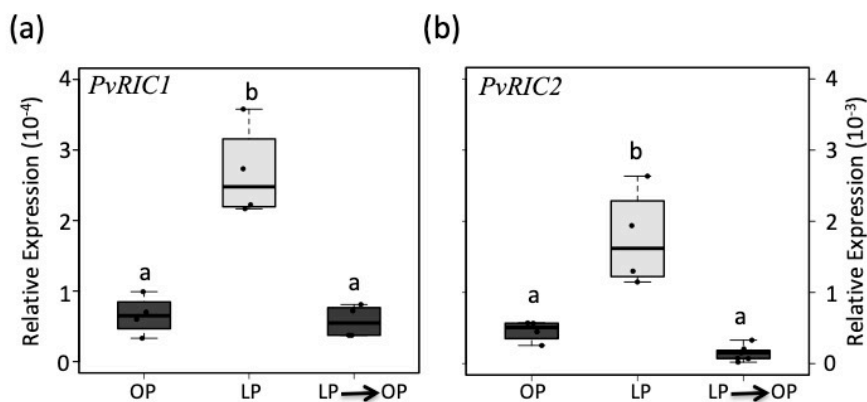
**Figura 6.1.9. Modelo propuesto de los efectos de la deficiencia de Pi en las primeras etapas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici*.** Tras la percepción de FN se produce una variedad de respuestas moleculares. Entre ellos la activación de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup>, lo cuales se transducen por CcaMK que forma un complejo con el factor de transcripción CYCLOPS. Este complejo activa los factores de transcripción NSP2/NSP1 y NIN. La acción coordinada de estos factores de transcripción activa la expresión de diferentes genes (por ejemplo, *FLOT2*) requeridos para la infección de la raíz por rizobios. Estos eventos moleculares están positivamente regulados por un delicado equilibrio entre las fitohormonas auxinas (IAA) y citocininas (CK). Por su parte la expresión de los genes *RIC1* y *RIC2*, que participan en el proceso AON, no está totalmente activada en esta etapa de la simbiosis. La acción coordinada de estos eventos moleculares conduce a una simbiosis exitosa. De acuerdo con nuestros datos, la deficiencia de Pi podría disminuir la expresión de genes relacionados con biosíntesis y señalización de auxinas y citocininas. En contraste un aumento en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de ácido abscísico (ABA), etileno (Eth) y jasmonato (JA). Este desequilibrio podría afectar la expresión de genes relacionados con la simbiosis (p. ej., *NSP2*, *NIN* y *FLOT2*) necesarios para el proceso de infección por rizobios. Asimismo, la deficiencia de Pi induce la expresión de *RIC1* y *RIC2*, incluso en ausencia de rizobios. Todos estos defectos en las primeras etapas de esta simbiosis podrían conducir a una reducción en el número de nódulos en *P. vulgaris*. El color rojo representa genes regulados positivamente, el naranja regulación negativa de la expresión y el verde genes que muestran disminución en su expresión.

Los datos presentados en esta sección se publicaron en la revista *Genes (Basel)* en el año 2018 donde fungí como primera autora; **Isidra-Arellano M C, Reyero- Saavedra M, Sánchez-Correa M, ... Valdés-López, O. (2018) Phosphate Deficiency Negatively Affects Early Steps of the Symbiosis between Common Bean and Rhizobia. *Genes.* 9 (10), 498.**

## 6.2. La deficiencia de Pi activa componentes de la vía de Autoregulación de la Nodulación

### 6.2.1. La deficiencia de Pi aumenta la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2*

La expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* se activa tras las primeras divisiones celulares del córtex inducidas por rhizobios (Lim *et al.*, 2011). Su actividad implica la regulación meristemática nodular, por lo que la sobreexpresión de estos genes generaría una disminución del número de nódulos. Por lo tanto, para comprobar que la deficiencia de Pi genera cambios en *PvRIC1* y *PvRIC2* se analizó su expresión en plántulas de *P. vulgaris* creciendo en deficiencia de Pi y sin inocular con rhizobios.

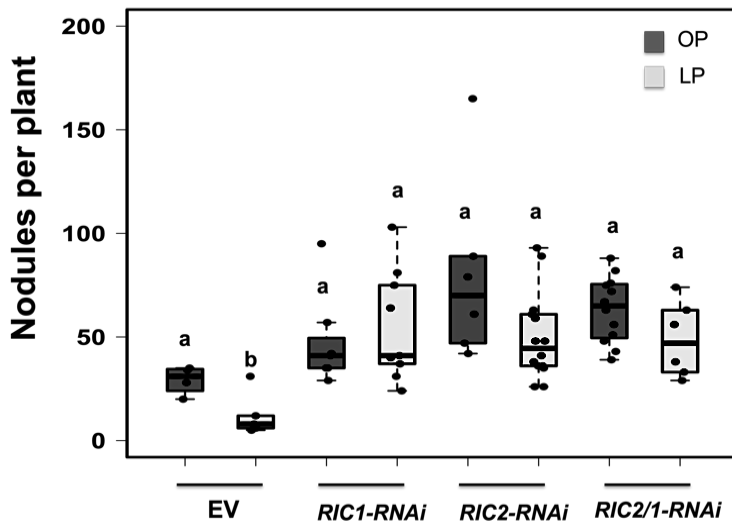


**Figura 6.2.1. La deficiencia de Pi activa la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2*.** Niveles de expresión de *PvRIC1* (a) y *PvRIC2* (b) en respuesta a la deficiencia de Pi en raíces de *P. vulgaris*. Los niveles de expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* se evaluaron en raíces de plántulas de *P. vulgaris* (a-b) en condiciones óptimas-Pi OP, condiciones de bajo Pi LP y en el tercer tratamiento se restablecieron las condiciones óptimas de Pi (LP→OP). Los datos que se muestran se obtuvieron de cinco réplicas biológicas independientes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Este análisis indicó que la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* aumentó cuatro veces más en deficiencia de Pi respecto a la condición óptima de Pi como se muestra en la figura 6.2.1. Para reforzar este análisis, se restablecieron las concentraciones óptimas de Pi durante 24 horas a plántulas de *P. vulgaris* que previamente fueron sometidas a deficiencia de Pi durante tres días. Cuando se restablecen los niveles óptimos de Pi la transcripción de ambos genes volvió a los niveles basales observados en las plántulas control que crecían en condiciones óptimas de Pi, lo cual confirma que la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* es también modulada por niveles de Pi (Figura 6.2.1). En conjunto, nuestros datos indican que la deficiencia de Pi genera un aumento en la expresión tanto de *PvRIC1* como de *PvRIC2* en *P. vulgaris*. El principal objetivo de los péptidos RIC1 y RIC2 es activar la vía de AON para controlar el número de nódulos en condiciones normales de Pi. La activación prematura y potencializada de estos péptidos por la deficiencia de Pi podría desencadenar una reducción en el número de nódulos.

### **6.2.2. *PvRIC1* y *PvRIC2* regulan la nodulación en deficiencia de Pi**

Para evaluar la participación de *PvRIC1* y *PvRIC2* en la nodulación bajo deficiencia de Pi, se desarrollaron construcciones de silenciamiento para estos dos genes mediante RNA de interferencia (RNAi). Las construcciones *PvRIC1-RNAi* y *PvRIC2-RNAi* se expresaron en raíces de *P. vulgaris* utilizando el método de transformación mediado por *Agrobacterium rhizogenes*. Una vez generadas las raíces *PvRIC1-RNAi* y *PvRIC2-RNAi*, se trataron con condiciones óptimas de Pi vs condiciones deficientes Pi así como inoculadas con *R. tropici*. Posteriormente, se evaluó el número de nódulos 20 días post-inoculación con *R. tropici*.



**Figura 6.2.2. *PvRIC1* y *PvRIC2* controlan la nodulación en deficiencia de Pi.** Número de nódulos (20dpi) de plantas *P. vulgaris* del vector vacío (EV), *PvRIC1-RNAi*, *PvRIC2-RNAi*, *PvRIC1/2-RNAi* en condiciones óptimas de Pi OP (gris oscuro) y condiciones deficientes de Pi LP (gris claro). Los datos que se muestran se obtuvieron de cinco réplicas biológicas independientes cada réplica con cinco plantas. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.2.2 en la que se observa el número de nódulos de plantas del vector vacío (EV), *PvRIC1-RNAi*, *PvRIC2-RNAi* y *PvRIC1/2-RNAi*, en condiciones de óptimas de Pi; OP o deficientes de Pi; LP. Este análisis reveló que plantas compuestas del vector vacío muestran una disminución de más del 50% en el número de nódulos en deficiencia de Pi (Figura 6.2.2.). De manera interesante, cuando comparamos el número de nódulos en plantas *PvRIC1-RNAi*, *PvRIC2-RNAi* y *PvRIC1/2-RNAi* en deficiencia de Pi vs condiciones óptimas, observamos el mismo número de nódulos. Estos datos sugieren que el silenciamiento de *PvRIC1* y *PvRIC2* impide la reducción en el número de nódulos observado en las plantas del vector vacío.

Estos resultados sugieren que tanto *PvRIC1* y *PvRIC2* son componentes esenciales para la regulación de la nodulación no solo en condiciones óptimas, sino que también bajo deficiencia de Pi. Además, estos resultados proporcionan más evidencias que refuerzan la hipótesis de que la AON podría jugar un papel clave en la adaptación de plantas de *P. vulgaris* ante la deficiencia de Pi.

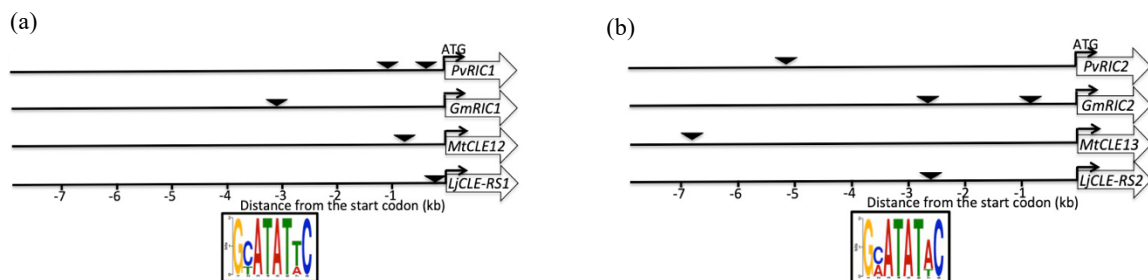
### **6.2.3. Las regiones promotoras de *PvRIC1* y *PvRIC2* poseen elementos regulatorios cis P1BS**

Para entender las bases moleculares que coordinan la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en condiciones deficientes de Pi, se realizó un análisis *in silico* de la región promotora de estos dos genes relacionados con AON. Para este propósito, de la secuencia del genoma de *P. vulgaris* disponible en Phytozome v.13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) se obtuvieron 7 kb río arriba del codón de inicio de ambos genes. Las secuencias de los promotores de *PvRIC1* y *PvRIC2* fueron analizadas bioinformáticamente usando el programa NEW PLACE (Higo *et al.*, 1999), el cual analiza las secuencias de los promotores e identifica diferentes elementos regulatorios *cis*. A través de este análisis se identificaron diferentes elementos reguladores *cis* potenciales en las regiones promotoras de estos dos genes (Tabla Suplementaria S2 y Tabla Suplementaria S3). Entre ellos se identificaron los elementos “PHR1 Binding Sites” (P1BS), los cuales tiene una secuencia de consenso GNATATN como se muestra en la Figura 6.2.3.. Los elementos regularorios *cis* P1BS resultan ser de gran interés, ya que en estos sitios se une el factor de transcripción PHR1, el cual se considera un regulador maestro de las respuestas ante la deficiencia de Pi en las plantas (Bari *et al.*, 2006). Para el caso de *PvRIC1* se encontraron dos elementos regulatoris *cis* P1BS el primero localizado entre -299 y -306 pb río arriba del codón de inicio, y el segundo ubicado entre los pares de bases -1018 y -1025 pb río arriba del codón de inicio (Figura 6.2.3.). En el promotor de *PvRIC2* se localizó un sitio P1BS entre el -5145 y -5152 pb río arriba del codón de inicio (Figura 6.2.3.).

Para conocer sí estos elementos *cis* P1BS están conservados entre leguminosas, se realizó el mismo análisis *in silico* de los promotores de los ortólogos de *PvRIC1* y *PvRIC2* en *G. max*, *M. truncatula* y *L. japonicus*. Los resultados mostraron que los sitios P1BS también se encuentran presentes en estas leguminosas, la secuencia consenso muestra una alto grado



de conservación como se muestra en la figura 6.2.3.a. Para el caso del ortólogo de *PvRIC1* encontramos un elemento P1BS en *G. max*, *M. truncatula* y *L. japonicus* localizados entre las primeras 4 kb de sus promotores. En el caso de *PvRIC2* encontramos 2 elementos P1BS en *G. max* y un sitio P1BS en *M. truncatula* y *L. japonicus*, sin embargo en este caso encontramos estos sitios más alejados del codón de inicio encontrando entre 1-7 kb río arriba. La secuencia consenso muestra un alto grado de conservación como se muestra en la figura 6.2.3.b.



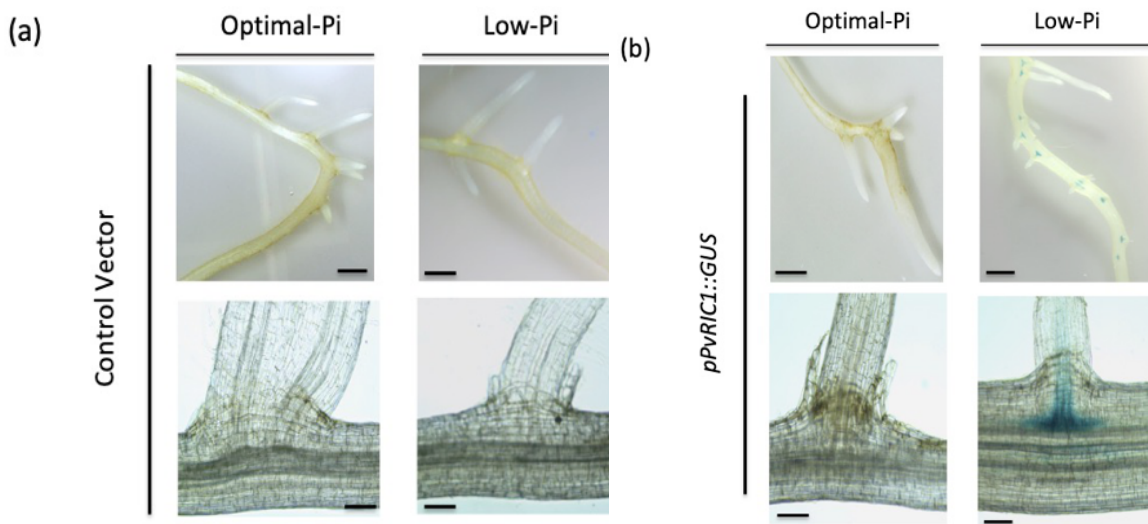
**Figura 6.2.3. Los promotores de *PvRIC1* y *PvRIC2* contienen elementos regulatorios *cis* P1BS.** (a) Elementos reguladores *cis* de P1BS presentes en las regiones promotoras de *PvRIC1* y en sus genes ortólogos en *Glycine max* (*GmRIC1*), *Medicago truncatula* (*MtCLE12*) y *Lotus japonicus* (*LjCLE-RS1*), en la parte inferior se muestra la secuencia consenso de los sitios P1BS (GNATATNC). (b) Elementos reguladores *cis* de P1BS putativos en las regiones promotoras de *PvRIC2* y en sus genes ortólogos en *G. max* (*GmRIC2*), *M. truncatula* (*MtCLE13*) y *L. japonicus* (*LjCLE-RS2*), en la parte inferior se muestra la secuencia consenso de los sitios P1BS (GNATATNC).

En conjunto estos datos indican que los promotores de los genes *PvRIC1* y *PvRIC2* contienen elementos regulatorios *cis* P1BS, reconocidos por PHR1. La presencia de estos sitios sugiere que PHR1 podría reconocer y activar la transcripción DE *PvRIC1* y *PvRIC2* en deficiencia de Pi.

#### 6.2.4. Actividad transcripcional del promotor de *PvRIC1* en deficiencia de Pi

La presencia de elementos *cis* P1BS sugiere que la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* puede estar regulada a través de estos sitios regulatorios en deficiencia de Pi. Para probar esta hipótesis, se hizo una fusión transcripcional del promotor de *PvRIC1* con el gen reportero

GUS ( $\beta$ -glucuronidasa). Esto se realizó únicamente con el promotor de *PvRIC1* debido que el sitio PIBS contenido en el promotor de *PvRIC2* se encuentra muy alejado del codón de inicio (-5145 y -5152 pb), lo cual resultó ser una limitante técnica para su amplificación y clonación. La construcción *pPvRIC1::GUS* se expresó en raíces de *P. vulgaris* utilizando el método de transformación mediado por *A. rhizogenes*. Una vez generadas las raíces *pPvRIC1::GUS*, se trataron en condiciones óptimas de Pi y deficientes de Pi durante tres días.



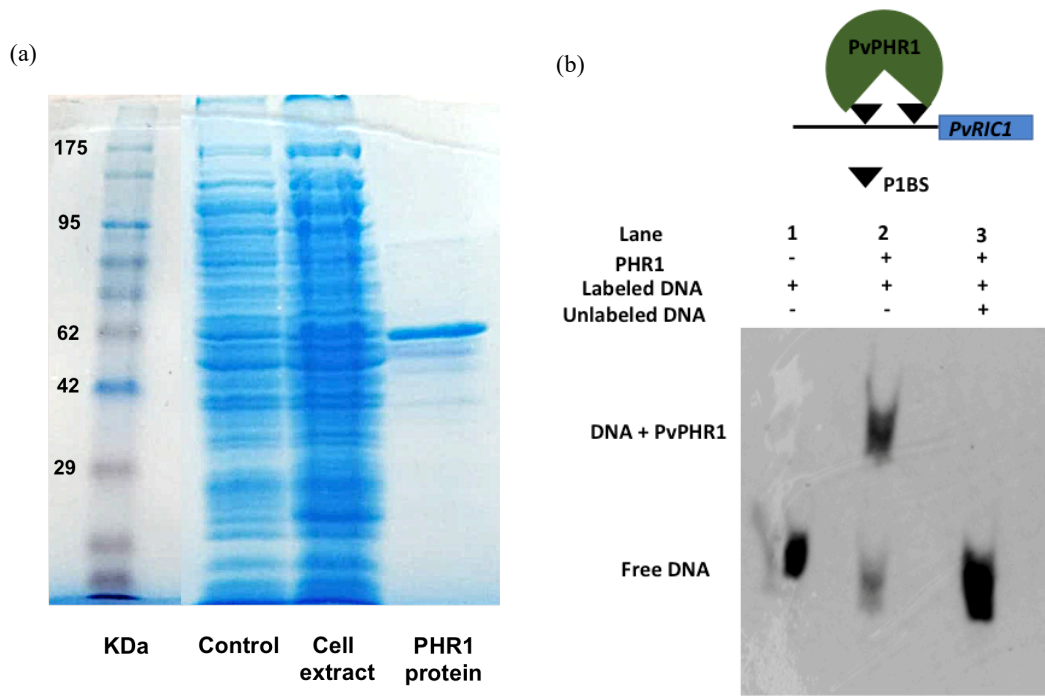
**Figura 6.2.4.** *PvRIC1* se expresa en las células del periciclo de la raíz en respuesta a la deficiencia de Pi. Actividad transcripcional en raíces de *P. vulgaris* del vector vacío (a) o *pPvRIC1::GUS::GFP* (b) en condiciones óptimas y deficientes de Pi. Cuarenta y ocho de 50 raíces transgénicas *pPvRIC1::GUS* en condiciones deficientes de Pi mostraron una fuerte señal de GUS en las células del periciclo (b). Las barras de escala que se muestran en las imágenes superiores de cada panel representan 500  $\mu$ m, mientras que las que se muestran en las imágenes inferiores de cada panel representan 100  $\mu$ m. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

Este análisis reveló que las raíces del vector vacío o *pPvRIC1::GUS* que crecen en condiciones óptimas de Pi no muestran ninguna actividad GUS como se puede observar en la figura 6.2.4.a, lo que indica que, en condiciones normales de crecimiento, el promotor no está activo. En contraste, el 90% de las raíces *pPvRIC1::GUS* evaluadas (n=50) mostraron una fuerte señal de GUS en las células del periciclo en condiciones de deficiencia de Pi como se muestra en la figura 6.2.4.b.

En resumen, estos resultados indican que *PvRIC1* se expresa en las células del periciclo de raíces de *P. vulgaris* en condiciones deficientes de Pi. Además, indican que la expresión espacio-temporal de *PvRIC1* en respuesta a la deficiencia de Pi es similar al patrón de expresión informado para este gen en respuesta a rhizobios en *G. max* y *L. japonicus* (Lim *et al.*, 2011; Soyano *et al.*, 2014).

#### **6.2.5. *PHR1* se une a los sitios P1BS contenidos en el promotor de *PvRIC1***

Se ha demostrado que los genes que se regulan transcripcionalmente por el factor de transcripción PHR1 contienen en su región promotora al menos un elemento *cis* P1BS (Bari *et al.*, 2006). La presencia de estos elementos en los promotores de *PvRIC1* y *PvRIC2*, así como sus ortólogos en diferentes leguminosas, sugiere que PHR1 podría reconocer estos sitios con el fin de activar su transcripción. Para comprobar experimentalmente esta hipótesis, se realizó un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para comprobar la unión de PHR1 a los sitios P1BS contenidos en la región promotora de *PvRIC1*. Para este ensayo, la proteína PvPHR1 se expresó en el sistema de *E. coli* (BL21) utilizando el vector pDEST<sup>TM</sup>17 que permite el etiquetado de proteínas a través de un epítotope de 6XHis en el N-terminal. Asimismo, se usó como sonda la región promotora de *PvRIC1* de 1200 pb donde se encuentran presentes los elementos P1BS. En la figura 6.2.5. se muestra la proteína PHR1 purificada a través de la utilización de columnas de níquel del Kit His-Spin Protein Miniprep<sup>TM</sup> (Zymo Research). Una vez purificada la proteína PHR1, el EMSA se realizó en gel de poliacrilamida nativo.



**Figura 6.2.5. PHR1 se une a los sitios P1BS contenidos en el promotor de *PvRIC1*.** (a) Purificación de la proteína PvPHR1, electroforesis (SDS PAGE 15%) y el gel fue teñido con azul de Coomassie. (b) Análisis de movilidad electroforética (EMSA) del factor de transcripción PHR1 y la región promotora de *PvRIC1* que contiene el elemento regulario *cis* P1BS. El primer carril podemos observar el control-DNA biotinilado, en el segundo carril el DNA-biotinilado + la proteína PvPHR1 y en el tercer carril se cargó el DNA-biotinilado + la proteína PvPHR1+DNA no biotinilado como competidor.

En la Figura 6.2.5.b se muestra el EMSA, en el primer carril se observa el control, es decir únicamente el DNA biotinilado, en el segundo carril se observa el DNA-biotinilado (20 fmol) + la proteína PvPHR1 y en el tercer carril el DNA-biotinilado + la proteína PvPHR1+DNA no biotinilado (4 pmol) como competidor. Este ensayo mostró un retardo en la movilidad en el segundo carril; promotor de *PvRIC1* + la proteína PvPHR1. Esto demuestra que la unión de la proteína PvPHR1 a la región promotora de *PvRIC1* forma un complejo más grande provocando un retardo en la movilidad. En el tercer carril, se demuestra que el cambio de señal observado en el carril dos puede evitarse mediante la

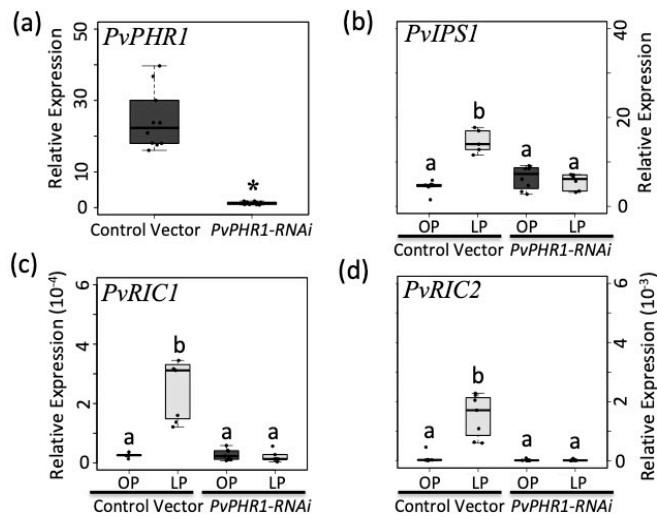
competencia interacción específica DNA-proteína, al añadir en una concentración mayor (exceso molar de 200 veces) el DNA no marcado.

Los resultados obtenidos confirman que PHR1 se une a los elementos *cis* P1BS contenidos en el promotor de *PvRIC1*. A pesar de que no se logró demostrar la unión a *PvRIC2*, la presencia de los elementos *cis* P1BS contenidos en su promotor sugieren que también PHR1 es capaz de reconocer este sitio y unirse a él. Estas evidencias sugieren fuertemente que PHR1 podría regular la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en condiciones de deficiencia de Pi a través de la unión a los sitios P1BS.

#### **6.2.6. PHR1 regula la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2***

Los datos obtenidos demuestran la unión de PHR1 a los sitios P1BS localizados en el promotor de *PvRIC1*, muy probablemente también de *PvRIC2*. Con base a esto surge la hipótesis de que no solo *PvNIN* es capaz de controlar la expresión de estos genes, sino que también podría ser regulada por PHR1 bajo condiciones deficientes de Pi.

Para comprobar que PHR1 controla la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* se generó la construcción *PvPHR1-RNAi*. Para este fin, se generaron raíces *PvPHR1-RNAi* en *P. vulgaris* a través de la transformación mediada por *A. rhizogenes*. Estas raíces se trataron en condiciones óptimas y deficientes de Pi durante tres días. Como primer paso de este análisis se comprobó la eficiencia del silenciamiento de *PvPHR1* evaluando sus niveles de expresión mediante RT-qPCR. Como se muestra en la figura 6.2.6 se obtuvo un nivel de silenciamiento del casi 100% de su expresión. Para verificar este nivel de silenciamiento, se midió la expresión del gen “*Induced by Phosphate Starvation1*” (*IPSI*), el cual se regula transcripcionalmente por PHR1 a través de la unión directa al elemento regulador *cis* P1BS. Como se puede observar en la figura 6.2.6 las raíces del vector vacío muestran un aumento en la expresión de *PvIPSI* en condiciones deficientes de Pi. En contraste, las raíces *PvPHR1-RNAi* no muestran cambios de expresión en ambas condiciones de Pi.



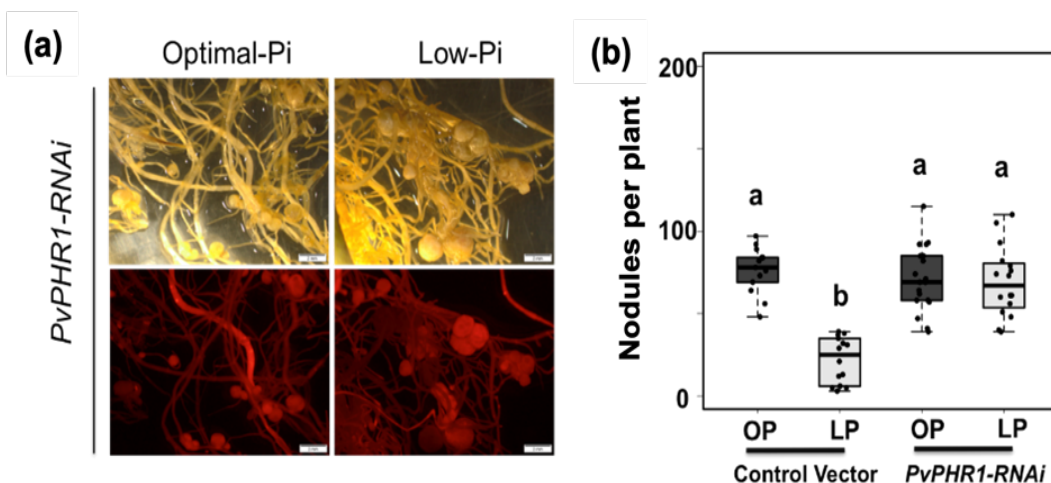
**Figura 6.2.6. PHR1 regula la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2*.** (a) Niveles de silenciamiento génico de *PvPHR1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Niveles de expresión de *PvIPS1* (b), *PvRIC1* (c) y *PvRIC2* (d) en raíces transgénicas de *P. vulgaris* del vector vacío (EV) y *PvPHR1-RNAi*. Las plantas compuestas se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) o deficientes Pi (LP) sin inocular. Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con diez raíces transgénicas de diferentes plantas compuestas. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Una vez comprobada la funcionalidad del silenciamiento de *PvPHR1*, se evaluó la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en raíces *PvPHR1-RNAi*, tanto en condiciones óptimas como deficientes de Pi. Como se muestra en la figura 6.2.6 las raíces del vector vacío muestran un aumento en la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* en condiciones deficientes de Pi. En contraste, las raíces *PvPHR1-RNAi* no muestran diferencias en la expresión en ambas condiciones de Pi. Estos resultados, muestran que el silenciamiento génico de *PvPHR1* abate el aumento en la expresión *PvRIC1* y *PvRIC2* observada en deficiencia de Pi. Lo que demuestra que *PvPHR1* coordina la expresión de estos dos genes en deficiencia de Pi.

### 6.2.7. *PHR1* regula la nodulación en deficiencia de Pi

Los datos obtenidos hasta el momento demuestran que *PvPHR1* regula la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2* sin embargo, aún no es claro cual es el papel de *PHR1* en la nodulación. Dado que la activación de los péptidos *RIC1* y *RIC2* activa la vía de AON y controla el número de nódulos, surge la hipótesis de que *PHR1* juega un papel clave en la regulación del número de nódulos en deficiencia de Pi.

Para comprobar esta hipótesis se evaluó la nodulación en raíces *PvPHR1-RNAi* y en vector vacío (control), tanto en condiciones óptimas y deficientes de Pi. Estas raíces se inocularon con *R. tropici* y posterior a los 20 días después de la inoculación se evaluó el número de nódulos.



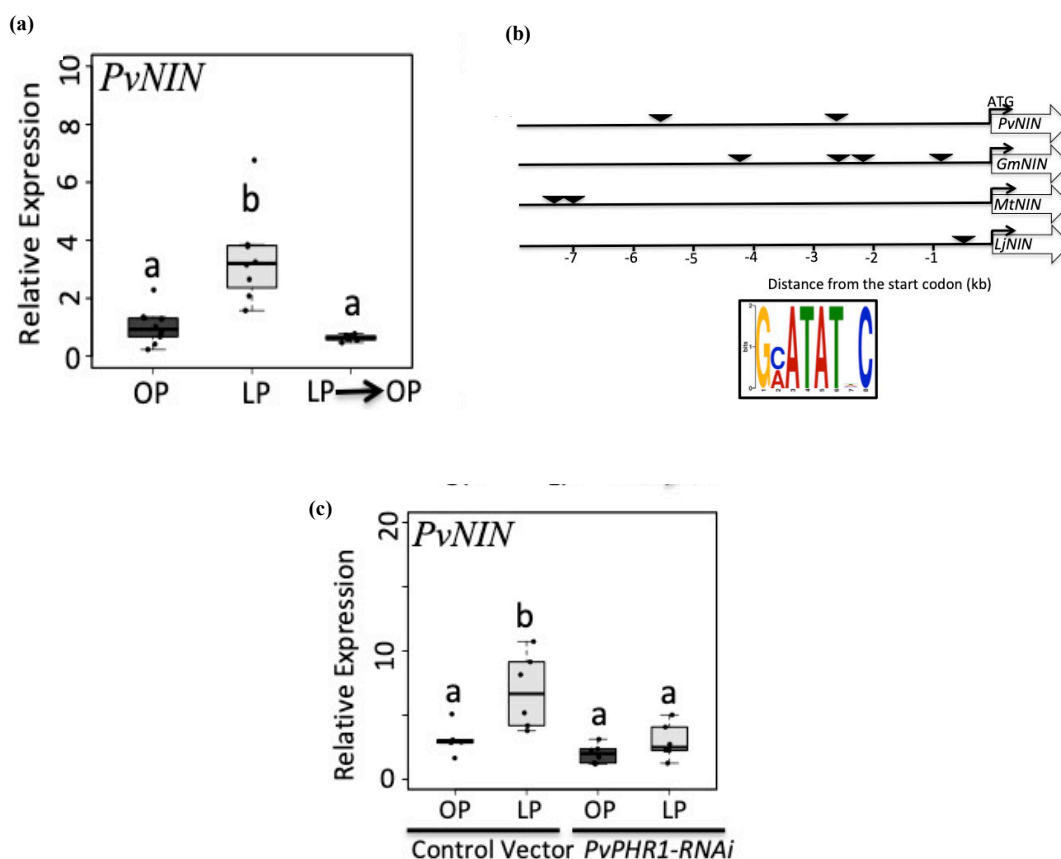
**Figura 6.2.7. *PHR1* regula la nodulación en deficiencia de Pi.** (a) Nódulos de plantas compuestas del vector vacío y de *PvPHR1-RNAi* de *P. vulgaris* las cuales se trataron en óptimo Pi (OP) y deficientes de Pi (LP) inoculadas con rhizobio (20 dpi). (b) Número de nódulos de plantas compuestas del vector vacío y de *PvPHR1-RNAi* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y en condiciones deficientes de Pi (LP) inoculadas con rhizobio (20 dpi). Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con 5 raíces transgénicas de diferentes plantas compuestas. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

En la figura 6.2.7 se muestran imágenes de los nódulos de raíces *PvPHR1-RNAi* en condiciones óptimas vs deficientes de Pi. Los resultados obtenidos en la evaluación del número de nódulos indican que las raíces del vector vacío forman menos del 50 % de nódulos en deficiencia de Pi en comparación con las raíces en condiciones de óptimo Pi (Figura 6.2.7). Por el contrario, las plantas *PvPHR1-RNAi* desarrollan el mismo número de nódulos tanto en condiciones óptimas como deficientes de Pi (Figura 6.2.7). Estos datos en conjunto indican que PHR1, a través de la regulación de la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2*, regula el número de nódulos en condiciones de deficiencia de Pi.

### **6.2.8. La deficiencia de Pi también modula la expresión de *PvNIN***

Estudios previos demuestran que bajo condiciones óptimas de Pi y en interacción con rizobios NIN activa la transcripción de *RIC1* y *RIC2* y activa la AON (Soyano *et al.*, 2014). Debido a que los resultados de nuestro estudio indican que la deficiencia de Pi activa la expresión tanto de *PvRIC1* como de *PvRIC2*, planteamos la hipótesis de que la deficiencia de Pi también podría activar la expresión de *PvNIN*. Para conocer más acerca de la participación de *PvNIN*, se evaluó su expresión en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas y deficientes de Pi y un tercer tratamiento donde se restablecen los niveles óptimos de Pi durante 24 horas. Este análisis indicó que, al igual que los *PvRIC1* y *PvRIC2*, la expresión de *PvNIN* se incrementa en condiciones deficientes de Pi y en la ausencia de rizobios como se muestra en la figura 6.2.8 a. De manera interesante, cuando se restablecen los niveles de Pi a la planta, la expresión de *PvNIN* regresó a los niveles basales observados en las plántulas control que crecían en condiciones óptimas de Pi (Figura 6.2.8 a). Para obtener más información sobre la expresión de *PvNIN*, realizamos el análisis *in silico* de la región promotora para identificar la posible presencia de el elemento *cis* P1BS. Este análisis identificó dos elementos P1BS en la región promotora de *PvNIN* en las primeras 6 kb río arriba del codón de inicio como se muestra en la figura 6.2.8.b en *P. vulgaris*. Asimismo, se realizó este análisis en los genes ortólogos de *PvNIN* en *G. max*, *M. truncatula* y *L. japonicus*, en donde se encontraron cuatro, dos y un elemento P1BS, respectivamente. Estos datos indican que la presencia de los elemento P1BS se encuentran conservados entre leguminosas, y que su presencia sugiere la regulación mediada por PHR1.



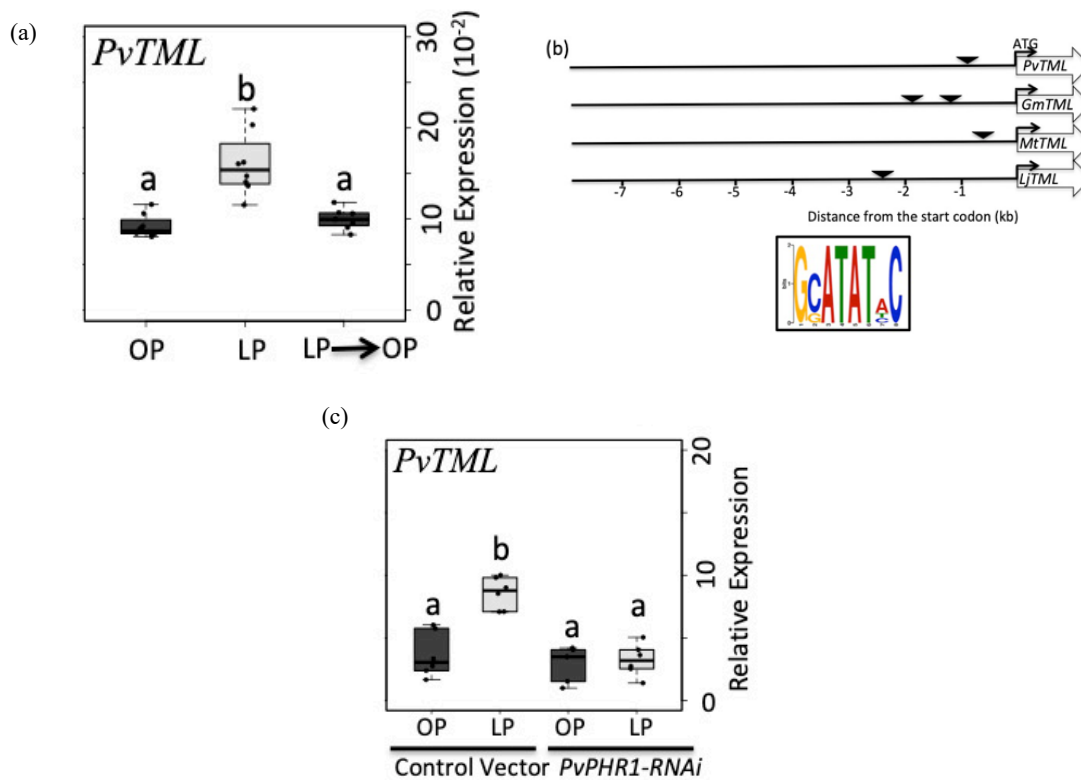


**Figura 6.2.8. La deficiencia de Pi también modula la expresión de *PvNIN*.** (a) Niveles de expresión de *PvNIN* en respuesta a la deficiencia de Pi en raíces de *P. vulgaris*. Los niveles de expresión de *PvNIN* se evaluaron en raíces de plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas-Pi (OP), condiciones de bajo Pi (LP) y en el tercer tratamiento se restablecieron las condiciones óptimas de Pi durante 24 horas (LP→OP). Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con tres raíces de diferentes plantas. (b) Elementos reguladores *cis* de P1BS en las regiones promotoras de *PvNIN* y en sus genes ortólogos en *G. max* (*GmNIN*), *M. truncatula* (*MtNIN*) y *L. japonicus* (*LjNIN*), en la parte inferior se muestra la secuencia consenso de los sitios P1BS (GNATATNC). (c) Niveles de expresión de *PvNIN* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* del vector vacío o de *PvPHR1-RNAi*. Las plantas se trataron con OP y LP y en ausencia de rhizobios. Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con diez raíces transgénicas de diferentes plantas compuestas. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Para comprobar que PHR1 modula la expresión de *PvNIN*, se evaluó la expresión de este gen en raíces de *PvPHR1-RNAi*. Este análisis transcripcional indicó que la expresión de *PvNIN* se redujo significativamente en las raíces transgénicas de *PvPHR1-RNAi* en comparación con las raíces del vector de control (Figura 6.2.8 c). En conjunto, nuestros datos indican que la deficiencia de Pi activa la expresión de componentes críticos de la vía AON como *PvNIN*, asimismo que la activación de esta vía probablemente dependa del factor de transcripción PvPHR1.

### **6.2.9. La deficiencia de Pi también modula la expresión de *PvTML***

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el factor de transcripción PHR1 participa en la regulación de *PvNIN*, *PvRIC1* y *PvRIC2* en condiciones de deficiencia de Pi. Sin embargo, existe otro componente de la AON que es esencial para la regulación meristemática nodular, se trata de *Too Much Love (TML)* (Takahara *et al.*, 2013). Con base a los datos obtenidos hasta el momento, planteamos la hipótesis de que la deficiencia de Pi también puede activar la expresión de *TML*. Para conocer más acerca de la participación de *PvTML*, se evaluó su expresión en plántulas de *P. vulgaris* en condiciones óptimas y deficientes de Pi y un tercer tratamiento donde se restablecen los niveles óptimos de Pi durante 24 horas. Este análisis transcripcional indicó que la expresión de *PvTML* aumentó en un 50% en plantas deficientes de Pi como se muestra en la figura 6.2.9. Asimismo, observamos que cuando los niveles óptimos de Pi se restablecen, la expresión de *TML* también muestra niveles de expresión basales (Figura 6.2.9). Estos resultados demuestran que la deficiencia de Pi activa la expresión de otro componente clave de la AON como lo es *TML*. Para obtener más información sobre la expresión de *PvTML*, realizamos el análisis *in silico* de la región promotora para identificar la posible presencia de elementos *cis* P1BS. Este análisis identificó un elemento P1BS en la región promotora de *PvTML* en la primera 1 kb río arriba del codón de inicio como se muestra en la figura 6.2.9 en *P. vulgaris*. Asimismo, se realizó este análisis en los genes ortólogos de *PvTML*, se encontraron dos en *G. max* y uno en *M. truncatula* y *L. japonicus*. Estos datos indican que la presencia de los elementos P1BS se encuentra conservadas entre leguminosas, y que su presencia sugiere una regulación mediada por PHR1.



**Figura 6.2.9. La deficiencia de Pi también modula la expresión de *PvTML*.** (a) Niveles de expresión de *PvTML* en raíces de plántulas de *P. vulgaris* en óptimo-Pi (OP), deficiente Pi (LP) y el tercer tratamiento se restablecieron las condiciones óptimas de Pi durante 24 horas (LP→OP). Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con tres raíces de diferentes plantas. (b) Elementos reguladores *cis* de P1BS en las regiones promotoras de *PvTML* y en genes ortólogos en *G. max* (*GmTML*), *M. truncatula* (*MtTML*) y *L. japonicus* (*LjTML*), en la parte inferior se muestra la secuencia consenso de los sitios P1BS (GNATATNC). (c) Niveles de expresión de *PvTML* en raíces de *P. vulgaris* del vector vacío y *PvPHR1-RNAi*. Las plantas se trataron con OP y LP sin inocular. Los datos que se muestran se obtuvieron de seis réplicas biológicas independientes, cada una con diez raíces transgénicas de diferentes plantas compuestas. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Para comprobar que PHR1 modula la expresión de *PvTML*, se evaluó la expresión de este gen en raíces *PvPHR1-RNAi* de *P. vulgaris*. Este análisis transcripcional indicó que la expresión de *PvTML* se redujo significativamente en las raíces transgénicas de *PvPHR1-RNAi* en comparación con las raíces transgénicas del vector de control (Figura 6.2.9).

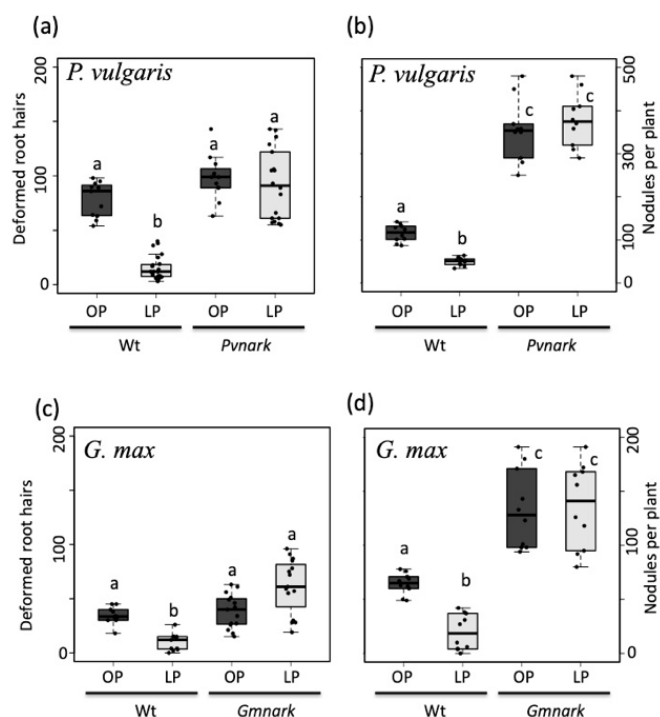
En conjunto, nuestros datos indican que la deficiencia de Pi activa la expresión de componentes críticos de la vía AON como *PvTML*, asimismo que la activación de esta vía probablemente dependa del factor de transcripción PvPHR1. Hasta este punto se ha demostrado que la deficiencia de Pi activa a todos los componentes conocidos de la AON de manera dependiente de la actividad de PHR1. Sin embargo, la AON es un proceso sistémico en condiciones normales de Pi, por ello es importante determinar la dinámica de activación de la AON en deficiencia de Pi.

### **6.3 La inhibición de la nodulación de leguminosas por deficiencia de Pi depende de la vía de Autorregulación de la Nodulación**

#### **6.3.1. La deficiencia de Pi no afecta los procesos simbióticos en plantas mutantes *nark***

La reducción del número de nódulos es uno de los efectos negativos de la deficiencia de Pi en muchas leguminosas, incluyendo a *P. vulgaris* (Hernández *et al.*, 2009). Asimismo, la deficiencia de Pi reduce el número de deformaciones de pelos radicales inducidas por rizobios así como la formación de ITs, requeridos para el proceso de infección (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). Para conocer si deficiencia de Pi afecta estos procesos simbióticos a través de la activación de los péptidos PvRIC1 y PvRIC2, se utilizaron plantas mutantes *nark* tanto en *P. vulgaris* como en *G. max*. Estas mutantes del receptor NARK son incapaces de detectar los péptidos PvRIC1 y PvRIC2 y en consecuencia son incapaces de activar la AON, por esta razón estas mutantes *nark* exhiben fenotipos de supernodulación.

Por lo anterior, se evaluaron los procesos simbióticos; los eventos de deformación de pelos radicales inducidos por rizobios así como el número de nódulos bajo condiciones deficientes de Pi en plantas mutantes *nark* y silvestres (wild type; wt).



**Figura 6.3.1. La deficiencia de Pi no afecta los eventos simbióticos en plantas mutantes *nark*.** Número de pelos radicales deformados inducidos por rizobios en las plantas mutantes *Pvnark* (a) y *Gmnark* (c). Número de nódulos en plantas mutantes *Pvnark* (b) y *Gmnark* (d). Los datos que se muestran en (a) y (c) se obtuvieron de 20 réplicas biológicas independientes, cada una de las cuales incluía diez raíces cada una. Los datos que se muestran en (b) y (d) se generaron usando cuatro réplicas biológicas, cada una con cinco plantas independientes. Condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de bajo Pi (LP). Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Como se esperaba, las plantas silvestres de *P. vulgaris* deficientes de Pi desarrollaron 70 % menos deformaciones de pelos radicales inducidas por rizobios y 50% menos nódulos que plantas creciendo en condiciones normales de Pi (Figura 6.3.1.). En contraste, las plantas mutantes *nark* muestran el mismo número de deformaciones de pelos radicales inducidas por rizobios y nódulos en ambas condiciones de Pi (Figura 6.3.1.9). Para determinar si en condiciones deficientes de Pi la AON regula el número de pelos radicales inducidos por

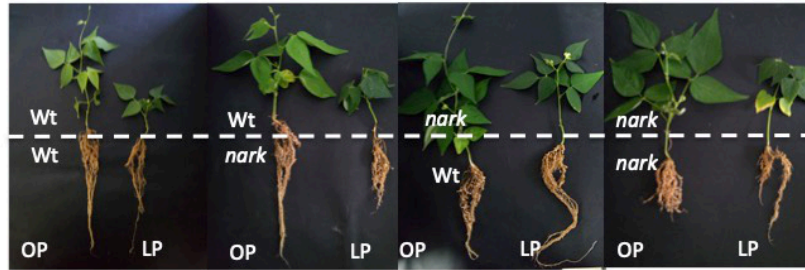
rizobios y nódulos en otras leguminosas, se realizaron los mismos análisis en plantas mutantes *nark* y silvestres de *G. max*. Al igual que *P. vulgaris*, las plantas silvestres de *G. max* desarrollaron 50% menos deformaciones de pelos radicales inducidas por rizobios y nódulos en condiciones deficientes de Pi (Figura 6.3.1.). Asimismo, el efecto inhibitorio de la deficiencia de Pi en el proceso de infección rizobial y formación de nódulos no se observó en plantas mutantes *nark* de *G. max* (Figura 6.3.1.).

En conjunto, estos datos demuestran que las plantas mutantes *nark* no disminuyen el número de eventos simbióticos en deficiencia de Pi. Lo que sugiere que la percepción de los péptidos RIC1 y RIC2 por el receptor NARK es esencial para la regulación del número de nódulos en deficiencia de Pi.

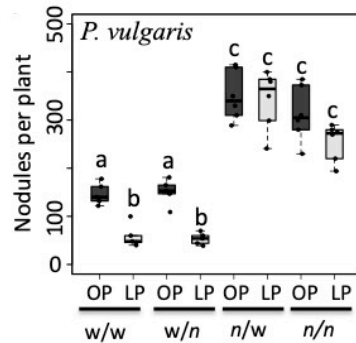
### ***6.3.2. El efecto de la deficiencia de Pi en la nódulación es dependiente del receptor NARK***

En condiciones óptimas de Pi y bajo la interacción con rizobio los péptidos RIC1 y RIC2 se transportan a través del xilema a la parte aérea de planta donde se perciben por el receptor NARK. Para poder determinar si la percepción de los péptidos RIC1 y RIC2 mediante el receptor NARK es necesaria para reducir la formación de nódulos en condiciones deficientes de Pi, se desarrolló un sistema de injertos entre plantas silvestres (wt) y mutantes *nark*. Este sistema permite la combinación de dos fondos genéticos en una sola planta con el fin de saber si un proceso está determinado por la comunicación entre el sistema radical y el sistema aéreo (vástago). Este sistema permite determinar si la deficiencia de Pi limita la formación del número de nódulos a través de esta comunicación. Para este fin, se realizaron los injertos combinando plantas wt/wt, wt/*nark*, *nark*/wt y *nark/nark* como se muestra en la figura 6.3.2. a, posteriormente las plantas se sometieron a condiciones óptimas o deficientes de Pi y se inoculan con *R. tropici* (20dpi).

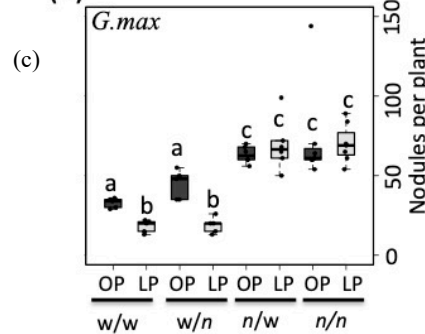
(a)



(b)



(e)



**Figura 6.3.2. El efecto negativo de la deficiencia de Pi en la nodulación de las leguminosas depende del receptor NARK.** (a) Sistema de injertos combinando plantas de tipo silvestre “w” de *P. vulgaris* (var. OAC Rico) o *G. max* (var. Bragg) y las líneas mutantes “n” *Pvnark* y *Gmnark*. Número de nódulos en injertos de *P. vulgaris* (b) y de *G. max* (c) en óptimo Pi (OP) o bajo Pi (LP). Los datos se obtuvieron a partir de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía cuatro plantas diferentes. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Después de 20 días post-inoculación, se evaluó la formación de nódulos tanto en *P. vulgaris* y de *G. max* (Figura 6.3.2. b y c). Este análisis mostró que los injertos wt/wt y wt/nark exhibieron una reducción de más del 50% en el número de nódulos en deficiencia de Pi tanto en *P. vulgaris* y de *G. max* (Figura 6.3.2. b y c). Es decir, que cuando tenemos un fondo genético silvestre en la parte aérea los péptidos RIC1 y RIC2 se perciben mostrando reducción del número de nódulos por la deficiencia de Pi. En contraste, los injertos con la parte aérea mutante *nark*, es decir *nark/wt* y *nark/nark*, no mostraron

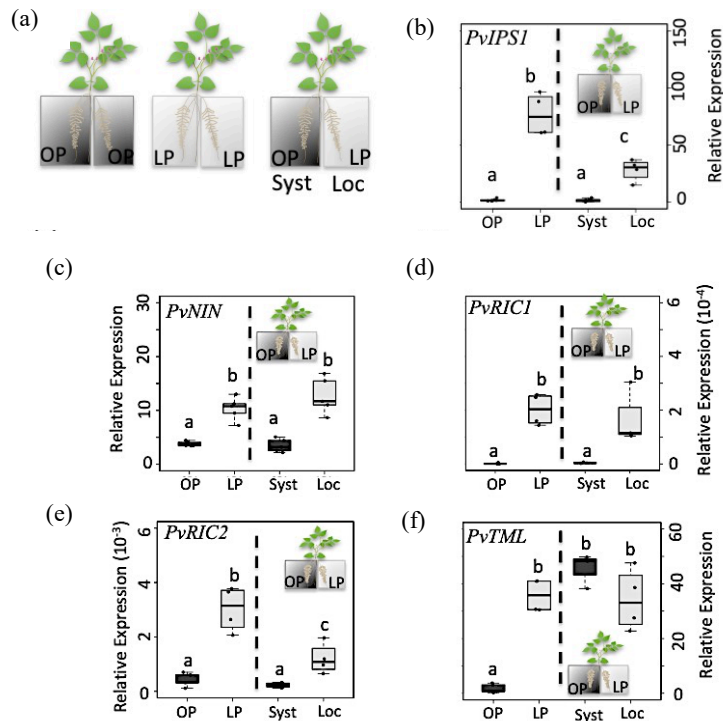
cambios en el número de nódulos en condiciones óptimas y deficientes de Pi en ambas leguminosas (Figura 6.3.2. b y c). En decir, al no detectar los péptidos RIC1 y RIC2, las mutantes *nark* desarrollan el mismo número de nódulos tanto en condiciones óptimas como deficientes de Pi. Estos datos en conjunto demuestran que la percepción de los péptidos PvRIC1 y PvRIC2 a través de NARK en la parte aérea de la planta es necesaria para regular el número de nódulos en deficiencia de Pi.

### **6.3.3. La deficiencia de Pi activa a los componentes de la AON local y sistémicamente.**

Las evidencias obtenidas hasta este punto indican que la deficiencia de Pi regula el número de nódulos a través de la activación de los péptidos *PvRIC1* y *PvRIC2* en el sistema radical y su posterior detección en la parte aérea de la planta mediante el receptor NARK. Para conocer si el efecto negativo de la deficiencia de Pi en la activación de los componentes de la AON es a través de una regulación local o sistémica, se implementó el sistema de raíz dividida. Este sistema permite aplicar dos tratamientos diferentes a través de la división del sistema radical de una misma planta, lo que permite reconocer respuestas locales o sistémicas en respuesta al tratamiento. Este sistema se implementó con el objetivo de evaluar si el incremento en la expresión de los genes relacionados con la AON se activan de forma local o sistémica en deficiencia de Pi. Para este ensayo se analizó simultáneamente tres condiciones de tratamiento que se muestran en la figura 6.3.3, los cuales consisten en tratamientos control, es decir, ambos sistemas radicales divididos ya sea en condiciones óptimas (OP) o deficientes de Pi (LP). El tercer tratamiento se aplicó a un sistema radical dividido a condiciones óptimas de Pi (Syst; Sistémico) y el otro sistema radical dividido a deficiencia de Pi (Loc; Local).

Posterior a los tratamientos, se evaluaron los niveles de expresión de genes, inicialmente se evaluó la expresión de *PvIPS1* (*Induced by Phosphate Starvation1*), gen de respuesta ante la deficiencia de Pi, lo que lo convierte en un gen marcador para este sistema.





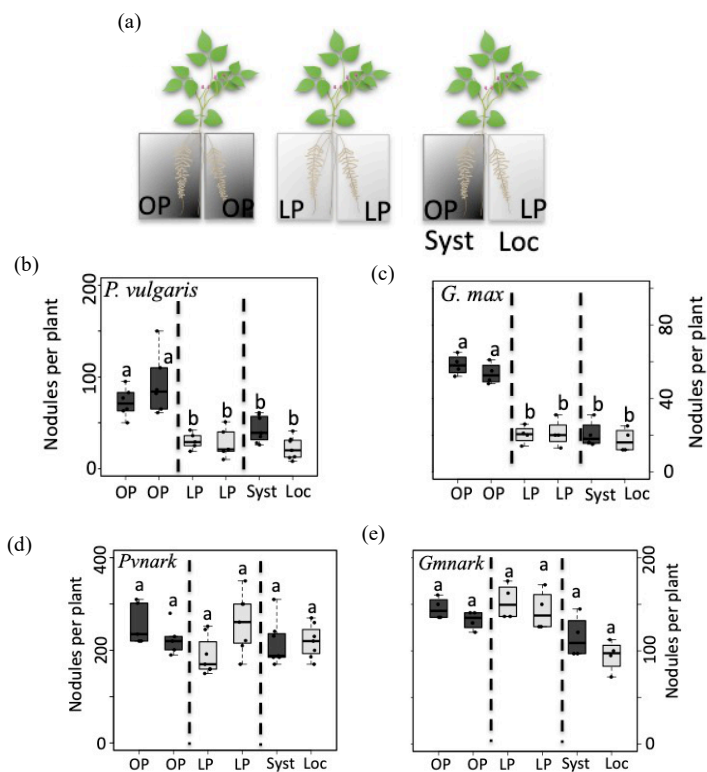
**Figura 6.3.3. La deficiencia de Pi activa a los componentes de la AON local y sistémicamente.** (a) Representación esquemática de plantas de *P. vulgaris* en sistema de raíces divididas. Se establecieron tres condiciones experimentales: (i) Ambos lados de las raíces divididas se regaron con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 1 mM de Pi (OP); (ii) ambos lados del sistema de raíz dividida se regaron con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 5  $\mu$ M de Pi (LP); y (iii) un lado de la raíz dividida se regó con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 5  $\mu$ M de Pi (LP) y se designó como un compartimento 'local' (Loc), mientras que el otro lado del sistema radical se regó con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 1 mM de Pi (OP) y se designó como un compartimento 'sistémico' (Syst). Niveles de expresión de *PvIPSI* (b), *PvNIN* (c), *PvRIC1* (d), *PvRIC2* (e) y *PvTML* (f). Para evaluar la expresión de estos genes en plantas con ambos lados de la raíz creciendo en condiciones OP o LP se combinaron ambos lados de las raíces, mientras que para las plantas del sistema de raíces dividido en condiciones OP y LP se colectaron por separado. Los datos se obtuvieron a partir de cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía cuatro plantas diferentes de raíz dividida. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

En la figura 6.3.3. podemos observar el nivel de expresión de *PvIPSI* el cual se indujo en condiciones de bajo Pi (LP) así como en el sistema de raíz dividida deficiente de Pi (Loc). La expresión de *PvIPSI* confirmó que el sistema de raíz dividida en deficiencia de Pi funciona. Posteriormente, se evaluó la expresión de los componentes de la AON; *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2* y *PvTML* en raíces bajo estas tres condiciones de tratamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.3.3. e indican que la expresión de *PvNIN*, *PvRIC1* y *PvRIC2* aumentó en raíces de Pi bajo Pi (LP) y así como en el sistema de raíz dividida de bajo Pi (Loc). Por su parte, los niveles de expresión de *PvTML* (Figura 6.3.3.) exhiben un aumento tanto en raíces de bajo Pi (LP), así como en el sistema de raíz dividida en condiciones óptimas de Pi (Syst) y bajo Pi (Loc). Estos datos indican que la expresión de *PvNIN*, *PvRIC1* y *PvRIC2* se activan de manera local, mientras que *PvTML* se activa tanto de forma local como sistémica por la deficiencia de Pi.

En conjunto, estos datos demuestran que la deficiencia de Pi activa la expresión de los componentes de la AON de manera local, lo que posteriormente desencadena la comunicación raíz-vástago a través de los péptidos *PvRIC1* y *PvRIC2* activando la AON lo que finalmente conlleva a la comunicación vástago-raíz para activar a *TML*.

#### **6.3.4. La deficiencia de Pi reduce sistémicamente el número de nódulos**

Para determinar si la deficiencia de Pi regula sistémicamente la formación de nódulos, se realizó un ensayo de nodulación utilizando el mismo sistema de raíz dividida (Figura 6.3.4. a) En este caso las raíces se inoculan con *R. tropici* y posterior a los 20 días post-inoculación se evaluó el número de nódulos. Los resultados obtenidos muestran un número similar de nódulos en los sistemas de raíz dividida tratados en ambos lados con la misma concentración de Pi (OP y LP). Las plantas en deficiencia de Pi experimentaron una disminución del 50% de número de nódulo tanto en *P. vulgaris* (Figura 6.3.4. b) como en *G. max* (Figura 6.3.4. c). En contraste, las raíces del sistema dividido en condiciones de óptimo Pi (Syst) y el otro en condiciones de bajo Pi (Loc) desarrollaron significativamente menos nódulos, similar al tratamiento de bajo Pi (LP), en ambas leguminosas (Figura 6.3.4. b y c).

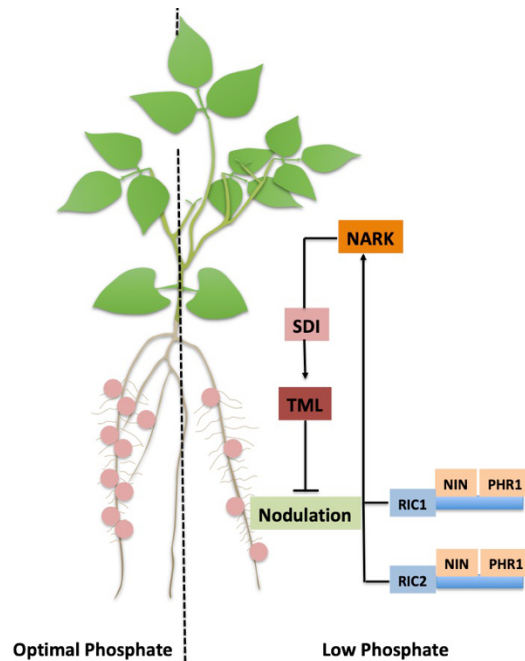


**Figura 6.3.4. La deficiencia de Pi reduce sistémicamente el número de nódulos.** (a) Representación esquemática de plantas de *P. vulgaris* o *G. max* con sistema de raíces divididas. Se establecieron tres condiciones experimentales: (i) Ambos lados de las raíces divididas se regaron con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 1 mM de Pi (óptimo Pi: OP); (ii) ambos lados del sistema de raíz dividida se regaron con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 5  $\mu$ M de Pi (bajo Pi: LP); y (iii) un lado de la raíz dividida se regó con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 5  $\mu$ M de Pi (bajo Pi: LP) y se designó como un compartimento 'local' (Loc), mientras que el otro lado del sistema radical se regó con solución nutritiva de Summerfield suplementada con 1 mM de Pi(óptimo Pi: OP) y se designó como un compartimento 'sistémico' (Syst). Número de nódulos en plantas silvestres (wt) de *P. vulgaris* (b) y *G. max* (c) con raíces separadas creciendo en condiciones OP o LP. Número de nódulos en plantas mutantes *nark* de *Pvnark* (d) y *Gmnark* (e) con raíces separadas creciendo en condiciones OP o LP. Los datos se obtuvieron a partir de cuatro réplicas biológicas, cada una de las cuales contenía cuatro plantas diferentes de raíz dividida. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba Tukey HSD (valor de  $p < 0.01$ ). Las clases estadísticas que comparten la misma letra no muestran diferencias significativas.

Para confirmar si esta reducción es dependiente del receptor NARK y a través de la comunicación vástago-raíz-vástago se evaluó el número de nódulos en plantas mutantes *nark*. Los resultados muestran que las mutantes *Pvnark* (Figura 6.3.4. d) y *Gmnark* (Figura 6.3.4. e) desarrollan el mismo número de nódulos en el sistema de óptimo Pi (OP), bajo Pi (LP) y el sistema dividido por un lado en óptimo Pi (Syst) y el otro en bajo Pi (Loc). Estos resultados indican que la comunicación entre la raíz-vástago-raíz así como la percepción de los péptidos RIC1 y RIC2 por el receptor receptor NARK se requiere para activar la AON en deficiencia de Pi.

### ***6.3.5. Modelo: La inhibición de la nodulación de leguminosas por deficiencia de Pi depende de la vía de Autorregulación de la Nodulación.***

Cuando la leguminosa detecta bajos niveles de Pi, el factor de transcripción PHR1 activa de manera conjunta con NIN la transcripción de *PvRIC1* y *PvRIC2*. Posteriormente, los se transportan desde la raíz hasta el vástago, donde el receptor de NARK los detecta. Tras la percepción de *PvRIC1* y *PvRIC2*, se producen señales inhibitorias (SDI). La (s) SDI se transporta(n) a la raíz, donde se activa *PvTML*, lo que conduce a la inhibición de un mayor desarrollo de nódulos. Por su parte la transcripción de *PvTML* también puede regularse de manera local a través de PHR1. La activación de la AON en deficiencia de Pi limita el desarrollo óptimo de nódulos, provocando una baja tasa de nodulación y una baja eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno.



**Figura 6.3.5. Modelo propuesto “La vía AON en condiciones deficientes de Pi”.** Modelo que explica los mecanismos genéticos que controlan el número de nódulos en deficiencia de P. Tras la detección de bajos niveles de Pi, el factor de transcripción PHR1 regula de forma directa o indirecta la transcripción de NIN. Una vez que se activa NIN, es posible que se requiera una interacción potencial entre el NIN y PHR1 para activar la expresión de *PvRIC1* y *PvRIC2*. Estos dos péptidos relacionados con AON se transportan desde la raíz hasta el vástago, donde el receptor de NARK los detecta. Tras la percepción de RIC1 y RIC2 se produce una señal SDI. SDI se transportan a la raíz, donde se activa TML, lo que conduce a la inhibición de un mayor desarrollo de nódulos. Alternativamente, la deficiencia de Pi, a través de PHR1, podría activar directamente la expresión de TML y contribuir a la reducción del número de nódulos en esta condición nutricional.

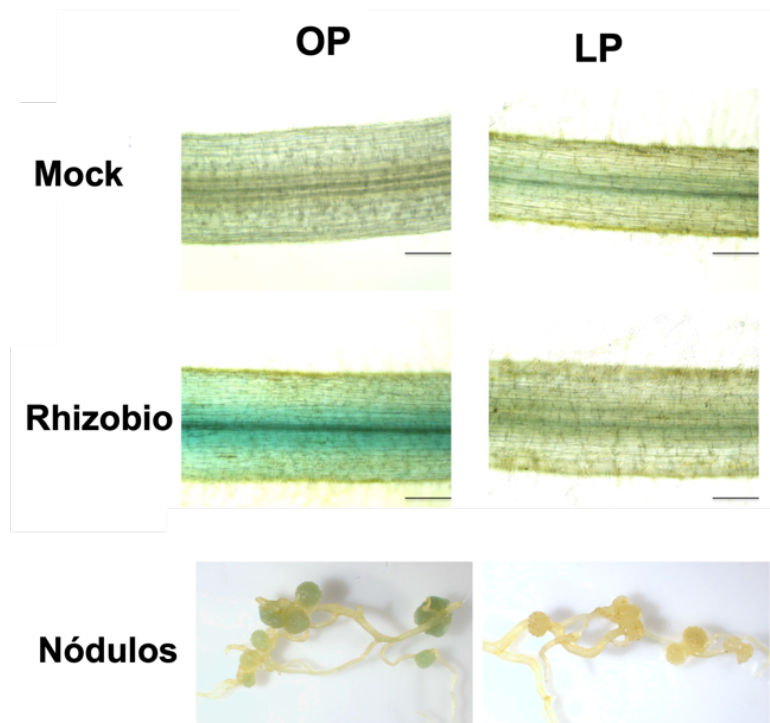
Los datos presentados en esta sección se publicaron en la revista *The Plant Journal* en el año 2020 donde fungí como primera autora; **Isidra-Arellano MC, Pozas-Rodríguez EA, Del Rocío Reyero-Saavedra M, ... Valdés-López O. (2020) Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway. *Plant J.* 103(3), 1125-1139. (Anexo)**

## 6.4.PHR1 y NIN reguladores de la simbiosis leguminosa-rizobio en deficiencia de Pi

### 6.4.1. *PHR1* muestra patrones de expresión asociados a la simbiosis

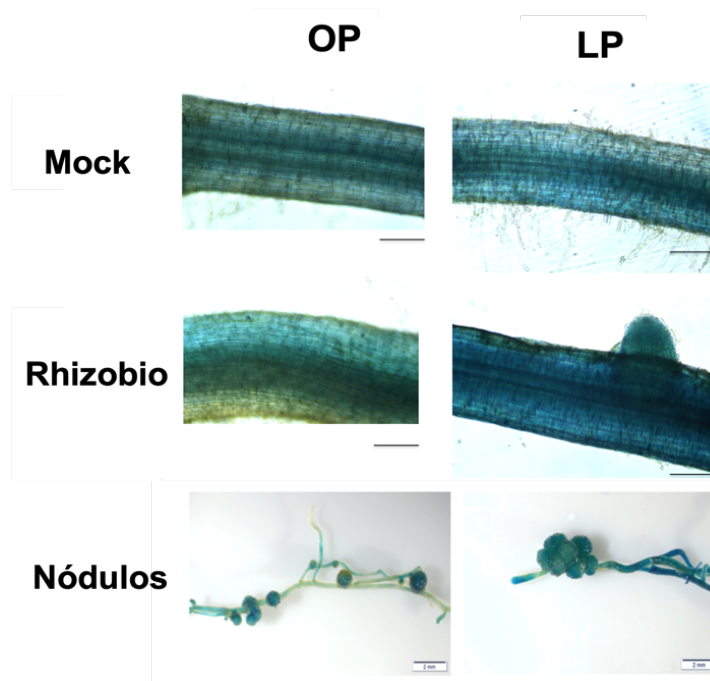
Los datos indican que PHR1 juega un papel importante en la regulación de la AON a través de la activación de *PvRIC1* y *PvRIC2* en deficiencia de Pi. Sin embargo, se desconoce en dónde y en qué momento se activa *PvPHR1* en la interacción con rizobios en deficiencia de Pi. Para este fin, se realizó una fusión transcripcional del promotor de *PvPHR1* con el gen reportero *GUS*. Al analizar la región del promotor de *PvPHR1*, se observó que la región 5'UTR está dividida por una región intrónica que posteriormente, en la maduración del transcrito, es procesada. Sin embargo, para indagar acerca de todas las posibles respuestas de *PvPHR1* en esta simbiosis, se clonó esta primera región de -1 al -1878 río arriba del codón de inicio incluyendo la región intrónica de 1595pb, para generar la construcción *pPvPHR1 (Intrón)::eGFP::GUS*. Adicionalmente, también se clonó una región más alejada del codón de inicio la cual contiene elementos regulatorios *cis* P1BS. Esta región constá del -4362 al -6084 pb río arriba del codón de inicio *pPvPHR1(P1BS)::eGFP::GUS*. Se desarrollaron raíces con las fusiones transcripcionales en *P. vulgaris* utilizando el sistema de transformación mediada por *A.rhizogenes*.

La actividad transcripcional de *pPvPHR1(Intrón)::eGFP::GUS* mostró una ligera actividad en raíces inoculadas con rizobio y en nódulos en condiciones óptimas de Pi en raíces de *P. vulgaris* (Figura 6.4.1a.). En contraste, la señal transcripcional de *pPvPHR1(Intrón)::eGFP::GUS* se pierde en raíces de *P. vulgaris* en condiciones deficientes de Pi. La actividad observada puede estar asociada a los altos requerimientos de energía que se requiere para la señalización y procesos de colonización. Sin embargo se requiere más investigación para demostrar la importancia y actividad de esta región del promotor de *PvPHR1*.



**Figura 6.4.1a. PHR1 muestra patrones de expresión asociados a la simbiosis.** Raíces y nódulos *pPvPHR1(Intrón)::GUS::GFP* de *P. vulgaris* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) en presencia y ausencia de rhizobio. Las raíces inoculadas con rhizobio muestran una señal debil en el periciclo así en nódulos 20 dpi. Las barras de escala que se muestran en las imágenes de raíces de cada panel representan 200 $\mu$ m, mientras que las que se muestran en las imágenes de nódulos representan 2mm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

Por otro lado, la actividad transcripcional observada para la segunda construcción *pPvPHR1(PIBS)::GUS::GFP* (-4362 al -6084 pb) también fue de gran interés. Como ya se había reportado en *A. thaliana* la actividad transcripcional de *PHR1* se asocia a la deficiencia de Pi de manera significativa (Nilsson *et al.*, 2010). Este análisis reveló que la actividad de *pPvPHR1(PIBS)::GUS::GFP* (Figura 6.4.1b) se observa señal tanto en raíces control e inoculadas con rizobio, así como en nódulos en condiciones óptimas de Pi. Sin embargo, la actividad de *pPvPHR1(PIBS)::GUS::GFP* sometidas a deficiencia de Pi se incrementa significativamente en raíces control e inoculadas con rizobio, así como en nódulos.



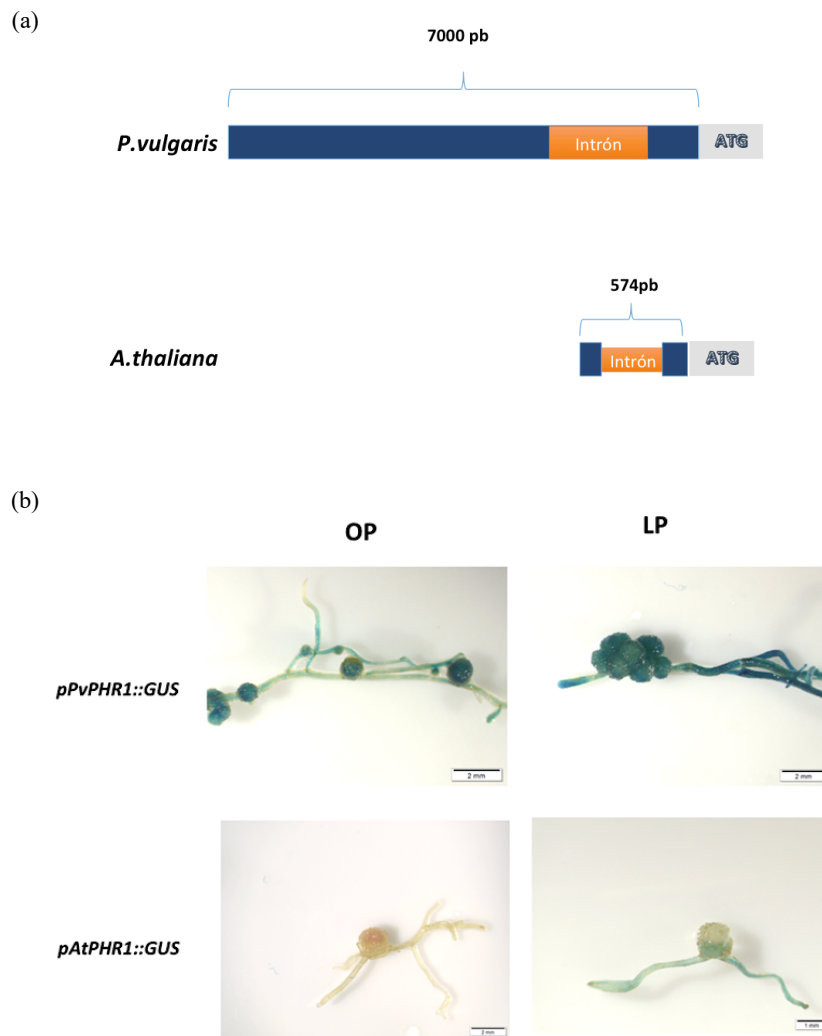
**Figura 6.4.1b.** La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de *PvPHR1* en raíces y nódulos de *P. vulgaris*. Raíces y nódulos transgénicos *pPvPHR1(P1BS)::GUS::GFP* en *P. vulgaris* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) en presencia y ausencia de rizobio. Las barras de escala que se muestran en las imágenes de raíces de cada panel representan 200µm, mientras que las que se muestran en las imágenes de nódulos representan 2mm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

En conjunto, estos datos indican que la actividad transcripcional de *PvPHR1* se regula por la deficiencia de Pi así como por la interacción con rizobios. Nuestros datos demuestran que la región mas cercana al codón de inicio *pPvPHR1 (Intron)::eGFP::GUS* responde de manera predominante a la interacción con rizobios mientras que *pPvPHR1(P1BS)::GUS::GFP* muestra una actividad asociada a la deficiencia de Pi.



#### **6.4.2. Evolución de la región promotora de PvPHR1**

La proteína PHR1 y su vía de señalización se encuentran conservadas en todas las especies de plantas terrestres (Rubio *et al.*, 2001). La proteína PvPHR1 mantiene 76.1% de homología con la proteína reportada en *A. thaliana* (AT2G01060.1). La función principal reportada de PHR1 en *A. thaliana* ha sido la regulación de las respuestas a la adaptación de la deficiencia de Pi. Sin embargo nuestros resultados demuestran que PHR1 juega un papel en la simbiosis leguminosa-rizobio. *A. thaliana* no es capaz de establecer simbiosis con rizobios, lo que sugiere diferencias de PHR1 de *A. thaliana* y de *P. vulgaris*. Para conocer más acerca de la función y evolución de este gen en plantas leguminosas, se hizo una comparación del promotor de *PHR1* de *A. thaliana* con el de *P. vulgaris*. En la figura 6.4.2 se muestra el tamaño del promotor de *AtPHR1* el cual es evidentemente más pequeño que el de *P. vulgaris*. El tamaño del promotor de *AtPHR1* es de 574 pb, el cual incluye la región 5'UTR y la región del promotor. En contraste, el promotor de *P. vulgaris* es de aproximadamente de 7kb que incluye también la región 5'UTR y la región del promotor. Ésto sugiere que en leguminosa se adquirieron elementos regulatorios *cis* los cuales podrían regular la participación de este factor de transcripción durante la simbiosis con rizobios. Estudios filogenéticos revelan que el gen *PHR1* sufrió numerosas duplicaciones en plantas leguminosas (Valdés-López *et al.*, 2008). Para comprobar la importancia de los elementos *cis* del promotor de *PHR1* de leguminosas se realizó una fusión transcripcional del promotor de *AtPHR1* con GUS y se observó su actividad en nódulos de *P. vulgaris* en condiciones óptimas y deficientes de Pi (Tabla Suplementaria S1). Los resultados muestran que la actividad del promotor de *pPvPHR1(PIBS)::GUS::GFP* en *P. vulgaris* presenta señal basal en raíces y nódulos en condiciones óptimas de Pi. Mostrando en deficiencia de Pi, un incremento en la señal en ambos (Figura 6.4.2.b). En contraste, la construcción *pAtPHR1::GUS::GFP* expresada en raíces y nódulos de *P. vulgaris* no muestra actividad en condiciones óptimas de Pi. Al analizar la actividad transcripcional de *pAtPHR1::GUS::GFP* en nódulos de 20 dpi, observamos señal exclusiva en raíces noduladas pero no en los nódulos (Figura 6.4.2. b).

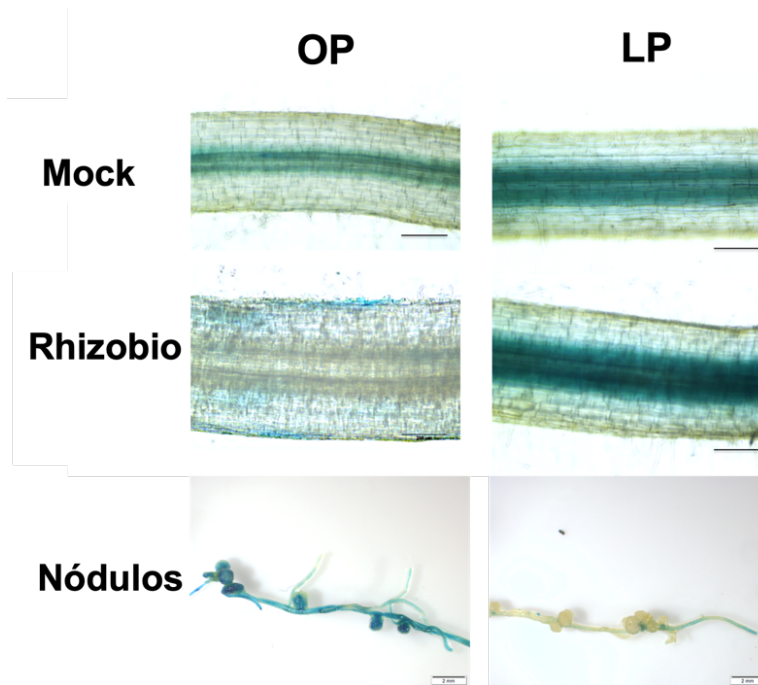


**Figura 6.4.2 La actividad transcripcional del promotor de *AtPHR1* en *P. vulgaris* ausente en nódulos.** (a) Análisis del promotor de *PHR1* de *A. thaliana* y *P. vulgaris*, se muestra la comparación de tamaño y conformación de ambos promotores. (b) Raíces y nódulos de *pPvPHR1(P1BS)::GUS::GFP* y *pAtPHR1::GUS::GFP* en *P. vulgaris* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) inoculadas con rhizobio 20 dpi. Las barras de escala de las imágenes de nódulos representan 2mm y 1 mm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

Estos datos en conjunto demuestran la importancia de los elementos regulatorios *cis* contenidos en el promotor nativo de *PvPHRI* los cuales son esenciales para su activación en respuesta a la interacción con rizobios. Demostrando también que estos elementos *cis*, son indispensables para su expresión en nódulos presentes en leguminosas.

#### **6.4.3. La deficiencia de Pi genera cambios en los patrones de expresión de *PvNIN***

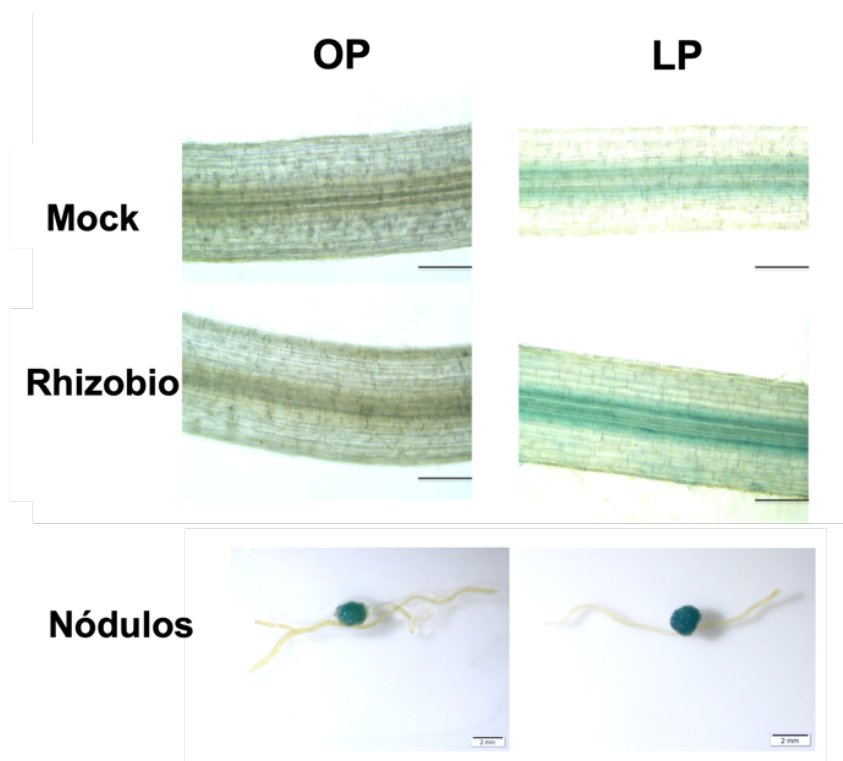
Los datos transcripcionales obtenidos en este estudio indican que la expresión de *PvNIN* también se regula acorde a los niveles internos de Pi en plántulas de *P. vulgaris* (Isidra-Arellano *et al.*, 2020). Sin embargo, estos datos no proporcionan información relacionada a los tejidos celulares donde se expresa *PvNIN* bajo deficiencia de Pi. Contar con esta información permitirá conocer más acerca del papel que juega NIN en modular la simbiosis en condiciones de deficiencia de Pi. Para abordar este punto, se evaluaron los elementos regulatorios *cis* contenidos en el promotor de *PvNIN*. En este análisis, además de la identificación del elemento regulatorio *cis* P1BS (Figura 6.2.8. b), también se identificó la presencia del elemento *cis* CYC box en el promotor de *PvNIN*. El elemento CYC box es un elemento que es reconocido por el factor de transcripción CYCLOPS, el cual activa la transcripción de *NIN* en respuesta a NFs (Singh *et al.*, 2014). Para conocer la importancia de este elemento en condiciones de deficiencia de Pi, se realizaron dos fusiones transcripcionales con el gen reportero GUS. La primera *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS*, la cual comprendió del -1 al -1583 pb río arriba del codón de inicio. Esta construcción contiene el sitio de unión a CYCLOPS, el cual es determinante para su transcripción durante la simbiosis. La segunda construcción fue *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS* incluye la región promotora -5838 al -6636 pb río arriba del codón de inicio la cual contenía un sitio P1BS. Se desarrollaron raíces con las fusiones transcripcionales en *P. vulgaris* utilizando el sistema de transformación mediada por *A. rhizogenes*.



**Figura 6.4.3a. La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de *PvNIN* en raíces y nódulos de *P. vulgaris*.** Raíces y nódulos transgénicos *pPvNIN(CYCLOPS)::GUS::GFP* en *P. vulgaris* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) en presencia y ausencia de rizobio. Las barras de escala que se muestran en las imágenes de raíces de cada panel representan 200 $\mu$ m, mientras que las imágenes que muestran los nódulos representan 2mm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

El análisis de la actividad transcripcional de la región promotora *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS* indicó que en condiciones óptimas de Pi y en respuesta a rizobios *PvNIN* se expresa de forma significativa en la epidermis y en pelos radicales (Figura 6.4.3a.). Asimismo, también mostró actividad en nódulos maduros en condiciones óptimas de Pi (Figura 6.4.3a.). En contraste, en deficiencia de Pi la actividad de *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS* se observó únicamente en células del periciclo y córtex interno. Sin embargo, no se observó en nódulos maduros en deficiencia de Pi (Figura 6.4.3a.).

Posteriormente, se evaluó la actividad transcripcional de la región promotora de *NIN* que contiene los elementos *cis* P1BS. La región promotora *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS* abarca la región del -5838 al -6636 pb río arriba del codón de inicio.



**Figura 6.4.3b. La deficiencia de Pi modula la actividad transcripcional de *PvNIN* en raíces y nódulos de *P. vulgaris*.** Actividad del promotor de *pPvNIN(P1BS)::GUS::GFP* expresadas en raíces y nódulos de *P. vulgaris* las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) en presencia y ausencia de rhizobio. Las raíces en deficiencia de Pi muestran una fuerte señal en el córtex interno y periciclo de la raíz. Asimismo, en nódulos se muestra la actividad transcripcional en ambas condiciones de Pi, donde se observa señal exclusivamente en nódulos. Las barras de escala que se muestran en las imágenes de raíces de cada panel representan 200 $\mu$ m, mientras que las que se muestran en las imágenes de nódulos representan 2mm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

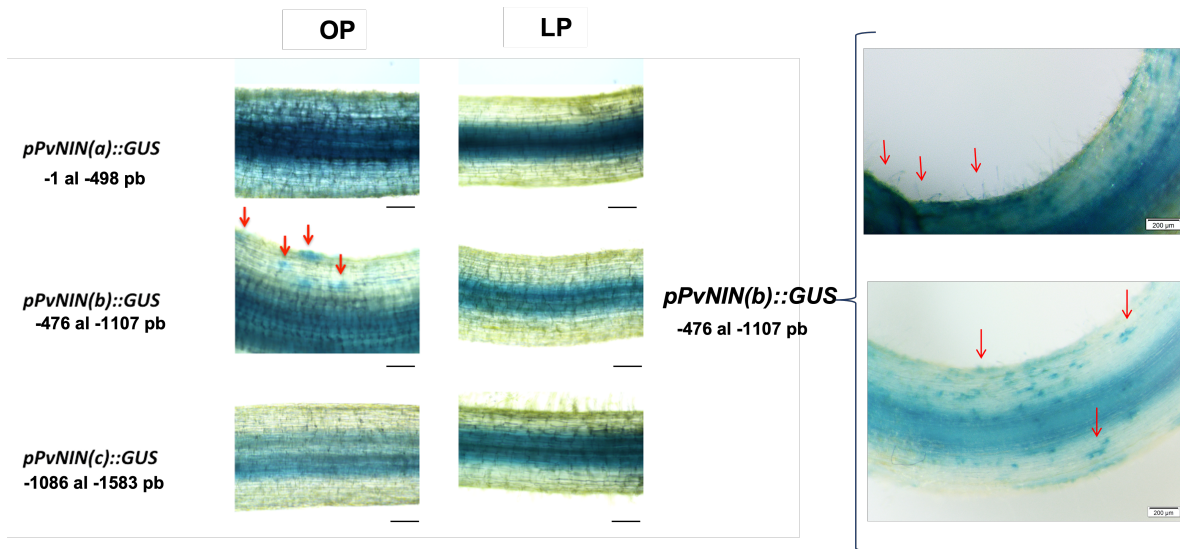
El análisis reveló que *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS* no muestra actividad en raíces control ni en las inoculadas con rizobio en condiciones óptimas de Pi (Figura 6.4.3b.) Sin embargo, en deficiencia de Pi la actividad de *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS* se observó en células del periciclo, rodeando al haz vascular. El análisis de los nódulos reveló que la actividad de *pPvNIN(P1BS)::eGFP::GUS* muestra señal en nódulos en ambas condiciones de Pi (Figura 6.4.3b.).

Estos datos en conjunto revelan que la deficiencia de Pi afecta los patrones de expresión tisular de *PvNIN* asociados a la simbiosis leguminosa-rizobio. Mostrando que la región promotora de *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS* se expresa en pelos radicales y epidermis ante la interacción con rizobios y condiciones óptimas de Pi. En deficiencia de Pi la actividad se presenta únicamente en el periciclo y córtex interno. Además estos datos también indican que la región del promotor de *PvNIN* más alejada del codón de inicio muestra una respuesta ante la deficiencia de Pi, lo que muy probablemente se deba a la presencia de los sitios P1BS. Asimismo, la actividad de esta región está más asociada a nódulos, lo que probablemente se deba a la presencia de elementos regulatorios *cis* de respuesta a hormonas o a factores de transcripción relacionados con el desarrollo de nódulos.

#### **6.4.4. Región del promotor de *PvNIN* activada durante los eventos tempranos**

Los resultados de la actividad transcripcional de la región *pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS*, la cual contiene el elemento *cis* CYC Box, indica que esta región es importante para los eventos tempranos que ocurren en la epidermis y pelos radicales. Además, se demostró que la deficiencia de Pi afecta la deformación de pelos radicales en respuesta a rizobio (Isidra-Arellano et al., 2018). Estas observaciones sugieren que esta región promotora de *PvNIN* puede controlar la expresión de este factor de transcripción en respuesta a la deficiencia de Pi. Para conocer la región mínima del promotor que se afecta por la deficiencia de Pi, se fragmentó la región promotora comprendida del -1 al -1583 pb río arriba del codón (*pPvNIN(Cyclops)::eGFP::GUS*) de inicio en tres fragmentos. La primera región del -1 al -498 *pPvNIN(a)::eGFP::GUS*, la segunda del -476 al -1107 *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* y la

tercera del -1583 al -1086 *pPvNIN(c)::eGFP::GUS*. De forma individual, estas construcciones fueron expresadas en raíces de *P. vulgaris* mediante *A. rhizogenes*.



**Figura 6.4.4. Región del promotor de *PvNIN* activada durante los eventos tempranos y afectada por la deficiencia de Pi** (a) Actividad del promotor de *pPvNIN(a)::eGFP::GUS*, *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* y *pPvNIN(c)::eGFP::GUS* en raíces de *P. vulgaris*. Las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) e inoculadas con rhizobio (6dpi). (b) Acercamiento que muestra la actividad del promotor de *pPvNIN(b)::eGFP::GUS*. Las flechas rojas representan puntos de señal de la actividad de *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* relacionados en la simbiosis leguminosa-rhizobio; como pelos radicales y epidermis de la raíz. Las barras de escala que se muestran las imágenes de raíces de cada panel representan 200 μm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

Este análisis de expresión espacio-temporal indicó que la región *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* es la que responde de una manera significativa a la interacción con rizobios (Figura 6.4.4.). Observamos su actividad transcripcional en pelos radicales, en la epidermis y en córtex en condiciones óptimas de Pi. En contraste, en deficiencia de Pi esta actividad se ve alterada, mostrando señal únicamente en el córtex interno y periciclo (Figura 6.4.4.b).

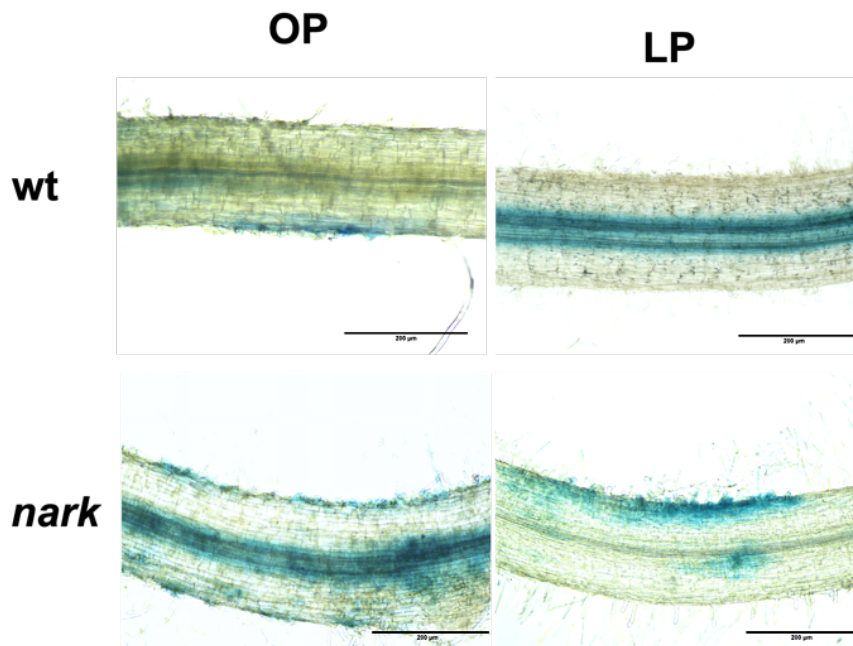
En conjunto, estos datos indican que la región *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* es la unidad simbiótica mas importante para los eventos tempranos. Esta región del promotor contiene elementos que generan una regulación negativa en deficiencia de Pi.

#### **6.4.5. La actividad de *PvNIN* se restablece en mutantes *nark***

Estudios previos demuestran que la AON regula negativamente la expresión de *NIN* a nivel transcripción (Soyano *et al.*, 2014). Mutantes *har1* (órtologo de NARK) en *L. japonicus* muestran una mayor actividad transcripcional del promotor de *NIN* (*ProNIN::GUS*) respecto a la actividad mostrada en plantas silvestres (Soyano *et al.*, 2014). Estas evidencias sugieren que la vía la AON inicia y finaliza con la regulación de *NIN*, debido a que inicialmente activa la transcripción de *RIC1* y *RIC2*. Posterior a la detección y a la comunicación raíz-vástago-raíz su actividad de este factor de transcripción es finamente regulada a través de este circuito. Para confirmar que la deficiencia de Pi afecta la expresión de *NIN* a través de la AON, se evaluó la actividad del promotor de *NIN*, particularmente la región *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* en plantas de *P. vulgaris* mutantes *nark*.

El análisis de expresión espacio-temporal de la región promotora *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* indicó que en condiciones óptimas de Pi la actividad transcripcional del promotor de *PvNIN* en las mutantes *nark* es más intensa respecto a la actividad observada en plantas silvestres (Figura 6.4.5.). Estos datos confirman que la AON ejerce una regulación transcripcional sobre *PvNIN* y de manera dependiente del receptor NARK. Por otro lado, la actividad transcripcional de *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* en plantas *nark* en deficiencia de Pi mostró una expresión tanto en pelos radicales como en epidermis (Figura 6.4.5.). Contrario a lo observado en plantas silvestres las cuales mostraron señal en células del periciclo (Figura 6.4.5.).





**Figura 6.4.5. La actividad transcripcional de *PvNIN* es dependiente del receptor NARK.** Raíces transgénicas de *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* en *P. vulgaris* silvestre (wt) y mutantes *Pvnark*. Las cuales se trataron en condiciones óptimas de Pi (OP) y condiciones de deficiencia de Pi (LP) en presencia y ausencia de rizobio. La actividad de *pPvNIN(b)::eGFP::GUS* en plantas mutantes *Pvnark* sin importar el tratamiento de Pi se observa en varios puntos de la raíz; pelos radicales, epidermis y córtex. Las barras de escala que se muestran las imágenes de raíces de cada panel representan 200μm. Las imágenes que se muestran son representativas de cinco réplicas biológicas, cada una de las cuales contiene diez raíces transgénicas.

En conjunto, estos datos demuestran que la regulación negativa de genes clave como *PvNIN* para el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobia por la deficiencia de Pi es dependiente del receptor NARK y por lo tanto de la AON.

## 7. Discusión

El Pi es el segundo macronutriente más importante después del N, siendo un factor determinante para el crecimiento de las plantas (Lynch *et al.*, 1995). Los niveles intracelulares del Pi modulan la morfología, fisiología y metabolismo de las plantas (Zhang *et al.*, 2014). En plantas leguminosas, como *P. vulgaris* y *G. max*, la deficiencia de Pi genera una reducción drástica en el número de nódulos, y en consecuencia una baja eficiencia de fijación de nitrógeno (Hernández *et al.*, 2009). El presente estudio se generó diversas evidencias experimentales que indican que la deficiencia de Pi afecta las etapas iniciales de la simbiosis, ocasionando defectos en la expresión de genes simbióticos así como en la adhesión y colonización por parte del rizobio (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). Asimismo, se demostró que la deficiencia de Pi afecta la acumulación de transcritos relacionados con genes esenciales para la biosíntesis y homeostasis de hormonas como auxinas y citocininas, lo que podría desencadenar un desequilibrio hormonal (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). Estudios previos demuestran que la deficiencia de Pi genera cambios en la producción, la sensibilidad y el transporte de hormonas (López-Bucio *et al.*, 2002). En el caso de las auxinas, se ha demostrado que son esenciales para modular cambios en el desarrollo de la raíz en condiciones deficientes de Pi (Casimiro *et al.*, 2001). El Pi modifica las concentraciones locales de auxina a través de cambios en el transporte de esta fitohormona (López-Bucio *et al.*, 2002). En el presente trabajo se demuestra que la deficiencia de Pi genera disminución en la acumulación de transcritos relacionados con la biosíntesis de auxinas. En contraste, aumentan los transcritos relacionados con la homeostasis de auxinas en deficiencia de Pi. Estos resultados sugieren que el transporte y la acumulación local de auxinas aumenta debido a la deficiencia de Pi para promover el desarrollo de raíces laterales (Ng *et al.*, 2015). En el caso de las citocininas, está ampliamente demostrado que son fundamentales para la organogénesis del nódulo (Heckmann *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestro análisis transcripcional indicó que la acumulación de transcritos relacionados a genes de biosíntesis y homeostasis de citocininas disminuyen en raíces de plántulas de *P. vulgaris* deficientes de Pi. Diversos estudios indican que las citocininas son reguladores negativos de los genes PSR, los cuales son esenciales para que las plantas se adapten a la deficiencia de Pi (Martín *et al.*, 2000). Estas observaciones indican que la concentración de citocininas se regula finamente para que las

plantas puedan hacer frente a la deficiencia de Pi. Por lo que la disminución en la expresión de genes asociados a la biosíntesis y percepción de esta fitohormona podría ser mediada por el sistema PSI. Se ha demostrado que tanto la auxina como la citocinina regulan positivamente la expresión de genes que conforman la vía de señalización simbiótica inicial entre leguminosas y rizobios, así como la progresión de los eventos de señalización simbiótica desde la epidermis hasta el córtex en la simbiosis leguminosa-rizobio (Hirsch *et al.*, 1989; van Zeijl *et al.*, 2015). Se demostró que la acumulación de auxina en los pelos radicales al reconocer los rizobios es esencial para la formación del hilo de infección (Nadzieja *et al.*, 2018). Asimismo, se conoce que la percepción correcta de las citocininas es crucial para el transporte polar de auxina y la posterior acumulación de auxina en los pelos radicales infectados con rizobios (Ng *et al.*, 2015). Basado en el hecho de que las auxinas y la citocininas son reguladores cruciales de las etapas tempranas y tardías (p. ej., desarrollo de nódulos) de la simbiosis leguminosa-rizobio, la disminución de la biosíntesis y homeostasis de estas hormonas afecta de manera negativa este proceso (Liu *et al.*, 2018). El hecho de que la deficiencia de Pi afecte la expresión de genes relacionados con auxinas y citocininas en respuesta a rizobios, nos lleva a proponer que los defectos en eventos moleculares tempranos (p. ej., expresión de *PvNSP2*, *PvNIN* y *PvFLOT2*) y fisiológicos (p. ej., deformación del cabello radical) observado en plántulas de *P. vulgaris* deficientes en Pi podría explicarse parcialmente por defectos en el equilibrio auxinas-citocininas.

El análisis transcriptómico del presente trabajo también reveló que la deficiencia de Pi provoca un aumento en la expresión de genes relacionados con etileno, el jasmonato y el ácido absícico. El etileno, el jasmonato y el ABA son esenciales para activar una serie de respuestas moleculares y fisiológicas que permiten a las plantas hacer frente a la deficiencia de Pi (Rouached *et al.*, 2010). Por su parte, el etileno juega un papel crucial en la remodelación del sistema radical bajo condiciones deficientes de Pi (López-Bucio *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011). La acumulación de esta hormona aumenta/estimula cambios en el desarrollo de la raíz, las cuales están orientadas hacia la optimización de la captación de Pi. Otra de las funciones asociadas al etileno es el desarrollo de raíces laterales (López-Bucio *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas evidencias en distintas leguminosas indican que un aumento en la concentración de etileno inhibe el desarrollo y formación de nódulos (López-Bucio *et al.*, 2002; Chiou *et al.*, 2011).

En el caso del jasmonato y el ácido abscísico no se ha demostrado una relación directa con el sistema PSR. Sin embargo, algunas evidencias indican que muchos fenotipos observados en plantas deficientes de Pi se deben al aumento en la concentración de estas hormonas (Liu *et al.*, 2018). En el caso del jasmonato podría desempeñar un papel importante en desencadenar cambios redox para agotar el meristemo apical de raíz y controlar el desarrollo de la raíz principal (Chacón-López *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha observado un incremento en el transporte de ácido abscísico en el xilema en plantas bajo condiciones deficientes de Pi, lo que sugiere que esta hormona podría estar activando procesos sistémicos bajo deficiencia de Pi (Jaschke *et al.*, 1997). Existen algunas evidencias que indican que estas tres fitohormonas controlan negativamente el establecimiento de la simbiosis y el desarrollo del nódulo (Oldroyd *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la acumulación de etileno o jasmonato inactiva la expresión de genes tempranos relacionados con la simbiosis (p. ej., ENOD11), inhibe la iniciación y el mantenimiento de la acumulación de calcio, disminuye el número de deformaciones de los pelos radicales e hilos de infección, y reduce la formación de nódulos en plantas de *M. truncatula* (Oldroyd *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2006). Recientemente, se demostró que el impacto negativo del etileno en el proceso de infección por rizobios y la formación de nódulos está bajo el control del regulador EIN2 (Reid *et al.*, 2018). En resumen, la activación de las vías de señalización de etileno, jasmonato y ácido abscísico por la deficiencia de Pi compromete la activación de eventos moleculares y fisiológicos tempranos de la simbiosis, como se demuestra en este estudio.

Otra de las aportaciones de este proyecto fue demostrar que la acumulación de los péptidos PvRIC1 y PvRIC2 se regula por la deficiencia de Pi (Isidra-Arellano *et al.*, 2020). La actividad de los péptidos relacionados en respuesta a algún estrés abiótico no es algo nuevo. Sin embargo, durante décadas era aceptado que la acumulación de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13 era exclusivamente en respuesta a la interacción con rizobios (Ferguson *et al.*, 2019). Los péptidos pueden actuar como fitohormonas regulando varios procesos bioquímicos y fisiológicos los cuales coordinan diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Betsuyaku *et al.*, 2011). Estos péptidos pueden ser móviles y regular procesos a corta o a larga distancia (Mortier *et al.*,

2010). Se han identificado algunos péptidos que controlan los mecanismos de adaptación y tolerancia en respuesta al estrés abiótico causado por la deficiencia de Pi. En *A. thaliana* se identificó el péptido CLE14, el cual media la señal de estrés por bajo contenido de Pi (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2017). Su actividad permite que las plantas se adapten a la deficiencia inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria para promover el desarrollo de raíces laterales (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2017). Este proceso es regulado a través de la detección de CLE14 por el receptor CLV2 y PEPR2 lo que desencadena la diferenciación de Root Apical Meristem (RAM) proceso crítico de la respuesta ante la deficiencia de Pi (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2017). Asimismo, se han reportado los péptidos conocidos como RGF1 y RGF2 (Root Growth Factor) los cuales también están involucrados en las respuestas adaptativas ante la deficiencia de Pi. Estos péptidos modulan las divisiones celulares en las raíces, permitiendo la modificación del sistema radical para optimizar la captación de Pi (Cederholm *et al.*, 2015).

En leguminosas, los péptidos mayormente caracterizados han sido los péptidos en respuesta a altas concentraciones de nitrógeno. Previamente en *G. max* se había reportado el péptido NIC1 (Nitrate Induced CLE peptide 1) el cual responde a concentraciones altas de nitrato e inhibe por completo la formación de nódulos (Ferguson *et al.*, 2019). Esto se debe a que la planta al obtener fuentes externas de N<sub>2</sub> no requiere seguir manteniendo la simbiosis con rizobios. Análisis filogenéticos revelan que el péptido NIC1 se encuentra conservado en *P. vulgaris* (PvNIC1), sin embargo, su papel no ha sido estudiado hasta el momento. En estudios más recientes, se identificó el ortólogo de GmNIC1 en *M. truncatula* llamado CLE34, así como el péptido CL35 (Mens *et al.*, 2021). Ambos péptidos responden a concentraciones altas de nitrato e inhiben la nodulación de una manera dependiente de MtSUNN (Mens *et al.*, 2021). Por su parte en *L. japonicus* se identificó el péptido LjCLE40 el cual responde de la misma forma a altas concentraciones de nitrato para inhibir la formación de nódulos (Okamoto *et al.*, 2009).

El papel de los péptidos en la simbiosis es un tema relativamente nuevo, estudios hoy en día se han centrado en reevaluar el papel los péptidos en leguminosas que se creían específicos para ciertos procesos. El descubrimiento de la participación de los péptidos PvRIC1 y PvRIC2 en respuesta a la deficiencia de Pi confirma la plasticidad que pueden tener los péptidos para responder a diferentes estímulos regulando un mismo proceso como

la nodulación. Esta plasticidad puede deberse a los elementos regulatorios *cis* contenidos en los promotores de estos genes. Estudios filogenéticos detallados demuestran que muchas de las familias de genes en plantas leguminosas pasaron por un proceso de duplicación (Valdés-López *et al.*, 2008). Al analizar los promotores de estas familias existe una gran diferencia entre los promotores de plantas leguminosas respecto a las no leguminosas. Estos datos sugieren que los procesos de neofuncionalización de genes también puede deberse a la adquisición de elementos regulatorios *cis*. Esta adquisición puede explicar en parte porque genes ortólogos de *A. thaliana* cumplen funciones completamente distintas en plantas leguminosas. El análisis *in silico* de los promotores de *PvRIC1* y *PvRIC2*, reveló la presencia de elementos P1BS. Estos elementos han sido muy caracterizados en el sistema PSI ya que son reconocidos por PHR1 (Bustos *et al.*, 2010). La importancia de la presencia de estos sitios P1BS radica en que PHR1 se puede unir a los promotores de *PvRIC1* y *PvRIC2* y activar su transcripción. El mecanismo descrito no había sido reportado anteriormente, siendo una de las contribuciones más significativas del presente proyecto al campo de estudio de la simbiosis leguminosa-rizobio. Estos datos demuestran que el proceso de AON puede ser activado de forma canónica, o de forma no canónica mediada por el factor de transcripción PHR1.

Los niveles intracelulares de Pi también modulan la asociación con microorganismos capaces de solubilizar el Pi en el suelo (Isidra-Arellano *et al.*, 2021). Durante los últimos años se ha enfatizado acerca de la importancia del Pi en la regulación de las interacciones planta-microorganismo (Isidra-Arellano *et al.*, 2021). La simbiosis mayormente estudiada es la interacción simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares “AMF” (por sus siglas en inglés: Arbuscular Mycorrhiza Fungi). Esta simbiosis es promovida en niveles bajos de Pi e inhibida en altas concentraciones de Pi en la planta (MacLean *et al.*, 2017). Muy recientemente se demostró el papel que juega PHR2 (el ortólogo de PHR1 en *Oryza sativa*) en la regulación de la simbiosis AM (por sus siglas en inglés: Arbuscular Mycorrhiza) (Das *et al.*, 2022). Su importancia se demostró a través de la utilización de mutantes *phr2*, las cuales muestran una reducción drástica en la colonización de los AMF hacia las raíces de *Oryza sativa* (Das *et al.*, 2022). Asimismo, se demostró que PHR2 regula una red de genes asociados a la simbiosis AM, mostrando que la mutante *phr2* mostró una reducción en los niveles de expresión de casi 70% de los genes esenciales en la simbiosis (Das *et al.*, 2022).

En consecuencia, estas mutantes muestran defectos en la comunicación previo al contacto entre los simbioses, defectos en la distribución del hongo dentro de la raíz así como en el intercambio de nutrientes. Estos datos en conjunto demuestran que el sistema PSR es indispensable para modular la simbiosis AM, lo que implica que el estatus de Pi es determinante en esta interacción (Das *et al.*, 2022).

PHR1/2 no solo tiene un papel en la activación de genes simbióticos sino también en el mantenimiento de la simbiosis AM debido a que mantiene su papel en la regulación de transportadores de Pi. En *L. japonicus* y *M. truncatula* se identificaron los genes *LjPT4* y *MtPT4* (activados por PHR1) cuya transcripción solo se mantiene en células colonizadas por AM (Volpe *et al.*, 2016). Estos genes codifican para transportadores de Pi los cuales se localizan en la membrana periarbuscular (Volpe *et al.*, 2016). El silenciamiento génico de *LjPT4* y *MtPT4* genera enormes defectos en el mantenimiento de la simbiosis. Plantas silenciadas *ipt4* y *ipt4* muestran una reducción significativa de la formación y crecimiento de arbusculos, lo que posteriormente conduce a la muerte prematura de los arbusculos (Volpe *et al.*, 2016). Estos datos evidencian que el transporte e intercambio de Pi no solo es el beneficio final, si no esencial como requisito para el mantenimiento de la simbiosis AM. El papel de PHR1 como sensor del estatus de Pi le permite coordinar una red de genes importantes para la homeostasis y transporte de Pi, así como en la regulación de genes relacionados con la simbiosis AM como se mencionó anteriormente. Recientemente se demostró que PHR1 también juega un papel clave en el mantenimiento de la simbiosis con rizobios. En *G. max* se identificó a *GmPHT1*, la sobreexpresión de este transportador desencadena el aumento en la acumulación de Pi en los nódulos, aumenta el tamaño de los nódulos así como una mejora en la actividad de la enzima nitrogenasa. Esto demuestra la importancia del módulo de regulación *GmPHR-GmPHT1* que mantiene la homeostasis de Pi en los nódulos (Lu *et al.*, 2020). Estos datos sugieren que a pesar de que la FSN no aporta de manera significativa fuentes de Pi, si se requiere una gran cantidad para mantenerla. Por ello, la adquisición y transporte de Pi son procesos clave para la eficiencia de la FSN en leguminosas.

En el presente trabajo demostramos que PHR1 también juega un papel fundamental en la regulación del número de nódulos en la simbiosis leguminosa-rizobio bajo deficiencia de Pi (Isidra-Arellano *et al.*, 2020). Cuando los niveles de Pi en la planta bajan, el número de

nódulos se reduce, debido a que la planta hace reajustes metabólicos. Es probable que el número de nódulos se reduzca al máximo para evitar una demanda excesiva de nutrientes como el Pi por parte del rizobio. Este reajuste metabólico deja como prioridad la obtención y removilización de Pi para procesos vitales en la planta, dejando la FSN como proceso no prioritario. Estos ajustes metabólicos se regulan de manera aún desconocida a través del proceso de AON.

A pesar de que las simbiosis AM y la FSN son las más estudiadas, existen otras interacciones que no son estrictamente simbióticas pero que están vinculadas con el estado nutricional del Pi. En *A. thaliana* al ser incapaz de establecer asociaciones simbióticas con AMF, establece una interacción beneficiosa con el hongo endófito *Colletotrichum tofieldiae* con el fin de captar mejor fuentes de Pi presentes en el suelo (Frerigmann *et al.*, 2021). Se demostró que esta interacción está controlada por el sistema PSR y el estatus de Pi de la planta. Esta asociación se establece solo bajo deficiencia de Pi, en cuyo caso el hongo transfiere Pi a la planta (Frerigmann *et al.*, 2021). Cuando los niveles de Pi se restablecen la presencia de este endófito activa las defensas de la planta y la colonización de hongos se ve restringida a través de la secreción de metabolitos secundarios (Frerigmann *et al.*, 2021). Muy similar a lo que ocurre en las mutantes *ipt3* y *ipt4* que son incapaces de realizar el intercambio de Pi del hongo hacia la planta, genera una baja tasa de crecimiento de los AMF lo que inevitablemente conduce a una muerte prematura de los arbusculos. Estos datos dejan en evidencia el papel esencial que juega el Pi en las interacciones con microorganismos las cuales pueden resultar ser benéficas o patógenas, dependiendo del estado nutricional de Pi en la planta (Frerigmann *et al.*, 2021; Isidra-Arellano *et al.*, 2021).

Parte de las ideas generadas en el presente trabajo y de otros estudios presentados en esta discusión fueron clave para la elaboración de una Revisión en la revista *Plant and Cell Physiology* en el año 2021 donde fungí como primera autora; **Isidra-Arellano MC, Delaux PM y Valdés-López O. (2021) The Phosphate Starvation Response System: Its Role in the Regulation of Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol.* 62(3), 392-400.**



Otro de las contribuciones de esta tesis doctoral al campo de estudio de las leguminosas es demostrar el impacto de la deficiencia de Pi en la expresión de uno de los reguladores más importantes en la simbiosis, *PvNIN*. *NIN* es considerado como el regulador maestro de la simbiosis leguminosa-rizobio (Yoro *et al.*, 2014). Las diversas funciones que cumple durante la simbiosis han permitido identificarlo como un gen esencial y crítico durante este proceso. *NIN* participa en procesos diversos tales como: la decodificación de los FNs, colonización e infección rizobial, organogénesis del nódulo, mantenimiento de la FSN, y activación de la AON (Soyano *et al.*, 2013; Soyano *et al.*, 2014; Yoro *et al.*, 2014; Schiessl *et al.*, 2019). En esta tesis doctoral se generaron evidencias que indican que la expresión de *PvNIN* relacionada en las primeras etapas de la simbiosis, la decodificación de los FNs y la colonización se ve significativamente afectada en condiciones deficientes de Pi. Además, se identificó una región de su promotor que es probablemente esencial para responder y modular los procesos de colonización en condiciones de deficientes de Pi. Estos datos demuestran cómo es que esta deficiencia de Pi genera grandes daños en las primeras etapas de la simbiosis. Asimismo, se demostró la presencia del elemento *cis* conocido como CYC box entre -476 al -1107 río arriba del codón de inicio. Este elemento *cis* ha sido reportado previamente en *L. japonicus* el cual es reconocido por el factor de transcripción CYCLOPS (Singh *et al.*, 2014). Aunque experimentalmente no se comprobó la unión de CYCLOPS a los elementos CYC box encontrados en el promotor de *PvNIN*, la actividad transcripcional de esa región se mostró en las zonas más importantes de la simbiosis; pelos radicales y epidermis esencial para la colonización de los rizobios hacia el córtex. Previamente, se demostró que la expresión de *NIN* en estas zonas está más asociada a una regulación positiva de la simbiosis. Sin embargo, la actividad transcripcional observada en deficiencia de Pi muestra un patrón completamente distinto. Se observó una drástica reducción de la actividad en estas zonas esenciales para el proceso de colonización, y un aumento en las zonas del córtex interno y periciclo. La expresión de *PvNIN* en el córtex puede sugerir un rol negativo de la simbiosis a través de la activación de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13. Asimismo, nuestros análisis de la actividad de su promotor revelan que su función también es mediada por la deficiencia de Pi. La región del 5838 al -6636 pb de su promotor muestran señal más asociada a la deficiencia de Pi sin importar la ausencia o presencia de rizobios, la cual podría estar

mediada por PHR1. Estos datos en conjunto demuestran que su función *NIN* tiene un impacto muy significativo en la simbiosis leguminosa-rizobio no solo en condiciones óptimas sino también respondiendo ante la deficiencia de Pi.

PHR1 y NIN son reguladores esenciales durante la simbiosis leguminosa-rizobio en deficiencia de Pi. Sin embargo, uno de los objetivos primordiales de este estudio fue determinar cómo se regula la nodulación en la simbiosis leguminosa-rizobio en deficiencia de Pi. A través de diversas estrategias experimentales se demostró que la nodulación se regula de forma sistémica y de manera dependiente del receptor NARK. Los análisis hasta el momento demuestran que existen dos vías de regulación para la nodulación, la primera es la regulación local como lo que ocurre en la AON activada por nitrato y la segunda se regula de forma sistémica en este caso por la percepción de rizobios. Bajo deficiencia de Pi, las plantas exhiben dos tipos de respuestas las locales y las sistémicas (Bustos *et al.*, 2010). Las respuestas sistémicas están relacionadas con el estatus interno de Pi, mientras que las respuestas locales se activan al sensor los niveles de Pi externo a través de sus raíces (Bustos *et al.*, 2010). En el presente trabajo demostramos que la deficiencia de Pi en leguminosas genera tanto respuestas locales a través del sistema PSI y respuestas sistémicas a través de la AON. Detectamos respuestas locales mediadas por PHR1, el cual activó de manera local componentes del sistema PSI así como a los péptidos PvRIC1 y PvRIC2. Sin embargo, la activación de los péptidos PvRIC1 y PvRIC2 detona una respuesta sistémica a través de la activación de la AON. Esto sugiere que las respuestas locales y sistémicas están estrechamente vinculadas en plantas leguminosas bajo deficiencia de Pi.

## 8. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- La deficiencia de Pi afecta la expresión de genes simbióticos; *PvNSP2*, *FLOT2* y *PvNIN*.
- La deficiencia de Pi genera defectos en la adhesión y colonización de los rizobios en las raíces de *P. vulgaris*.
- La deficiencia de Pi genera cambios en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis y homeostasis de auxinas, citocininas, etileno, jasmonato y ácido abscísico.
- PHR1 activa la transcripción de *PvRIC1*, y tiene una influencia en la expresión de *PvRIC2*, *PvNIN* y *PvTML*.
- La deficiencia de Pi genera cambios en los patrones de la actividad transcripcional de *PvNIN*.
- La deficiencia de Pi, a través de PHR1, activa la AON regulando la nodulación de forma sistémica y de manera dependiente del receptor NARK.

## 9. Perspectivas

El presente trabajo proporciona una mayor comprensión sobre los mecanismos genéticos que controlan el establecimiento de la simbiosis bajo la deficiencia de Pi. Sin embargo se requieren estudios más detallados acerca del papel que juega PHR1 en el establecimiento de la simbiosis frijol-rizobio tanto en condiciones óptimas como deficientes de Pi. Es decir, entender parte del mecanismo de acción de PHR1 en la regulación genética de esta simbiosis. Esto se puede abordar a través de determinar si la expresión de *PHR1* se regula durante el proceso de infección rizobial y en el desarrollo del nódulo. Así como identificar los módulos transcripcionales simbióticos que se regulan por PHR1.

Por otro lado, el presente trabajo demostró que la actividad de *NIN* también se regula por la deficiencia de Pi. Se demostró que tanto PHR1 como NIN juegan un papel crucial en las respuestas ante la deficiencia de Pi en frijol. Por esta razón será importante evaluar la posible interacción entre las proteínas PHR1 y NIN con el fin de regular genes simbióticos. Así como los nuevos posibles roles que pueda jugar NIN en la modulación de genes ante la deficiencia de Pi. Por esta razón será importante identificar los módulos transcripcionales regulados por NIN en condiciones de deficiencia de Pi.

Finalmente, a pesar de los grandes esfuerzos por entender el proceso de Autoregulación de la Nodulación, existen mecanismos que aún desconocemos tales como el mecanismo preciso después de la detección de los péptidos RIC1 y RIC2 por el receptor NARK. Es decir, como se activa la señal inhibitoria desencadenada de la parte aérea hacia el sistema radical. Asimismo, se desconoce cuál o cuáles son los objetivos blanco de la proteína Too Much Love, que permite la regulación meristemática en el sistema radical para el control del número de nódulos. Dado que la deficiencia de Pi activa el proceso de Autoregulación de la Nodulación, conocer el mecanismo preciso permitirá comprender cómo se regula la nodulación tanto en condiciones óptimas como deficientes de Pi.

Estas estrategias experimentales permitirán en un futuro proponer un modelo acerca de la regulación genética ante la deficiencia de Pi en la simbiosis leguminosa-rizobio.

## 10. Referencias Bibliográficas

**Andrio E, Marino D, Marmeys A, et al.** (2013). Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* 198, 179–189.

**Ané JM, Kiss GB, Riely BK, et al.** (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science.* 303, 1364–1367.

**Arthikala MK, Montiel J, Sánchez-López R, Nava N, Cárdenas L y Quinto C.** (2017) Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A is crucial for rhizobium infection and nodule maturation and function in common bean. *Front. Plant Sci.* 8, 2003.

**Bari R, Pant BD, Stitt M y Scheible WR.** (2006) PHO2: MicroRNA399: And PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141, 988–999.

**Bellucci E, Bitocchi E, Rodriguez M, et al.** (2014). Genomics of Origin, Domestication and Evolution of *Phaseolus vulgaris*. In: Tuberosa, R., Graner, A., Frison, E. (eds) Genomics of Plant Genetic Resources. *Springer, Dordrecht.* pp 483–507.

**Bernhard A.** (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge.* 3(10), 25.

**Betsuyaku S, Sawa S y Yamada M.** (2011) The Function of the CLE Peptides in Plant Development and Plant-Microbe Interactions. *Arabidopsis Book.* 9:e0149.

**Breakspear A, Liu C, Roy S. et al.** (2014) The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *Plant Cell.* 26, 4680–4701.

**Broghammer A, Krussel L, Blaise M. et al.** (2012) Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharides signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 13859–13864.

**Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P y Vanderleyden J.** (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)—Model food legumes. *Plant Soil*. 252, 55–128.

**Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A y Paz-Ares J.** (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 6, e1001102.

**Cabeza RA, Liese R, Lingner A, et al.** (2014) RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N<sub>2</sub> fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *J of Exp Bot*. 65, 6035-6048.

**Capoen W, Sun J, Wysham D, et al.** (2011) Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(34), 14348-14353.

**Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ y Bennett M.** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*. 13, 843–852.

**Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG y Valdés-López O.** (2016). Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiencies. *Front Plant Sci*. 7, 600.

**Cebolla A, Vinardell JM, Kiss E, Oláh B, Roudier F, Kondorosi A y Kondorosi E.** (1999) The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*. 18, 4476–4484.

**Cederholm HM y Benfey PN.** (2015) Distinct sensitivities to phosphate deprivation suggest that RGF peptides play disparate roles in *Arabidopsis thaliana* root development. *New Phytol*. 207(3), 683-91.

**Chacón-López A, Ibarra-Laclette E, Sánchez-Calderón L, Gutiérrez-Alanís D y Herrera-Estrella L** (2011) Global expression pattern comparison between low phosphorus insensitive 4 and WT *Arabidopsis* reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal Behav*. 6, 382–392.

**Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, et al.** (2016) Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*. 352, 1102–1105.

**Chen Y, Chen W, Li X, Jiang H, Wu P, Xia K, Yang Y y Wu G.** (2014). Knockdown of LjIPT3 influences nodule development in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol*. 55, 183–193.

**Cherkasov N, Ibhaddon AO y Fitzpatrick P.** (2015) A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 90, 24–33.

**Chiou TJ y Lin SI** (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 62, 185–206.

**Cordell D, Drangert JO y White S.** (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob Environ Change*. 19, 292–305.

**Das D, Paries M, Hobecker K, Gigl M, Dawid C, Lam HM, Zhang J, Chen M y Gutjahr C.** (2022) PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nat Commun*. 13(1), 477.

**Dénarié J, Debelle F y Promé JC** (1996) Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem*. 65, 503–535.

**diCenzo GC, Tesi M, Pfau T, Mengoni A, Fondi M.** (2020). Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nat Commun*. 11: 2574.

**Ding Y, Kalo P, Yendrek, C, et al.** (2008) Abscisic acid coordinates Nod factors and cytokinins signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 20, 2681–2695.

**Dokwal D, Romsdahl TB, Kunz DA, Alonso AP y Dickstein R.** (2021) Phosphorus deprivation affects composition and spatial distribution of membrane lipids in legume nodules. *Plant Physiol*. 185(4), 1847-1859.

**Du Z, Zhou X, Liang Y, Zhang Z y Su Z.** (2010) agriGO: A GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res.* 38, W64–W70.

**Dutra E.D y Mejía V P.** (2021) The regions of the root. *Botany in Hawai'i.* pag 23.

**Ehrhardt DW, Wais R y Long SR.** (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell.* 85, 673–681.

**Fan C, Wang X, Hu R, et al.** (2013) The pattern of Phosphate transporter 1 genes evolutionary divergence in *Glycine max* L. *BMC Plant Biol.* 13, 48.

**FAO, IFAD, UNICEF, WFP y WHO.** (2021) The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition, and affordable healthy diets for all. Rome, FAO.

**FAO.** (2016) Legumbres; Semillas nutritivas para un futuro sostenible. 35-41 pp. ISBN 978-92-5-309463-9.

**Ferguson BJ, Li D, Hastwell AH, Reid DE, Li Y, Jackson SA y Gresshoff PM.** (2014). The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, GmRIC1, functions inter- specifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnol J.* 12, 1085–1097.

**Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X y Gresshoff PM.** (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42, 41–51.

**Frerigmann H, Piotrowski M, Lemke R, Bednarek P y Schulze-Lefert P.** (2021) A Network of Phosphate Starvation and Immune-Related Signaling and Metabolic Pathways Controls the Interaction between *Arabidopsis thaliana* and the Beneficial Fungus *Colletotrichum tofieldiae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 34 (5), 560-570.

**Gaudioso-Pedraza R, Beck M, Frances L, Kirk P, Ripodas C, Niebel A, Oldroyd GED, Benitez-Alfonso Y y de Carvalho-Niebel F.** (2018) Callose-Regulated Symplastic Communication Coordinates Symbiotic Root Nodule Development. *Curr Biol.* 28(22), 3562-3577.e6.



**Gautrat P, Laffont C y Frugier F.** (2020) Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. *Curr Biol.* 30(7), 1339-1345.e3.

**Gilbert N.** (2009) The disappearing nutrient. *Nature.* 461, 716–718.

**González JE y Marketon MM.** (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67 (4), 574-92.

**Gonzalez-Rizzo S, Crespi M y Frugier F.** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 18, 2680–2693.

**Gu M, Chen A, Sun S y Xu G.** (2016). Complex regulation of plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: What is missing? *Mol Plant.* 9, 396–416.

**Gutiérrez-Alanís D, Yong-Villalobos L, Jiménez-Sandoval et al.** (2017) Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. *Dev Cell.* 41(5),555-570.e3.

**Hadri AE, Spaink HP, Bisseling T y Brewin NJ.** (1998). Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. In *The Rhizobiaceae*, eds Dordrecht, The Netherlands: *Springer*. pp. 347–360.

**Hakoyama T, Oi R, Hazuma K, et al.** (2012). The SNARE protein SYP71 expressed in vascular tissues is involved in symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Physiol.* 160, 897–905.

**Haney CH y Long SR.** (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 478–483.

**Haney CH, Riely BK, Tricoli DM, Cook DR, Ehrhardt DW y Long SR.** (2011). Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3. *Plant Cell*. 23, 2774–2787.

**Heckmann AB, Sandal N, Bek AS, Madsen LH, Jurkiewicz A, Nielsen MW, Tirichine L y Stougaard J.** (2011) Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol Plant Microbe Interact*. 24, 1385–1395.

**Held M, Hou H, Miri M, et al.** (2014). *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell*. 26, 678–694.

**Hernández G, Ramírez M, Valdés-López O, et al.** (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol*. 144, 752–767.

**Hernández G, Valdés-López O, Ramírez M, et al.** (2009) Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant Physiol*. 151, 1221-1238.

**Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M y Korenga T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*. 27, 297–300.

**Hirel B, Tétu T, Lea PJ y Dubois F.** (2011) Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. *Sustainability*. 3, 1452-1485.

**Hirsch AM, Bhuvaneshwari TV, Torrey JG y Bisseling T.** (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa roots outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 1244–1248.

**Hirsch S, Kim J, Muñoz A, Heckmann AB, Downie JA y Oldroyd GED.** (2009) GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. 21,545–557.

**Huault E, Laffont C, Wen J, Mysore KS, Ratet P, Duc G y Frugier F.** (2014). Local and systemic regulation of plant root system architecture and symbiotic nodulation by a receptor-like kinase. *PLoS Genet.* 10, e1004891.

**Imin N, Mohd-Radzman NA, Ogilvie HA y Djordjevic MA.** (2013). The peptide encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot.* 64, 5395–5409.

**Isidra-Arellano MC, Delaux PM, Valdés-López O.** (2021) The Phosphate Starvation Response System: Its Role in the Regulation of Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell Physiol.* 62(3), 392-400.

**Isidra-Arellano MC y Valdés-López O.** (2021). Nitrógeno en suelos agrícolas: Una Estrategia Ecológica. *Revista Saber Más.* 60, 69-73.

**Isidra-Arellano MC, Pozas-Rodríguez EA, Del Rocío Reyero-Saavedra M, et al.** (2020) Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway. *Plant J.* 103(3), 1125-1139.

**Isidra-Arellano MC, Reyero-Saavedra M, Sánchez-Correa M, et al.** (2018) Phosphate Deficiency Negatively Affects Early Steps of the Symbiosis between Common Bean and Rhizobia. *Genes.* 9(10), 498.

**Ivanov S, Fedorova EE, Limpens E, De Mita S, Genre A, Bonfante P y Bisseling T.** (2012). Rhizobium-legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 8316–8321.

**Jaschke WD, Peuke AD, Pate JS y Hartung W.** (1997) Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J Exp Bot* 48: 1737–1747.

**Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, Alves BJR y Morrison MJ.** (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* 32(2), 329-364.

**Kanamori N, Madsen LH, Radatoiu S, et al.** (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 359–364.

**Kant S, Peng M y Rothstein SJ.** (2011) Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 7, e1002021.

**Kassaw T, Nowark S, Schnabel E y Frugoli J.** (2017) ROOT DETERMINED NODULATION1 is required for *M. truncatula* CLE12, but not CLE13, peptide signaling through the SUNN receptor kinase. *Plant Physiol.* 174, 2445-2456.

**Kevei Z, Lougnon G, Mergaert P, et al.** (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 19, 3974–3989.

**Khatun M, Sarkar S, Era FM, et al.** (2021) Drought Stress in Grain Legumes: Effects, Tolerance Mechanisms and Management. *Agronomy.* 11, 2374.

**Kochian LV, Pineros MA, Liu J y Magalhaes JV.** (2015) Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu Rev Plant Biol.* 66, 571–598.

**Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA y Oldroyd GE.** (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105. 9823–9828.

**Krusell L, Madsen LH, Sato S, et al.** (2002). Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature.* 420, 422–426.

**Kuppusamy KT, Endre G, Prabhu R, Penmetra RV, Veereshlingam H, Cook DR, Dickstein R y Vandenbosch KA.** (2004) LIN, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiol.* 136(3), 3682-91.

**Laffont C, Huault E, Gautrat P, Endre G, Kalo P, Bourion V, Duc G y Frugier F.** (2019) Independent Regulation of Symbiotic Nodulation by the SUNN Negative and CRA2 Positive Systemic Pathways. *Plant Physiol.* 180(1), 559-570.

**Lazali M y Devron JJ.** (2014) The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with phytase activity in N<sub>2</sub>-fixing *Phaseolus vulgaris L.* *Plant Physiol Biochem.* 80, 53-59.

**Li Z, Hu J, Wu Y, et al.** (2022) Integrative analysis of the metabolome and transcriptome reveal the phosphate deficiency response pathways of alfalfa. *Plant Physiol Biochem.* 170, 49-63.

**Liese R, Schulze J y Cabeza RA.** (2017). Nitrate application or P deficiency induce a decline in *Medicago truncatula* N<sub>2</sub>-fixation by similar changes in the nodule transcriptome. *Sci Rep.* 7,46264.

**Lim CW, Lee YW y Hwang CH.** (2011). Soybean nodule- enhanced CLE peptides in roots act as signals in GmNARK-mediated nodulation suppression. *Plant Cell Physiol.* 52, 1613–1627.

**Lin WY, Huang TK y Chiou TJ.** (2013) NITROGEN LIMITATION ADAPTATION, a target of microRNA827: Mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25, 4061–4074.

**Liu CW y Murray JD.** (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants.* 11, E33.

**Liu CW, Breakspear A, Guan D, et al.** (2019). NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* 179, 1704–1722.

**Liu CW, Breakspear A, Stacey N, et al.** (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nat Commun.* 10, 2848.

**Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E.** (2018) Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J Integr Plant Biol.* 60(8), 632-648.

**Liu J, Rasing M, Zeng T, Klein J, Kulikova O y Bisseling T.** (2021) NIN is essential for development of symbiosomes, suppression of defence and premature senescence in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* 230(1), 290-303.

**Liu J, Rutten L, Limpens E, et al.** (2019) A Remote *cis*-Regulatory Region Is Required for NIN Expression in the Pericycle to Initiate Nodule Primordium Formation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 31(1), 68-83.

**Liu J, Versaw WK, Pumplin N, Gomez SK, Blaylock LA y Harrison M J.** (2008) Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *J Biol Chem.* 283, 24673–24681.

**López-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sanchez-Calderon L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J y Herrera-Estrella L.** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol.* 129, 244–256.

**Lu M, Cheng Z, Zhang XM, et al.** (2020) Spatial Divergence of *PHR-PHT1* Modules Maintains Phosphorus Homeostasis in Soybean Nodules. *Plant Physiol.* 184(1):236-250.

**Lynch J.** (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109, 7.

**MacLean AM, Bravo A y Harrison MJ.** (2017) Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Cell.* 29(10), 2319-2335.

**Marino D, Andrio E, Danchin EGJ, Oger E, Gucciardo S, Lambert A, Puppo A y Pauly N.** (2011) A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* 189, 580–592.

**Martín AC, Del Pozo JC, Iglesias J, Rubio V, Solano R, De La Peña A, Leyva A y Paz-Ares J.** (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. *Plant J.* 24, 559–567.

**Mens C, Hastwell AH, Su H, Gresshoff PM, Mathesius U y Ferguson BJ.** (2021) Characterization of *Medicago truncatula* CLE34 and CLE35 in nitrate and rhizobia regulation of nodulation. *New Phytol.* 229 (5), 2525-2534.

**Mens C, Li D, Haaima LE, Gresshoff PM y Ferguson BJ.** (2018) Local and Systemic Effect of Cytokinins on Soybean Nodulation and Regulation of Their Isopentenyl Transferase (IPT) Biosynthesis Genes Following Rhizobia Inoculation. *Front Plant Sci.* 9,1150.

**Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, et al.** (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 5230–5235.

**Miller JB, Pratap A, Miyahara A, Zhou L, Borneman S, Morris RJ y Oldroyd GE.** (2013) Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *Plant Cell.* 25, 5053–5066.

**Miri M, Janakirama P, Huebert T, Ross L, McDowell T, Orosz K, Markmann K y Szczyglowski K.** (2019). Inside out: Root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytol.* 222, 1523–1537.

**Mohd-Radzman NA, Laffont C, Ivanovici A, Patel N, Reid D, Stougaard J, Frugier F, Imin N y Djordjevic MA.** (2016). Different pathways act downstream of the CEP peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. *Plant Physiol.* 171, 2536–2548.

**Moreau C, Gautrat P y Frugier F.** (2021) Nitrate-induced CLE35 signaling peptides inhibit nodulation through the SUNN receptor and miR2111 repression. *Plant Physiol.* 185(3), 1216-1228.

**Mortier V, Den Herder G, Whitford R, et al.** (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol.* 153: 222–237

**Murakami E, Cheng, J, Gysel K. et al.** (2018) Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signaling in *Lotus japonicus*. *ELife.* 7, e33506.

**Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L y Szczyglowski K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science*. 315, 101–104.

**Murray JD, Karas BJ, Sato S, Tabata S, Amyot L y Szczyglowski K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by Rhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science*. 315, 101–104.

**Murray JD, Muni RR, Torres-Jerez I, et al.** (2011). Vapyrin, a gene essential for intracellular progression of arbuscular mycorrhizal symbiosis, is also essential for infection by rhizobia in the nodule symbiosis of *Medicago truncatula*. *Plant J*. 65, 244–252.

**Nadzieja M, Kelly S, Stougaard J y Reid D.** (2018) Epidermal auxin biosynthesis facilitates rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant J*. 95, 101–111.

**Nasr Esfahani MN, Kusano M, Nguyen KH, et al.** (2016) Adaptation of the symbiotic Mesorhizobium-chickpea relationship to phosphate deficiency relies on reprogramming of whole-plant metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(32), E4610-9.

**Nasr Esfahani, M, Inoue, K, Chu HD, et al.** (2017). Comparative transcriptome analysis of nodules of two Mesorhizobium-chickpea associations with differential symbiotic efficiency under phosphate deficiency. *Plant J*. 95, 911–926.

**Ng JL, Hassan S, Truong TT, Hocart CH, Laffont C, Frugier F y Mathesius U.** (2015) Flavonoids and auxin transport inhibitors rescue symbiotic nodulation in *Medicago truncatula* cytokinin perception cre1. *Plant Cell*. 27, 2210–2226.

**Nilsson L, Müller R y Nielsen TH** (2010) Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiol Plant*. 139, 129–143.

**Nishida, H., Handa, Y., Tanaka, S. et al.** (2016) Expression of the CLE-RS3 gene suppresses root nodulation in *Lotus japonicus*. *J Plant Res*. 129, 909–919.

**Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, et al.** (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*. 420, 426–429.



**Nutrition and Food Systems Division.** (2017) FAO/INFOODS global food composition database for pulses. FAO. 38 p SBN: 978-92-5-109637-6.

**O'Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G y Gutiérrez RA.** (2016) Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant.* 9, 837–856.

**Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S y Kawaguchi M.** (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50, 67–77.

**Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S y Kawaguchi M.** (2009) Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* 50(1), 67–77.

**Okamoto S, Tabata R y Matsubayashi Y.** (2016). Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 34, 35–40.

**Okuma N, Soyano T, Suzuki T y Kawaguchi M.** (2020) MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat Commun.* 11(1), 5192.

**Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS y Downie JA.** (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144.

**Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS y Downie JA.** (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 45, 119–144.

**Oldroyd GED, Engstrom EM y Long SR.** (2001) Ethylene inhibits the Nod factor signaling transduction pathway of *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 13, 1835–1849.

**Pant BD, Buhtz A, Kehr J y Scheible WR.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* 53, 731–738.

**Peng M, Hannam C, Gu H, Bi YM y Rothstein SJ.** (2007) A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of Arabidopsis to nitrogen limitation. *Plant J.* 50, 320–337.

**Peret B, Desnos T, Jost R, Kanno S, Berkowitz O y Nussaume L.** (2014) Root architecture responses: In search of phosphate. *Plant Physiol.* 166, 1713–1723.

**Pumplin N, Mondo SJ, Topp S, Starker CG, Gantt JS, and Harrison MJ.** (2010). *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant J.* 61, 482–494.

**Qin L, Guo Y, Chen L, Liang R, Gu M, Xu G, Zhao J, Walk T, Liao H.** (2012) Functional characterization of 14 Pht1 family genes in yeast and their expressions in response to nutrient starvation in soybean. *PLoS One.* 7(10), e47726.

**Radutoiu S, Madsen LH, Madsen E.B. et al.** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 425, 585–592.

**Ramakers C, Ruijter MJ, Deprez HR y Moorman AF.** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci.* 339, 62–66.

**Reid D, Liu H, Kelly S, Kawaharada Y, et al.** (2018) Dynamics of Ethylene production in response to compatible Nod Factor. *Plant Physiol.* 176, 1764–1772.

**Reid D, Nadzieja M, Novák O, Heckmann AB, Sandal N y Stougaard J.** (2017) Cytokinin Biosynthesis Promotes Cortical Cell Responses during Nodule Development. *Plant Physiol.* 175(1), 361-375.

**Rose CM, Venkateshwaran M, Volkening JD, et al.** (2012) Rapid phosphoproteomic and transcriptomic changes in the rhizobia-legume symbiosis. *Mol Cell Proteomics.* 11(9), 724-744.

**Roth LE y Stacey G.** (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol.* 49, 13–23.

**Rouached H, Arpat AB y Poirier Y.** (2010) Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Mol. Plant.* 3, 288–299.

**Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R y Udvardi MK.** (2020) Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell.* 32(1), 15-41.

**Roy S, Robson F, Lilley J,** (2017) MtLAX2, a functional homologue of the Arabidopsis auxin influx transporter AUX1, is required for nodule organogenesis. *Plant Physiol.* 174, 326–338.

**Rubio V, Linhares F, Solano R, et al.** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15, 2122–2133.

**SAGARPA.** (2017) Planeación Agrícola Nacional 2017-2030; Frijol Mexicano. 1-8pp.

**Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H y Kawaguchi M.** (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun.* 19, 5:4983.

**Schauser L, Roussis A, Stiller J y Stougaard J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature.* 402, 191–195.

**Schiessl K, Lilley JLS, Lee T, et al.** (2019) NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Curr Biol.* 29(21), 3657-3668.e5.

**Schnabel E, Journet EP, de Carvalho-Niebel F, Duc G y Frugoli J.** (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol Biol.* 58, 809–822.

**Schnabel EL, Kassaw TK, Smith LS, Marsh JF, Olroyd GE, Long SR, Long SR y Frugoli J.** (2011) The ROOT DETERMINED NODULATION1 gene regulates nodule number in roots of

*Medicago truncatula* and defines a highly conserved, uncharacterized plant gene family. *Plant Physiol.* 157, 328-340.

**Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ y Gresshoff PM.** (2003). Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science.* 299, 109–112.

**Sieberer BJ, Chabaud M, Timmers AC, Monin A, Fournier J y Barker DG.** (2009) A nuclear-targeted chameleon demonstrates intranuclear  $Ca^{2+}$  spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol.* 151, 1197–1206.

**Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M y Parniske M.** (2014) CYCLOPs, a DNA-binding transcriptional activator orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host Microbe.* 15,139–152.

**Smil, V.** (1999) Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochem.* 13, 647–662.

**Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T y Geurts R.** (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science.* 308, 1789–1791.

**Sogawa A, Yamazaki A, Yamasaki H, Komi M, Manabe T, Tajima S, Hayashi M y Nomura M.** (2019) SNARE proteins LjVAMP72a and LjVAMP72b are required for root symbiosis and root hair formation in *Lotus japonicus*. *Front. Plant Sci.* 9, 1992.

**Soyano T, Hirakawa H, Sato S, Hayashi M y Kawaguchi M.** (2014) Nodule Inception creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(40), 14607-12.

**Soyano T, Kouchi H, Hirota A y Hayashi M.** (2013) Nodule Inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* 9, e1003352.

**Soyano T, Liu M, Kawaguchi M y Hayashi M.** (2021) Leguminous nodule symbiosis involves recruitment of factors contributing to lateral root development. *Curr Opin Plant Biol.* 2059, 102000.

**Sprent JI.** (2009) Legume Nodulation: A Global Perspective. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 10.1002/9781444316384.

**Sulieman S y Tran LP.** (2015) Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency. *Plant Sci.* 239, 36–43.

**Sulieman S, Ha CV, Schulze J y Tran LSP.** (2013) Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *J Exp Bot.* 64, 2701-2712.

**Sun J, Cardoza V, Mitchell DM, Brigh L, Oldroyd G y Harris JM.** (2006) Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integrations of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J.* 46, 961–970.

**Supek F, Bošnjak M, Škunca N y Šmuc T.** (2011) REVIGO summarizes and visualizes long list of gene ontology terms. PLoS ONE. 6, e21800.

**Swainsbury DJ, Zhou L, Oldroyd GE y Bornemann S.** (2012) Calcium ion binding properties of *Medicago truncatula* calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Biochemistry.* 51(35), 6895-907.

**Takahara M, Magori S, Soyano T, et al.** (2013). TOO MUCH LOVE, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 54, 433–447.

**Tanabe Y y Nishibayashi Y.** (2013) Developing more sustainable processes for ammonia synthesis. *Coordination Chemistry Reviews.* 257, 2551–2564.

**The Legume Phylogeny Working Group.** (2013) Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades Legume phylogeny and

classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* 62 217–248. 10.12705/622.8.

**Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, et al.** (2004) MAPMAN: A user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37, 914–939.

**Trapnell C, Roberts A, Goff L, et al.** (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protocols.* 7, 562–578.

**Tsikou D, Yan Z, Holt DB, Abel NB, Reid DE, Madsen LH, Bhasin H, Sexauer M, Stougaard J, y Markmann K.** (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science.* 362, 233–236.

**Udvardi M y Poole PS.** (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 781–805.

**Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A y Stitt M.** (2009) A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: A case study in the crop species, maize. *Plant Cell Environ.* 32, 1211–1229.

**Valdés-López O y Hernández G.** (2008) Transcriptional Regulation and Signaling in Phosphorus Starvation: What About Legumes?. *Journal of Integrative Plant Biology.* 50, 1213-1222.

**Valdés-López O, Jayaraman D, Maeda J, et al.** (2019) A Novel Positive Regulator of the Early Stages of Root Nodule Symbiosis Identified by Phosphoproteomics. *Plant Cell Physiol.* 60 (3), 575-586.

**Valdés-López O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, et al.** (2010) MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytol.* 187, 805-818.

**van Zeijl A, Op den Camp RHM y Deinum EE.** (2015) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in *Medicago truncatula* roots. *Mol. Plant.* 8, 1213–1226.

**Vance CP y Heichel GH.** (1991) Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 373–92.

**Vance CP, Uhde-Stone C y Allan DL.** (2003) Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157, 423–447.

**Venkateshwaran M, Jayaraman D, Chabaud M, et al.** (2015). A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(31), 9781-6.

**Venkateshwaran M, Volkening JD, Sussman MR y Ané JM.** (2013) Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16(118), 127.

**Voet, Ester van der.** (1996) “Nitrogen pollution in the European Union”, en Ester van der Voet, Substances from cradle to grave- Development of a methodology for the análisis of substance flows through the economy and the environment of a region, Thesis, Leiden, CML.

**Volpe V, Giovannetti M, Sun XG, Fiorilli V y Bonfante P.** (2016) The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non-mycorrhizal roots. *Plant Cell Environ.* 39(3), 660-71.

**von Wandruszka R.** (2006) Phosphorus retention in calcareous soils and the effect of organic matter on its mobility. *Geochem. Trans.* 7, 6.

**Wild R, Gerasimaite R, Jung JY, et al.** (2016) Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science.* 352, 986–990.

**Winzer T, Bairl A, Linder M, Linder D, Werner D y Müller P.** (1999). A novel 53-kDa nodulin of the symbiosome membrane of soybean nodules, controlled by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 218–226.

**Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GE y Downie JA.** (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 633–638.

**Xie X, Hu W, Fan X, Chen H y Tang M.** (2019) Interactions Between Phosphorus, Zinc, and Iron Homeostasis in Nonmycorrhizal and Mycorrhizal Plants. *Front Plant Sci.* 10, 1172.

**Xu G, Fan X y Miller AJ.** (2012) Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology.* 63, 153–182.

**Yokota K, Fukai E, Madsen LH, et al.** (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell.* 21, 267–284.

**Yoro E, Nishida H, Ogawa-Ohnishi M, Yoshida C, Suzaki T, Matsubayashi Y y Kawaguchi M.** (2019) PLENTY, a hydroxyproline O-arabinosyltransferase, negatively regulates root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot.* 70(2), 507-517.

**Yoro E, Suzaki T, Toyokura K, Miyazawa H, Fukaki H y Kawaguchi M.** (2014) A Positive Regulator of Nodule Organogenesis, NODULE INCEPTION, Acts as a Negative Regulator of Rhizobial Infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 165(2), 747-758.

**Zhang H, Chu S y Zhang D.** (2017) Transcriptome dataset of soybean (*Glycine max*) grown under phosphorus-deficient and -sufficient conditions. *Data.* 2, 17.

**Zhang M, Su H, Gresshoff PM y Ferguson BJ.** (2021) Shoot-derived miR2111 controls legume root and nodule development. *Plant Cell Environ.* 44(5), 1627-1641.

**Zhang Z, Liao H y Lucas WJ.** (2014) Molecular mechanism underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J Integr Plant Biol.* 56, 192–220.



## 11. Información suplementaria

**Tabla Suplementaria S1: Primers utilizados para análisis de qRT-PCR y clonación de genes.**

Primer Name	Primer Sequence	Gene
<b>qRT-PCR</b>		
<i>PvNSP2</i>	F_GAC GGT TAT CGG GTA GAG GAG R_CGG AGG AAG AAG AAG TCC AAA	Phvul.009G122700
<i>PvNIN</i>	F_GGG AGA AGA GGC GTA CGA AG R_GTT GTG GGA CAC ACT CCG AT	Phvul.009G115800
<i>PvFLOT2</i>	F_GGA ACC CTG TCA GAC AAA ACA R_TTC ACG AAT CCA AAA CAA CC	Phvul.009G090700
<i>PvRIC1</i>	F_TAT TGC GGA CAG CCA TCA TCA R_TCC CTC TGG TGC GAG TCT AT	Phvul.005G096901
<i>PvRIC2</i>	F_CTC TCC ATG CCC ACA CTC C R_TCA TGT CCA CGT TTT GCT AGG	Phvul.011g135900
<i>PvTML</i>	F_AGG AGA GTG AAA ATG GCA AGG R_GGG AAA AGA TAG CAC TTG AGG TT	Phvul.001G094400
<i>PvPHR1</i>	F_CAA GAC ATG GTG CTT CCA CTT R_TCT TGC CCA AGA AAA ACA GTG	Phvul.006G134700
<i>PvIPS1</i>	F_GAA TGT ATA ATA AGT TGA AAG ATT GCT R_ACA CCC ACA TGA ACA CAA CAT GGC	Phvul.001G183200
<b>GUS construct</b>		
<i>promotorRIC1</i>	F_CAC CTG ACA ACA CGA TCC TTT AAA TGT C R_AAA CTC TGA ATG AAT GCT GAA CAA	Phvul.005G096901
<i>promotorNIN(CYCLOPS)</i>	F_CAC CAT CTC ACT CAT CGT TCT ACC TAT R_CTT CCT TCC ACT AAC TAA CTA ACT	Phvul.009G115800
<i>promotorNINa</i>	F_CAC CAT GAG CAG GTG AGT ACT GTA TAA R_CTT CCT TCC ACT AAC TAA CTA ACT	Phvul.009G115800
<i>promotorNINb</i>	F_CAC CAC GCG GTG CAA TAT CAT TAA AAC R_TTA TAC AGT ACT CAC CTG CTC ATC	Phvul.009G115800
<i>promotorNINc</i>	F_CAC CAT CTC ACT CAT CGT TCT ACC TAT R_TTT TAA TGA TAT TGC ACC GCG TCA	Phvul.009G115800
<i>promotorNIN (P1BS)</i>	F_CAC CTT CAA GAA TGT ACC ACG CAT CGA R_TAA CAA AAG GAG TCC CGG ACA CC	Phvul.009G115800
<i>promotorPHR1 (Intrón)</i>	F_CAC CAC GCG TGG CAT TGA TTT TAG TTT T R_TTG TCA TTT ATC TGA CAG CAA ACA	Phvul.006G134700
<i>promotorPHR1 (P1BS)</i>	F_CAC CGA CTA TAC AAA ATT TGT GTG TTT GA R_TGA TTG GTT AGT GTG AGA AGG ATT	Phvul.006G134700
<i>promotorAtPHR1</i>	F_CAC CCT ATG AAT CAA AAA GCC ACT TTG G R_TGT TGT CCA GCA AGA GAG AAT CAT	AT4G28610
<b>RNAi construct</b>		
<i>RIC1-RNAi</i>	F_ATC TTC CTT CTA AGC TTA GTT TCT R_CAC CTC ATG TGA ATT ACC ATG GTT TAT G	Phvul.005G096901
<i>RIC2-RNAi</i>	F_CCA TCC ATT CAT TCG TCA AAA TAA R_CAC CTC CCT CTG GTG CGA GTC TAT GTG	Phvul.011g135900
<i>PHR1-RNAi</i>	F_TTT CTC TCT GTG GTA GAA ATT GTT R_CAC CCC TTG AAT CCT CTT CAT TGA TCT	Phvul.006G134700

**Tabla Suplementaria S2: Elementos reguladores *cis* identificados en la región promotora de *PvRIC1***



	Cis-element	Count	Consensus Sequence	Description
<b>Hormones</b>				
<b>MYB</b>	MYB1AT	8	WAACCA	Transcriptional activators in abscisic acid signaling
	MYBST1	8	GGATA	MybSt1 (a potato MYB homolog) binding site, transcriptional activator
	MYBCORE	13	CNGTTR	Regulation of flavonoid biosynthesis
	MYBCOREATCYCB1	6	AACGG	Myb core able to activate reporter gene without leading to M-phase-specific expression
	MYB2CONSENSUSAT	6	YAACKG	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene and activators in abscisic acid signaling
	MYBPLANT	2	MACCWAMC	MYB binding site, regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis
	MYBPZM	1	CCWACC	Activating a flavonoid biosynthetic gene subset
	MYB1LEPR	3	GTTAGTT	Defence-related gene expression
	MYBGAHV	3	TAACAAA	Central element of gibberellin (GA) response complex (GARC)
	MYBATRD22	1	CTAACCA	MYB binding site in dehydration-responsive genes and regulation of abscisic acid-induced transcription
<b>W-Box</b>	WBOXATNPR1	9	TTGAC	Recognized specifically by salicylic acid (SA)-induced WRKY DNA binding proteins
	WRKY71OS	29	TGAC	Transcriptional repressor of the gibberellin and abscisic acid signaling pathways
	WBOXPCWRKY1	1	TTTGACY	"WB box"; WRKY proteins bind specifically to the DNA sequence
	WBOXERF	18	TGACY	ERF-metilated under phosphate starvation/ Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene
<b>Others</b>	ARR1AT	42	NGATT	Hormonal control of gene expression, responsive to cytokinin
	ABRERATCAL	2	MACGYGB	Ca(2+)-responsive upregulated genes
	GT1GMSCAM4	11	GAAAAA	Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter
	GT1CONSENSUS	34	GRWAAW	Influences the level of SA-inducible gene expression
	SEBFCONSSTPR10A	1	YTGTCWC	Pathogenesis-related gene
<b>Symbiosis</b>				
<b>Nodulins</b>	NODCON2GM	14	CTCTT	<i>cis</i> -acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters.
	NODCON1GM	8	AAAGAT	<i>cis</i> -acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters.
<b>OSE</b>	OSE1ROOTNODULE	8	AAAGAT	Infected cells of root nodules, in promoter of the leghaemoglobin gene in arbuscule-containing cells
	OSE2ROOTNODULE	14	CTCTT	Infected cells of root nodules, in promoter of the leghaemoglobin gene in arbuscule-containing cells
<b>Phosphate</b>				
<b>MYB</b>	<b>P1BS</b>	<b>2</b>	<b>GNATATNC</b>	<b>PHR1-binding sequence found in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes</b>
<b>bHLH</b>	x-loop-helix / CATATGGMS/	1	CATATG	Pi-responsive / Involved in auxin responsiveness
	Helix-loop-helix	1	CATCTG	Pi-responsive
<b>E-box</b>	EBOXBNNAPA	17	CANNTG	Large fraction of the identified Pi response regulators are members of the basic-helix-loop-helix
	YRIMIDINEBOXOSRAMY1A	3	CCTTTT	Gibberellin-response cis-element of GARE and pyrimidine box
	CACGTMOTIF (PHO)	1	CACGTG	Abscisic acid-induced
<b>Others</b>	PHO-like	1	CTTGTGG	Pi-responsive
	TATA box like	1	TATAAATA	Pi-responsive
	NIT 2-like / EVENINGAT	1	AAAATATCT	Pi-responsive / circadian control of gene expression

**Tabla Suplementaria S3: Elementos reguladores *cis* identificados en la región promotora de *PvRIC2***

	Cis-element	Count	Consensus Sequence	Description
<b>Hormones</b>				
	MYB1AT	6	WAACCA	Transcriptional activators in abscisic acid signaling
	MYBST1	3	GGATA	MybSt1 (a potato MYB homolog) binding site, transcriptional activator
	MYBCORE	6	CNGTTR	Regulation of flavonoid biosynthesis
	MYBCOREATCYCB1	3	AACGG	Myb core able to activate reporter gene without leading to M-phase-specific expression
<b>MYB</b>	MYB2CONSENSUSAT	3	YAACKG	MYB recognition site found in the promoters of the dehydration-responsive gene and activators in abscisic acid signaling
	MYBPLANT	1	MACCWAMC	MYB binding site, regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis
	MYBPZM	2	CCWACC	Activating a flavonoid biosynthetic gene subset
	MYB1LEPR	1	GTTAGTT	Defence-related gene expression
	MYBGAHV	4	TAACAAA	Central element of gibberellin (GA) response complex (GARC)
	WBOXATNPR1	5	TTGAC	Recognized specifically by salicylic acid (SA)-induced WRKY DNA binding proteins
<b>W-Box</b>	WRKY71OS	14	TGAC	Transcriptional repressor of the gibberellin and abscisic acid signaling pathways
	WBBOXPCWRKY1	1	TTTGACY	"WB box"; WRKY proteins bind specifically to the DNA sequence
	ARR1AT	49	NGATT	Hormonal control of gene expression, responsive to cytokinin
	ABRERATCAL	2	MACGYGB	Ca(2+)-responsive upregulated genes
<b>Others</b>	GT1GMSCAM4	11	GAAAAA	Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter
	GT1CONSENSUS	34	GRWAAW	Influences the level of SA-inducible gene expression
	SEBFCONSSTPR10A	1	YTGTCWC	Pathogenesis-related gene
<b>Symbiosis</b>				
<b>Nodulins</b>	NODCON2GM	8	CTCT	<i>cis</i> -acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters.
	NODCON1GM	4	AAAGAT	<i>cis</i> -acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc3 and N23 gene promoters.
<b>OSE</b>	OSE1ROOTNODULE	4	AAAGAT	Infected cells of root nodules, in promoter of the leghaemoglobin gene in arbuscule-containing cells
	OSE2ROOTNODULE	8	CTCT	In infected cells of root nodules, in promoter of the leghaemoglobin gene in arbuscule-containing cells
<b>Phosphate</b>				
<b>MYB</b>	<b>P1BS</b>	<b>1</b>	<b>GNATATNC</b>	<b>PHR1-binding sequence found in the upstream regions of phosphate starvation responsive genes</b>
	EBOXBNNAPA	14	CANNTG	Large fraction of the identified Pi response regulators are members of the basic-helix-loop-helix
<b>E-box</b>	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	4	CCTTTT	Gibberellin-response cis-element of GARE and pyrimidine box
	TATA box like	1	TATAAATA	Pi-responsive
<b>Others</b>	NIT 2-like / EVENINGAT	1	AAAATATCT	Pi-responsive / circadian control of gene expression

## **12.Anexo**

# Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway

Maríel C. Isidra-Arellano<sup>1,2,\*</sup>, Eithan A. Pozas-Rodríguez<sup>1</sup>, María del Rocío Reyero-Saavedra<sup>1</sup>, Jazmin Arroyo-Canales<sup>1</sup>, Susana Ferrer-Organ<sup>1</sup>, María del Socorro Sánchez-Correa<sup>1</sup>, Luis Cardenas<sup>3</sup>, Alejandra A. Covarrubias<sup>3</sup>  and Oswaldo Valdés-López<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, México,

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico City 04510, Mexico, and

<sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received 28 January 2020; revised 15 April 2020; accepted 21 April 2020; published online 28 April 2020.

\*For correspondence (e-mail oswaldovaldesl@unam.mx; carolina\_iarellano@comunidad.unam.mx).

## SUMMARY

Inhibition of nodule development is one of the main adverse effects of phosphate (Pi) deficiency in legumes. Despite all of the efforts made over the last decades to understand how root nodules cope with Pi deficiency, the molecular mechanisms leading to the reduction in nodule number under Pi deficiency remain elusive. In the present study, we provide experimental evidence indicating that Pi deficiency activates the autoregulation of nodulation (AON) pathway, leading to a reduction in nodule numbers in both common bean and soybean. A transcriptional profile analysis revealed that the expression of the AON-related genes *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML* is upregulated under Pi deficiency conditions. The downregulation of the MYB transcription factor *PvPHR1* in common bean roots significantly reduced the expression of these four AON-related genes. Physiological analyses indicated that Pi deficiency does not affect the establishment of the root nodule symbiosis in the supernodulation mutant lines *Pvnark* and *Gmnark*. Reciprocal grafting and split-roots analyses determined that the activation of the AON pathway was required for the inhibitory effect of Pi deficiency. Altogether, these data improve our understanding of the genetic mechanisms controlling the establishment of the root nodule symbiosis under Pi deficiency.

**Keywords:** rhizobia-induced CLE peptides, Pi scarcity, NARK receptor, root nodule symbiosis, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*.

## INTRODUCTION

Legumes are able to engage in symbiosis with nitrogen-fixing soil bacteria collectively known as rhizobia. This symbiosis not only allows legume crops to grow with little to no nitrogen fertilizer inputs, but also replenishes the soil with fixed nitrogen (e.g. ammonium) for subsequent crops through crop rotation (Castro-Guerrero *et al.*, 2016; Ferguson *et al.*, 2019a).

To establish the root nodule symbiosis, a mutual recognition between legumes and rhizobia is required (Venkateshwaran *et al.*, 2013). This process begins with the detection by the compatible rhizobia of flavones and isoflavones released by the legume host (Liu and Murray, 2016). In response, rhizobia produce nodulation factors (NF), which are perceived by the legume host through LysM receptor-like kinases (Dénarié *et al.*, 1996; Radutoiu *et al.*,

2003; Broghammer *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2018). NF perception triggers the activation of the 'common symbiosis pathway' that controls the establishment of both root nodulation and the arbuscular mycorrhizal symbiosis (Venkateshwaran *et al.*, 2013; Wang and Zhu, 2018). One of the critical components of the common symbiosis pathway is the rapid and sustained oscillation of the nuclear and perinuclear calcium concentration described as calcium spiking (Ehrhardt *et al.*, 1996; Kosuta *et al.*, 2008; Sieberer *et al.*, 2009). The decoding of calcium spiking leads to the activation of a set of transcription factors, among them nodule inception (NIN) (Genre and Russo, 2016). NIN controls the expression of genes participating in rhizobial infection, nodule development, as well as in the regulation of nodule number (Soyano *et al.*, 2013, 2014; Vernié *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019a,b). Recently, it was demonstrated in

*Medicago truncatula* that NIN has an approximately 20-kb promoter region that contains several *cis*-regulatory elements essential for coordinating its participation in each stage of the root nodule symbiosis (Liu *et al.*, 2019b).

Symbiotic nitrogen fixation is an energy demanding process for the legume host. Because of the high carbon demand, legumes tightly regulate the number of infections and therefore the number of nodules per plant (Ferguson *et al.*, 2019b). The optimal number of nodules is maintained through a sophisticated long-distance signaling process termed autoregulation of nodulation (AON) (Kosslak and Bohlool, 1984; Suzuki *et al.*, 2008). AON begins with the production of root-derived rhizobia-induced CLAVATA3/endosperm surrounding region-related (CLE) peptides, named RIC1 and RIC2 in common bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) (Reid *et al.*, 2011; Ferguson *et al.*, 2014), MtCLE12 and MtCLE13 in *Medicago truncatula* (Mortier *et al.*, 2010), and LjCLE-RS1 and LjCLE-RS2 in *Lotus japonicus* (Okamoto *et al.*, 2009). These two CLE peptides are produced upon the first rhizobia-induced cortical cell division and throughout nodule development and symbiotic nitrogen fixation (Lim *et al.*, 2011; Yoro *et al.*, 2019). The transcriptional activation of these two CLE peptides is tightly regulated by the interplay of the transcription factors NIN and nodule number control 1 (NNC1), as well as by the microRNA miR172c, and all together form an important part of the AON pathway (Soyano *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019).

CLE peptides RIC1/MtCLE12/LjCLE-RS1 and RIC2/MtCLE13/LjCLE-RS2 are post-translationally arabinosylated by the enzyme PLENTY in *L. japonicus* and ROOT DETERMINED NODULATION 1 (RND1) in *M. truncatula* (Schnabel *et al.*, 2011; Kassaw *et al.*, 2017; Yoro *et al.*, 2019a). Upon arabinosylation, these small peptides are transported from the root to the shoot through xylem, where they are detected by the nodule autoregulation receptor (NARK) in common bean and soybean, (Searle *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2014), the super numeric nodules (SUNN) receptor in *M. truncatula* (Schnabel *et al.*, 2005) and the hypernodulation aberrant root formation (HAR1) and KLAVER receptors in *L. japonicus* (Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2010). Upon perception of these two CLE peptides, a signaling pathway to generate a shoot-derived signal (e.g. miR2111 and cytokinins) is activated. Shoot-derived signals are then transported to the root to inhibit further nodule development (Tsikou *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2019b). Some of the components of this signaling pathway include the miRNA miR2111 and the kelch repeat-containing F-box protein Too Much Love (TML) (Takahara *et al.*, 2013; Tsikou *et al.*, 2018). The knockout mutants *nark/sunn/har1*, *tml* and transgenic plants overexpressing the miRNA miR2111 show a supernodulation phenotype, indicating that these genetic components are crucial for maintaining an optimal number of nodules

(Krusell *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2002; Searle *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2005; Takahara *et al.*, 2013; Tsikou *et al.*, 2018). However, the AON not only restricts nodule development, but also subsequent rhizobial infections (Yoro *et al.*, 2019b). The cytokinin receptor LHK1 acts synergistically with the receptor HAR1 to regulate root susceptibility to rhizobial infection in *L. japonicus*; the interplay of local and systemic pathways is therefore critical for modulating the optimal number of nodules (Miri *et al.*, 2019).

Most arable soils around the world have sub-optimal levels of phosphorus, an essential macronutrient required for optimal plant growth, development, and yield. Legumes, similar to other land plants, exclusively take up phosphorus from the soil as inorganic phosphate (i.e. orthophosphate; Pi) (Broughton *et al.*, 2003; Valdés-López and Hernández, 2008). However, soil Pi rapidly interacts with other ions to form complexes making Pi unavailable for plant uptake (Vance *et al.*, 2003). Pi deficiency constrains plant growth and productivity and, in legumes, it significantly reduces the number of nodules, as well as nitrogen fixation itself (Hernández *et al.*, 2009).

Because Pi deficiency strongly reduces legume growth and yield, significant efforts have been made to understand how legumes cope with this limitation, at the same time as symbiotically interacting with rhizobia (Chen *et al.*, 2011; Suleiman *et al.*, 2013; Cabeza *et al.*, 2014; Nasr Esfahani *et al.*, 2017). Physiological studies in different legumes indicate that, under Pi deficiency, Pi is preferentially relocated from other organs to nodules (Hernández *et al.*, 2009; Cabeza *et al.*, 2014; Nasr Esfahani *et al.*, 2017). Additionally, transcriptional and proteomic studies have demonstrated that most of the molecular responses of Pi-deficient root nodules are oriented to efficient Pi use (Suleiman *et al.*, 2019).

Despite all of the efforts aiming to understand how root nodules cope with Pi deficiency, the molecular mechanisms leading to a reduction in nodule number under Pi deficiency remain elusive. We previously demonstrated that Pi deficiency negatively affects the early symbiotic events (i.e. expression of symbiosis-related genes and infection thread formation) that are crucial for establishing root nodule symbiosis in common bean (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). We also observed that *PvRIC1* and *PvRIC2* expression was always higher in rhizobia-inoculated common bean plants when grown under low-Pi conditions. Thus, we hypothesize that AON might play a role in the regulation of root nodule symbiosis under Pi deficiency.

In the present study, we provide evidence indicating that Pi deficiency triggers a systemic, shoot-controlled, and NARK-dependent mechanism that negatively affects nodule development in both common bean and soybean. An expression profile analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis revealed that the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2* is upregulated under Pi

deficiency conditions in the absence of rhizobia, and their transcriptional activation is likely dependent on the MYB transcription factor PHOSPHATE STARVATION1 (PHR1), a master regulator of the plant response to Pi deficit. Pi deficiency did not reduce the number of rhizobia-induced root hair deformation events or the number of nodules in the supernodulation mutant lines *Pvnark* and *Gmnark*, which are unable to detect RIC1 and RIC2 peptides. Further reciprocal grafting and split-roots analyses determined that the activation of the AON pathway was crucial for facilitating the inhibitory effect of Pi deficiency. The data presented shed light on the genetic mechanisms underlying the establishment and regulation of the root nodule symbiosis under Pi deficiency conditions.

## RESULTS

### Pi deficiency activates the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2* in the absence of rhizobia

The expression of *RIC1/MtCLE12/LjCLE-RS1* and *RIC2/MtCLE13/LjCLE-RS2* is activated upon the first rhizobia-induced cortical cell division (Lim *et al.*, 2011). Intriguingly, when comparing the expression of these two AON-related genes in common bean seedlings growing under optimal-Pi or low-Pi conditions and inoculated with rhizobia, both *PvRIC1* and *PvRIC2* were highly expressed in Pi-deficient common bean seedlings (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). We hypothesized that Pi deficiency might activate the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2*. To test this hypothesis, we first evaluated the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2* in Pi-deficient common bean seedlings in the absence of rhizobia. The expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2* increased four-fold in Pi-deficient common bean seedlings (Figure 1a,b). By contrast, neither nitrogen deficiency, nor iron deficiency activated the expression of either *PvRIC1* or *PvRIC2* (Figure S1), suggesting that, in the absence of rhizobia, the activation of these two AON-related genes may be specific to Pi deficiency. The regulation of *PvRIC1* and *PvRIC2* expression by Pi availability was further evaluated by resupplying Pi to Pi-deficient common bean seedlings. When we resupplied 1 mM Pi to Pi-deficient seedlings for 24 h, transcript levels of both genes returned to the basal levels observed in control seedlings growing under optimal-Pi conditions (Figure 1a,b). Altogether, our data indicate that Pi deficiency activates the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2* in common bean.

### *PvRIC1* and *PvRIC2* promoters contain Pi-deficiency-related cis-regulatory elements

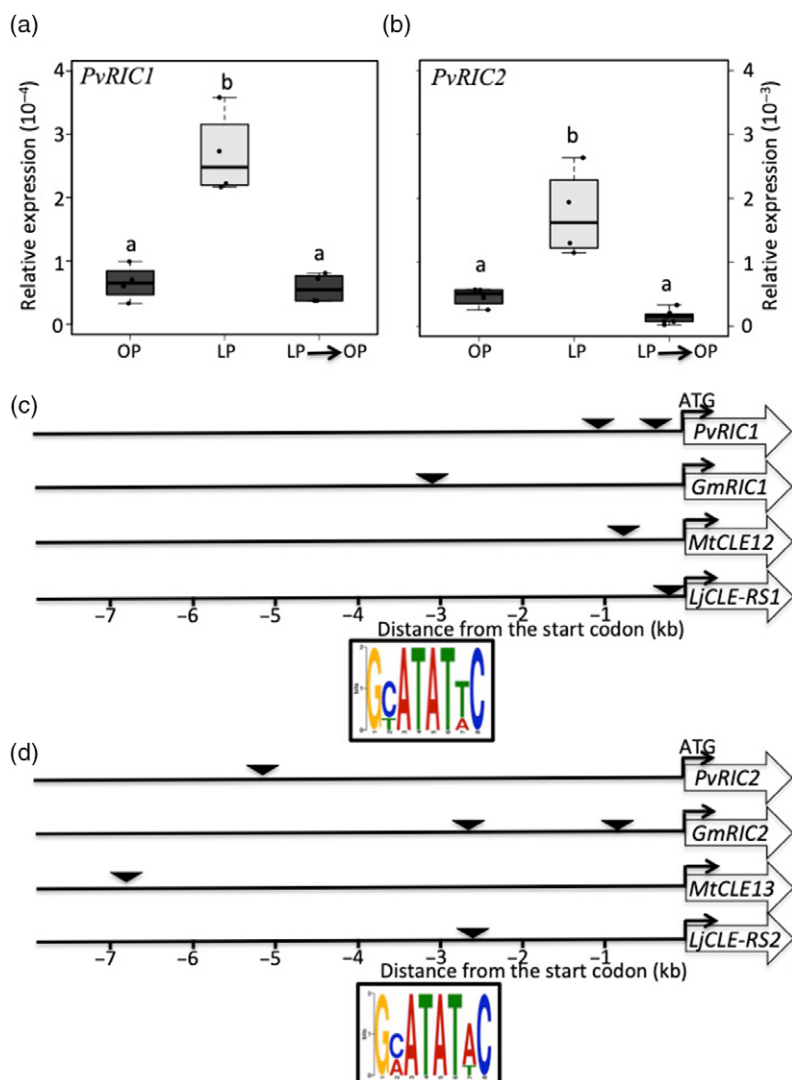
To gain further insights into the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2*, we performed an *in silico* analysis on the promoter region of these two AON-related genes. Accordingly, we searched for known cis-regulatory elements in 7-kb promoter regions, which did not contain any coding sequence

from upstream gene, of both *PvRIC1* and *PvRIC2* using the publicly available plant cis-database New PLACE (Higo *et al.*, 1999). This analysis identified different potential cis-regulatory elements in the promoter regions of these two genes (Table S1). Among them, the cis-regulatory element P1BS with the consensus sequence GNATATNC attracted our attention because it has been found in promoter regions of several Pi-deficiency responsive genes (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2007; Sobkowiak *et al.*, 2012). We identified two putative P1BS cis-regulatory elements; the first one located between base pairs –299 and –306, and the second one located between base pairs –1018 and –1025 upstream of the *PvRIC1* start codon (Figure 1c). By contrast, we identified a single putative P1BS cis-regulatory element located between base pairs –5145 and –5152 upstream of the *PvRIC2* translation initiation codon (Figure 1d). Further *in silico* analyses revealed that the putative P1BS cis-regulatory element is conserved in the promoter regions of the *PvRIC1* and *PvRIC2* orthologs in *G. max*, *M. truncatula*, and *L. japonicus* (Figure 1c,d). Unlike *PvRIC1* and *GmRIC2*, which both appear to contain two P1BS cis-regulatory elements, the promoter regions of *GmRIC1*, *MtCLE12*, *LjCLE-RS1*, *PvRIC2*, *MtCLE13*, and *LjCLE-RS2* appear to contain only one putative single P1BS cis-regulatory element (Figure 1c,d).

### *PvRIC1* is expressed in root pericycle cells in response to Pi deficiency

*RIC* genes are expressed in root pericycle cells and outer cortex cells in response to rhizobia (Lim *et al.*, 2011; Soyano *et al.*, 2014). Although Pi-deficiency activated the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2*, these data do not provide insight into the spatiotemporal expression of these AON-related genes in response to Pi-deficient conditions. To evaluate the spatiotemporal expression of *PvRIC1* in response to Pi deficiency, we cloned a 1.7-kb fragment of the *PvRIC1* promoter (*pPvRIC1*), which contains the two predicted P1BS cis-regulatory elements and generated a transcriptional fusion to the *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase) coding sequence. We were unable to clone the promoter region corresponding to *PvRIC2*, and, thus, we only included *pPvRIC1* for further analysis. The *pPvRIC1::GUS* construct was transfected into *P. vulgaris* through the *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method, and composite plants were treated with 1 mM Pi (Optimal-Pi conditions) or 5  $\mu$ M Pi (Low-Pi conditions) for 3 days. We observed no GUS activity in transgenic roots expressing either the empty vector or *pPvRIC1::GUS* construct growing under optimal-Pi conditions, indicating that, under normal growth conditions, the promoter is not active (Figure 2).

By contrast, 48 of 50 roots transformed with *pPvRIC1::GUS* and growing under low-Pi conditions displayed a strong GUS signal in the pericycle cells, whereas the other two roots showed GUS signal throughout the vascular



**Figure 1.** Phosphate (Pi) deficiency activates the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2*, for which the promoter regions possess putative P1BS *cis*-regulatory elements.

Expression levels of *PvRIC1* (a) and *PvRIC2* (b) in response to Pi deficiency in common bean roots. Expression levels of both *PvRIC1* and *PvRIC2* were also evaluated in roots of Pi-resupplied (LP→OP) common bean seedlings (a-b). OP, optimal-Pi conditions; LP, low-Pi conditions. Box plots represent the first and third quartile (horizontal box sides), minimum and maximum (outside whiskers). Data shown were obtained from five independent biological replicates. One-way analysis of variance, followed by Tukey's honestly significant difference test, was performed ( $P < 0.01$ ). Statistical classes sharing a lowercase letter are not significantly different. (c) Putative P1BS *cis*-regulatory elements in the promoter regions of *PvRIC1* and in its orthologous genes in *Glycine max* (*GmRIC1*), *Medicago truncatula* (*MtCLE12*), and *Lotus japonicus* (*LjCLE-RS1*). (d) Putative P1BS *cis*-regulatory elements in the promoter regions of *PvRIC2* and in its orthologous genes in *G. max* (*GmRIC2*), *M. truncatula* (*MtCLE13*), and *L. japonicus* (*LjCLE-RS2*).

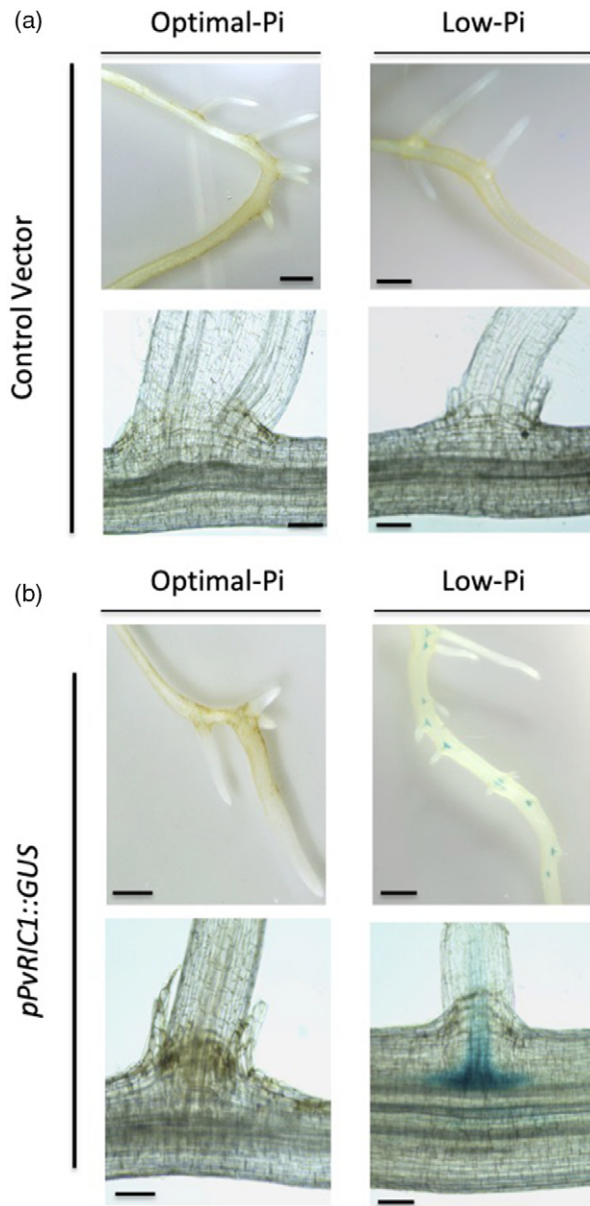
system (Figure 2b and Figure S2). This expression pattern was observed neither in nitrogen-deficient composite plants, nor iron-deficient composite plants, confirming that, in the absence of rhizobia, the activation of *PvRIC1* is specific to Pi-deficient conditions (Figure S3). In summary, these results indicate that *PvRIC1* is expressed in the pericycle cells of Pi-deficient common bean roots. Furthermore, they indicate that the spatiotemporal expression of *PvRIC1* in response to Pi deficiency is similar to the expression pattern reported for this AON-related gene in response to rhizobia in soybean and *L. japonicus* (Lim *et al.*, 2011; Soyano *et al.*, 2014).

#### Gene silencing of the MYB transcription factor *PvPHR1* reduces the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2*

The MYB transcription factor PHR1 acts as a master regulator of Pi sensing and signaling in different plant species, including common bean (Rubio *et al.*, 2001; Valdés-López

*et al.*, 2008). In response to Pi deficiency, PHR1 activates the expression of the majority of Pi starvation-induced (PSI) genes (e.g. *IPS1*) via direct binding to the P1BS *cis*-regulatory element (Bustos *et al.*, 2010; Puga *et al.*, 2014). The fact that Pi deficiency upregulates the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2*, and that the promoter region of these two AON-related genes contains at least one putative P1BS *cis*-regulatory element, led us to suggest that the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2* might be regulated by *PvPHR1*. To test this hypothesis, we generated an RNA interference (RNAi) construct targeting *PvPHR1* (*PvPHR1-RNAi*) and used *A. rhizogenes*-mediated transformation to silence *PvPHR1* in the roots of *P. vulgaris*. The expression of *PvPHR1* in *P. vulgaris* transgenic roots expressing the RNAi construct was reduced on average by 85% compared to the roots transformed with a control vector (Figure 3a). To confirm the efficiency of *PvPHR1* silencing, we first evaluated the expression of *PvIPS1*, a PSI gene that is directly





**Figure 2.** *PvRIC1* is expressed in root pericycle cells in response to phosphate (Pi) deficiency.

Common bean composite plants with transgenic roots expressing either the control vector (a) or the construct *pPvRIC1::GUS::GFP* (b) were grown under optimal- or low-phosphate conditions for 3 days. Upon Pi treatments, transgenic roots showing fluorescence were collected and stained for 3 h at 37°C. Forty-eight out of 50 transgenic roots expressing the *pPvRIC1::GUS* construct and growing under low-Pi conditions displayed a strong GUS signal in the pericycle cells (b), whereas the other two transgenic roots showed a GUS signal in throughout the vascular system (Figure S2). Scale bars shown in the top images of each panel represent 500  $\mu\text{m}$ , whereas those shown in the bottom images of each panel represent 100  $\mu\text{m}$ . Images shown are representative of five biological replicates, each containing ten transgenic roots.

regulated by *PvPHR1* (Valdés-López *et al.*, 2008). As expected, the expression of *PvIPS1* in *P. vulgaris* transgenic roots expressing the *PvPHR1-RNAi* construct was

reduced on average by 80% compared to the control-vector (control) transgenic roots (Figure 3b).

After confirming that the gene silencing of *PvPHR1* affects the expression of *PvIPS1*, we then evaluated the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2* in transgenic roots, expressing the *PvPHR1-RNAi* construct or a control vector, growing under optimal-Pi or low-Pi conditions in the absence of rhizobia. Gene silencing of *PvPHR1* significantly decreased the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2* (Figure 3c, d). Altogether, these data suggest that *PvPHR1* likely regulates the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2* under Pi-deficient conditions.

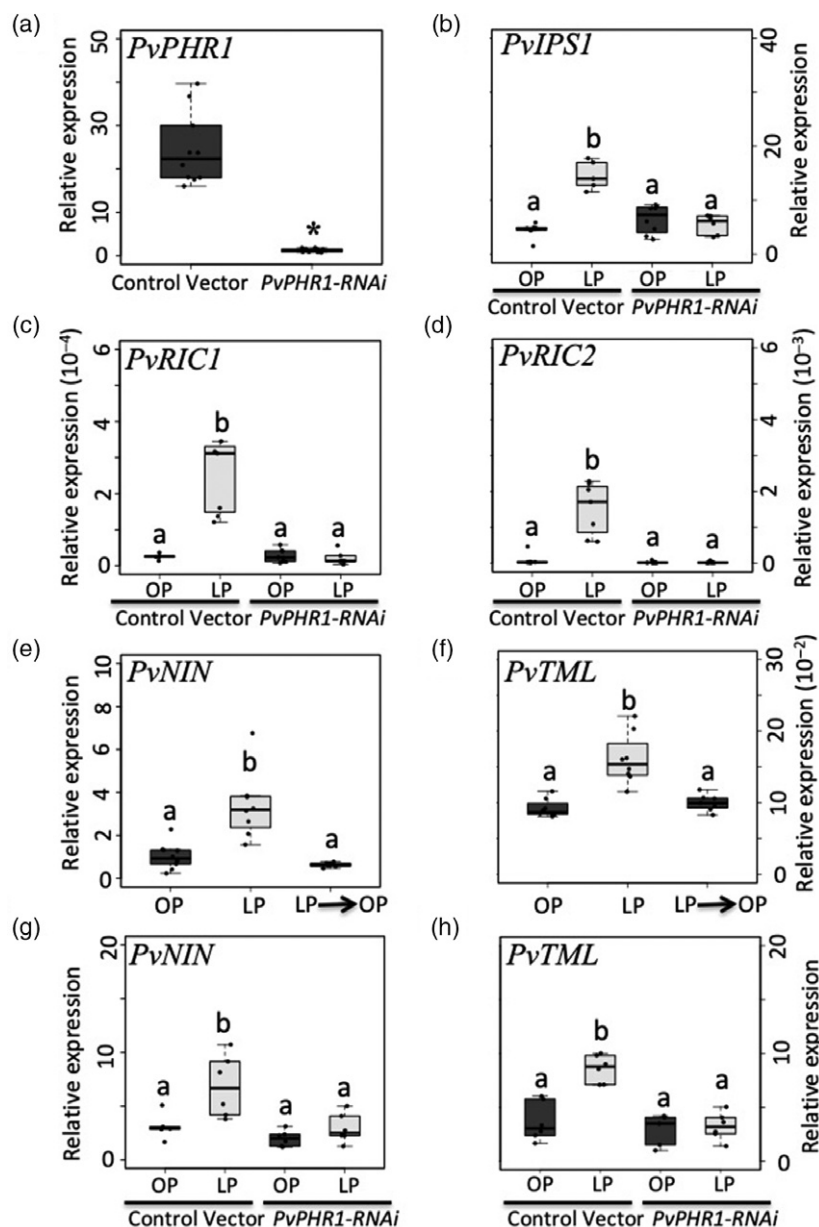
#### Pi deficiency activates the expression of both *PvNIN* and *PvTML*

The transcription factor *NIN* activates the expression of both *LjCLE-RS1* and *LjCLE-RS2* in response to rhizobia in *L. japonicus* (Soyano *et al.*, 2014). Likewise, it is widely accepted that upon detection of *RIC* peptides, the expression of *TML* is activated in the root cortical cells (Takahara *et al.*, 2013). Because the results of our study indicate that Pi deficiency activates the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2*, we hypothesized that Pi deficiency might also activate the expression of both *PvNIN* and *PvTML*. To test this hypothesis, we assessed the expression of *PvNIN* and *PvTML* in Pi-deficient common bean plants in the absence of rhizobia. This transcriptional analysis indicated that the expression of *PvNIN* and *PvTML* was upregulated in Pi-deficient common bean plants (Figure 3e,f). Interestingly, when we resupplied 1 mM Pi to Pi-deficient seedlings for 24 h, we observed that transcript levels of both AON-related genes returned to the basal levels observed in control seedlings growing under optimal-Pi conditions (Figure 3e,f).

The fact that the gene silencing of *PvPHR1* diminished the expression of both *PvRIC1* and *PvRIC2* prompted us to assess the expression of these two AON-related genes in *PvPHR1-RNAi* transgenic roots. This transcriptional analysis indicated that the expression of both *PvNIN* and *PvTML* was significantly reduced in *PvPHR1-RNAi* transgenic roots compared to transgenic roots expressing the control vector (Figure 3g,h). Altogether, our data indicate that Pi deficiency activates the expression of critical components of the AON pathway and that the activation of this pathway is likely dependent on the transcription factor *PvPHR1*.

#### Pi deficiency does not affect the establishment of the root nodule symbiosis in supernodulation *nark* mutant plants

The reduction of nodule number per root system is one of the adverse effects of Pi deficiency in many legumes, including common bean (Hernández *et al.*, 2009). Pi deficiency reduces the number of rhizobia-induced root hair deformations, an early response required for rhizobial infection, in common bean (Isidra-Arellano *et al.*, 2018).



**Figure 3.** Downregulation of *PvPHR1* reduces the activation of autoregulation of nodulation (AON)-related genes.

(a) Gene silencing levels of *PvPHR1* in common bean transgenic roots. Expression levels of *PvIPS1* (b), *PvRIC1* (c), *PvRIC2* (d), *PvNIN* (g), and *PvTML* (h) in common bean transgenic roots expressing either a control vector or the *PvPHR1*-RNAi construct. Common bean composite plants were grown under optimal-Pi (OP) or low-Pi (LP) conditions and in the absence of rhizobia. Expression levels of *PvNIN* (e) and *PvTML* (f) in response to phosphate (Pi) deficiency in common bean roots. Expression levels of both *PvNIN* and *PvTML* were also evaluated in roots of Pi-resupplied (LP→OP) common bean seedlings (e-f). Box plots represent the first and third quartile (horizontal box sides), minimum and maximum (outside whiskers). Data shown were obtained from six independent biological replicates, each containing ten transgenic roots from different composite plants. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference test, was performed ( $P < 0.01$ ). Statistical classes sharing a lowercase letter are not significantly different. The asterisk in (a) indicates a significant difference according to one-way ANOVA ( $P < 0.001$ ).

Because Pi deficiency affects early stages of the root nodule symbiosis (e.g. rhizobia-induced root hair deformation) and because it activates the expression of *PvRIC1* and *PvRIC2*, we further investigated whether this nutritional condition negatively affects the establishment of the root nodule symbiosis in common bean mutants unable to detect *PvRIC1* and *PvRIC2* peptides. Accordingly, we first evaluated the number of rhizobia-induced root hair deformation events occurring under Pi deficit in the common bean wild-type cultivar OAC Rico, as well as in its supernodulation *PvNARK* mutant line R32 (hereafter referred as *Pvnark* mutant), which is affected in the NARK receptor and hence unable to detect *PvRIC1* and *PvRIC2* peptides

(Ferguson *et al.*, 2014). As expected, common bean wild-type seedlings growing under low-Pi conditions developed 70% fewer rhizobia-induced root hair deformations than wild-type seedlings growing under optimal-Pi conditions (Figure 4a).

Interestingly, the *Pvnark* mutant seedlings growing under low-Pi conditions developed the same number of rhizobia-induced root hair deformations as *Pvnark* seedlings growing under optimal-Pi conditions (Figure 4a). We also evaluated this early symbiotic response in both wild-type and *nark* (*Gmnark*) soybean mutant seedlings growing under low-Pi conditions. Similar to the common bean *nark* mutants, soybean *nark* seedlings growing under

low-Pi conditions showed no reduction in the number of rhizobia-induced root hair deformations. By contrast, Pi-deficient wild-type soybean seedlings did (Figure 4c).

Next, we performed a nodulation assay on both common bean wild-type and *nark* common bean mutant plants growing under optimal-Pi or low-Pi conditions. As expected, Pi-deficient wild-type plants developed 50% fewer nodules than wild-type plants growing under optimal-Pi levels (Figure 4b). By contrast, Pi-deficient *nark* mutant plants developed the same number of nodules under optimal-Pi or low-Pi conditions (Figure 4b). Interestingly, a similar phenotype was also observed in soybean *nark* mutant plants growing under low-Pi conditions (Figure 4d). Altogether, our data suggest that the reduction in the number of nodules in Pi-deficient legumes might be the result of the activation of the AON pathway by Pi deficiency.

#### **Pi deficiency systemically reduces the number of nodules through the shoot**

To determine whether Pi deficiency reduces the number of nodules systemically, we developed split-roots to separate local from systemic responses in common bean plants (Figure 5a). For this assay, we simultaneously analyzed three conditions: one where one side of the split-root was grown under low-Pi conditions, and the other side was grown under optimal-Pi conditions, defined, respectively, as 'local' and 'systemic' response compartments. The other analyzed conditions were two homogeneous controls where both sides of the split-root system were either grown under optimal-Pi or low-Pi conditions (Figure 5a). To confirm that our experimental system yields Pi-deficient roots, we first monitored the expression of the Pi-responsive gene *PvIPS1* (Valdés-López *et al.*, 2008). As expected, we detected the upregulation of *PvIPS1* in roots growing under Pi-deficient conditions only (Figure 5b). Upon confirmation that our split-root system yielded Pi-deficient roots, we then evaluated the number of nodules. A similar number of nodules was observed on both sides of a split-root system when both sides were treated with the same Pi concentration (i.e. optimal-Pi or low-Pi conditions) (Figure 5c). Common bean plants with both sides under low-Pi conditions developed 50% fewer nodules than those with both sides growing under optimal-Pi conditions (Figure 5c). However, when one side of the split-root system was grown under low-Pi conditions and the other side was grown under optimal-Pi conditions, both sides developed significantly fewer nodules than those with both sides growing under optimal-Pi conditions (Figure 5c). We also performed a similar nodulation assay on soybean plants with the split-root system. Similar to common bean, when soybean plants with one side of the split-root system growing under low-Pi, and the other under optimal-Pi, both sides developed significantly fewer nodules than those

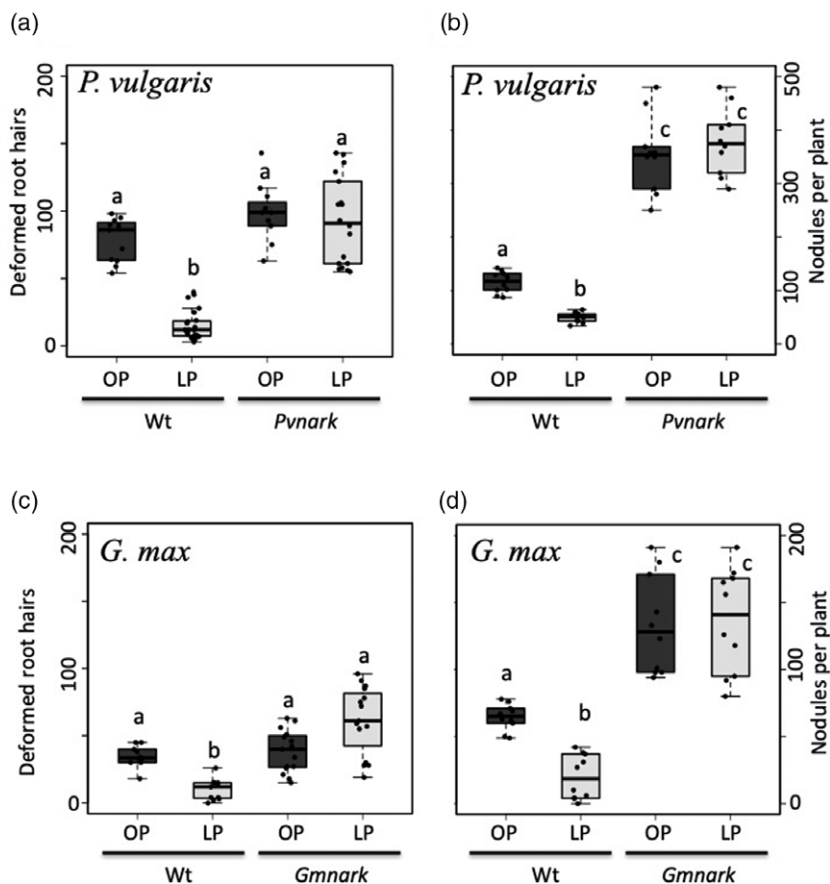
having both sides growing under optimal-Pi conditions (Figure 5d).

The fact that the number of nodules per root system was reduced when one side of the split-root was grown under low-Pi (local) conditions and the other side was grown under optimal-Pi (systemic) conditions led us to hypothesize that a root-derived systemic signal, likely RIC1 and RIC2, is activated in the Pi-deficient root system. The perception of RIC1 and RIC2 in the shoot could lead to the production of a shoot-derived signal that affects both sides of the split-root system, likely through activation of TML, a negative regulator of nodule development (Takahara *et al.*, 2013). To test this hypothesis, we analyzed the expression of *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML* in common bean plants using the split-root system. The expression of these four AON-related genes was upregulated in plants having both sides of the split-root system under low-Pi conditions (Figure 5e–h). Interestingly, when one side of the split-root system was grown under low-Pi conditions (local), and the other side is grown under optimal-Pi conditions (systemic), the expression of *PvNIN*, *PvRIC1*, and *PvRIC2* was upregulated in the Pi-deficient root system but not in the optimal-Pi root system, indicating that the expression of these three AON-related genes is locally activated in Pi-deficient roots only (Figure 5e–g). By contrast, the expression of *PvTML* was upregulated in both local and systemic compartments, which indicates that the expression of this AON-related gene is systemically activated (Figure 5h). Altogether, our data indicate that Pi deficiency inhibits nodulation systemically, likely through activation of the AON pathway.

#### **Pi deficiency inhibits nodule formation via the NARK receptor**

To further investigate the systemic effect of Pi deficiency on legume nodulation, we developed split-roots in both supernodulation *Pvnark* and *Gmnark* mutant plants (Carroll *et al.*, 1985; Ferguson *et al.*, 2014). We observed a similar number of nodules on both sides of a split-root system when both sides were treated with the same Pi concentration (i.e. optimal-Pi or low-Pi conditions) and when one side of the split-root system was grown under low-Pi conditions, and the other side experienced optimal-Pi conditions (Figure 6a,b). Thus, the negative effect of Pi deficiency on nodule formation was not observed in *nark* mutant plants, which also indicates that the perception of RIC1 and RIC2 is crucial for facilitating the inhibitory effect of Pi deficiency.

To further confirm the systemic effect of Pi deficiency on legume nodulation, we conducted a reciprocal grafting assay (Figure 6c). We used common bean and soybean wild-type lines, as well as the *Pvnark* and *Gmnark* mutant lines, to generate the reciprocal grafts indicated in Figure 6c. The grafted plants were inoculated with rhizobia and grown under optimal-Pi or low-Pi conditions. After



**Figure 4.** Phosphate (Pi) deficiency does not affect the establishment of root nodule symbiosis in *nark* mutant plants.

The number of rhizobia-induced deformed root hairs in the *Pvnark* (a) and *Gmnrk* (c) mutant plants. The number of nodules in *Pvnark* (b) and *Gmnrk* (d) mutant plants. *Phaseolus vulgaris* cultivar OAC Rico and *Glycine max* cultivar Bragg were used as wild-type (Wt) backgrounds. Data shown in (a) and (c) were obtained from 20 independent biological replicates, each including ten plants. Data shown in (b) and (d) were generated using four biological replicates, each containing five independent plants. OP, optimal-Pi conditions; LP, low-Pi conditions. One-way analysis of variance, followed by Tukey's honestly significant difference test, was performed ( $P < 0.01$ ). Statistical classes sharing a lowercase letter are not significantly different.

15 days of Pi deficit treatment, as expected, we observed a significant reduction in the number of nodules in both Wt (scion)/Wt(rootstock) and Wt(scion)/*nark*(rootstock) common bean and soybean grafted plants (Figure 6d,e). The inhibitory effect of Pi deficiency on the nodule formation was not observed in either *nark*(scion)/*nark*(rootstock) or *nark*(scion)/Wt(rootstock) grafted plants (Figure 6d,e). These data confirm that the perception of RIC1 and RIC2 by the NARK receptor in the shoot is required to activate the AON pathway and reduce the number of nodules under Pi-scarcity conditions.

## DISCUSSION

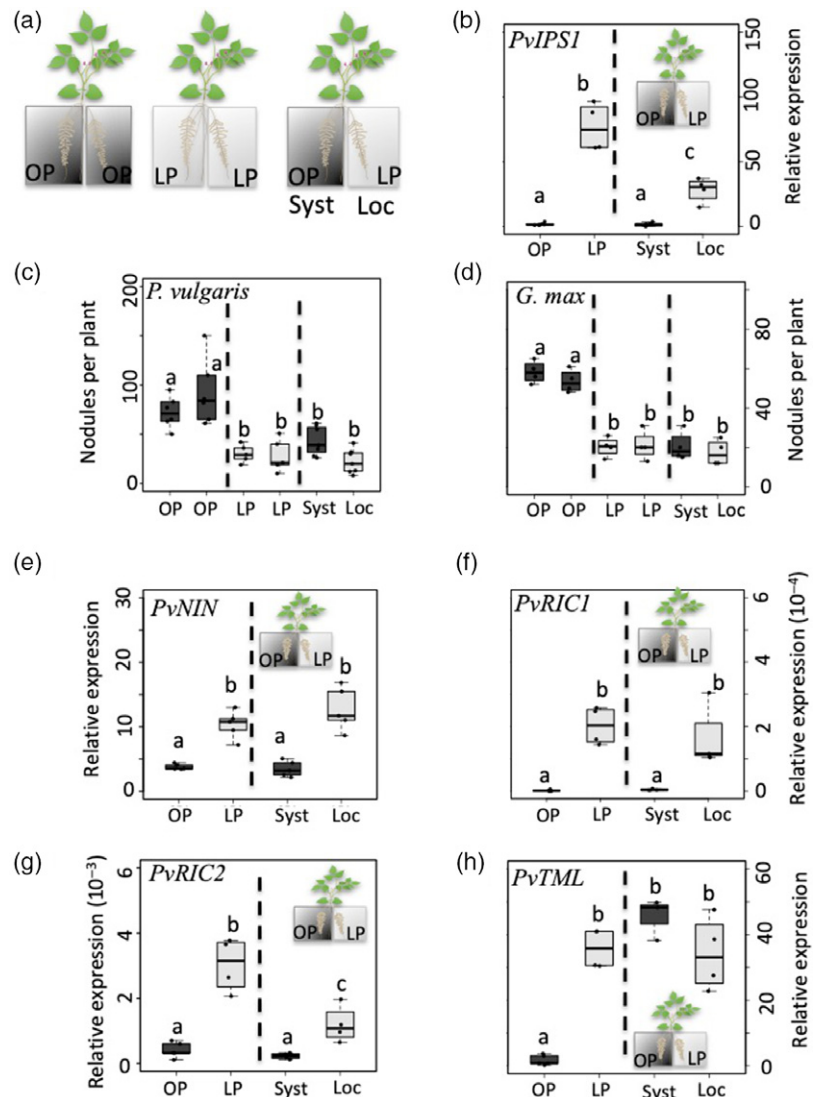
A reduction in nodule number is the main adverse effect of Pi deficiency in legumes (Hernández *et al.*, 2009). However, the genetic mechanisms underlying this negative effect remain elusive. Previously, we showed that Pi deficiency negatively affects critical early events of the root nodule symbiosis, including the expression of symbiosis-related genes and rhizobia-induced root hair deformation (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). In the present study, we provide different lines of evidence supporting the hypothesis that Pi deficiency activates the AON pathway, leading to a reduction in the number of nodules in both common bean and soybean.

Because of the high carbon cost of symbiotic nitrogen fixation, legumes tightly regulate the number of nodules per root system. This regulation is mediated by the AON pathway, which allows legumes to maintain a balance between the gains and the costs of root nodule symbiosis (Ferguson *et al.*, 2019). However, nodulation inhibition is also triggered by different environmental conditions, particularly nitrogen availability. Nitrogen availability inhibits the root nodule symbiosis through both AON-dependent and -independent mechanisms (Reid *et al.*, 2011; Nishida *et al.*, 2018). Until now, all of the available evidence indicates that the AON pathway is triggered upon the first rhizobia-induced cortical cell division and partially by high-nitrate concentrations (Lim *et al.*, 2011; Nishida *et al.*, 2018). In the present study, we provide evidence indicating that Pi deficiency systemically inhibits nodule formation through activation of the AON pathway. This conclusion is supported by the fact that this nutritional condition activates the expression of critical components of the AON pathway (e.g. *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML*), and that the inhibitory effect of Pi deficiency on nodule formation is dependent on NARK function in the shoot (Figure 7).

In the absence of rhizobia, Pi deficiency upregulates the expression of *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML*, which

**Figure 5.** Phosphate (Pi) deficiency systemically reduces the number of nodules.

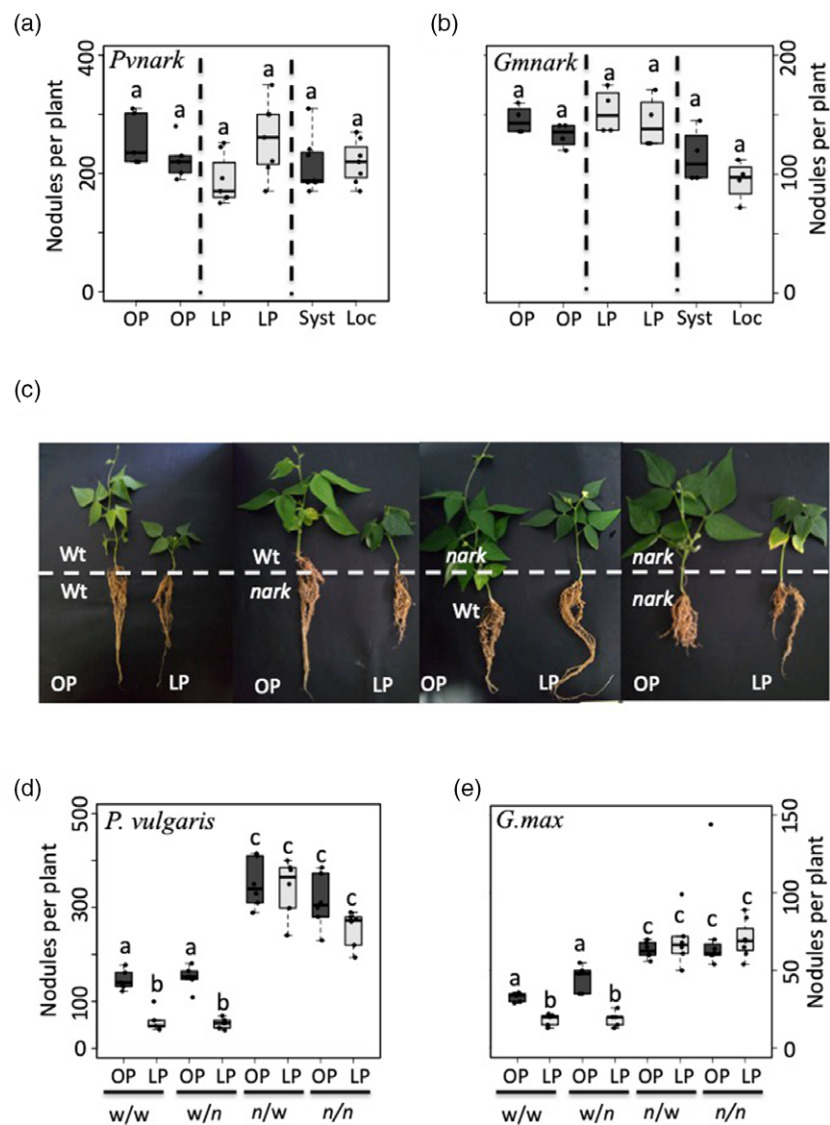
(a) Schematic representation of common bean or soybean plants with split-root system. Three experimental conditions were established: (i) Both sides of the split-roots were watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 1 mM  $\text{PO}_4$  (optimal-Pi: OP); (ii) both sides of the split-root system were watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 5  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4$  (low-Pi: LP); and (iii) one side of the split-root was watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 5  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4$  (low-Pi: LP) and it was designated as a 'local' (Loc) compartment, whereas the other side of the split-root system was watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 1 mM  $\text{PO}_4$  (optimal-Pi: OP) and was designated as a 'systemic' (Syst) compartment. Expression levels of *PvIPS1* (b), *PvNIN* (e), *PvRIC1* (f), *PvRIC2* (g), and *PvTML* (h) in common bean split-roots grown under OP or LP conditions. To evaluate the expression of these genes in plants with both sides of the root growing under OP or LP conditions, both sides of the roots were pooled, whereas for plants with one side of the root system growing under OP conditions and the other side growing under LP conditions, root systems were individually collected. The number of nodules was counted in common bean (c) and soybean (d) with split-roots growing under OP or LP conditions. Data were obtained from four biological replicates, each containing four different split-root plants. One-way analysis of variance, followed by Tukey's honestly significant difference test, was performed ( $P < 0.01$ ). Statistical classes sharing a lowercase letter are not significantly different.



are all critical components of the AON pathway (Ferguson *et al.*, 2019). One of the hallmarks of the Pi-deficit-responsive genes is the presence of the P1BS *cis*-regulatory element in their promoter region (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2007; Sobkowiak *et al.*, 2012). We found at least one putative P1BS *cis*-regulatory element in the promoter region of these AON-related genes (Figure 1b,c and Figure S4). Additionally, we observed that the expression levels of these AON-related genes returned to basal levels when 1 mM  $\text{PO}_4$  was resupplied to Pi-deficient plants. Hence, our data suggest that the activation of these AON-related genes could play a role in the adaptation of legumes to Pi-deficient conditions. One possible role for the activation of AON-related genes may be to pre-condition legumes to form fewer nodules under Pi-deficient conditions, and thereby, re-allocate carbon for root-Pi foraging, as suggested by Suleiman *et al.* (2019). This hypothesis is also in line with the fact that plant Pi status

regulates symbiosis with soil microbes, giving preference to microbes (e.g. arbuscular mycorrhizal fungi) that are able to provide Pi to the plant (Morcillo *et al.*, 2020). However, the precise role of these AON-related genes in the adaptation of legumes to Pi-deficient conditions must be investigated further.

Growing experimental evidence indicates that different CLE peptides play key roles in the plant adaptation to nutrient deficiency (Okamoto *et al.*, 2009; Funayama-Noguchi *et al.*, 2011; Araya *et al.*, 2014). For example, the expression of *LjCLE19* and *LjCLE20* is modulated by Pi availability in *L. japonicus* (Funayama-Noguchi *et al.*, 2011). However, the more compelling evidence is the finding that *CLE14* is highly induced in response to Pi scarcity and inhibits primary root growth by meristem exhaustion in *Arabidopsis thaliana* (Gutiérrez-Alanis *et al.*, 2017). In the present study, we provide evidence indicating that *PvRIC1* and *PvRIC2* are upregulated in response to Pi deficiency in the absence of



**Figure 6.** The negative effect of phosphate (Pi) deficiency on legume nodulation is nodule autoregulation receptor (NARK) dependent.

The number of nodules was counted in *Pvmark* (a) and *Gmmark* (b) mutant plants with both split-root systems growing under optimal-Pi (OP) conditions or low-Pi (LP) conditions, or with one side of the split-root system growing under LP (local: Loc) or OP (systemic: Syst) conditions. (c) Reciprocal grafting assay using common bean (var. OAC Rico) or soybean (var. Bragg) wild-type plants and the *Pvmark* and *Gmmark* mutant lines. The number of nodules was counted in common bean (d) and soybean (e) grafted plants. w, wild-type; n, nark. Data were obtained from four biological replicates, each containing four different split-root plants. One-way analysis of variance, followed by Tukey's honestly significant difference test, was performed ( $P < 0.01$ ). Statistical classes sharing a lowercase letter are not significantly different.

rhizobia. Although our data indicate that these two CLE peptides regulate the number of nodules in response to Pi deficiency, we do not exclude the possibility that they play additional roles in the adaptation of legumes to Pi scarcity under non-symbiotic conditions.

The MYB transcription factor PHR1 is a master regulator of the plant response to Pi deficiency (Bustos *et al.*, 2010; Puga *et al.*, 2014). PHR1 controls the expression of different genes involved in Pi uptake, Pi translocation from roots to shoots, and Pi homeostasis in many plants, including common bean (Valdés-López *et al.*, 2008). Until now, there was no available evidence indicating that PHR1 controls the expression of genes involved in the root nodule symbiosis, particularly in the activation of the AON pathway. Here, through gene silencing of *PvPHR1* in common bean transgenic roots, we have shown that *PvPHR1* might control the expression of

*PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML* under Pi-deficient conditions. This observation is in line with the fact that all of these AON-related genes possess at least one putative P1BS *cis*-regulatory element in their promoter region, and that PHR1 regulates the expression of Pi-deficiency responsive genes through the direct binding of the P1BS *cis*-regulatory element (Bustos *et al.*, 2010; Puga *et al.*, 2014). Hence, the transcription factor PHR1 may play a role in the regulation of the carbon demand related to root nodule symbiosis, likely through activation of the AON pathway, thereby controlling the formation of an optimal number of nodules that legumes can support under Pi-deficient conditions.

NIN activates the expression of *LjCLE-RS1* and *LjCLE-RS2*, the *PvRIC1*, and *PvRIC2* orthologs in *L. japonicus* (Soyano *et al.*, 2014). Because the results of the present study indicate that the promoter region of *PvNIN*

possesses two putative P1BS *cis*-regulatory element and that its expression is reduced in *PvPHR1-RNAi* transgenic roots (Figure 3g and Figure S2), we hypothesize that *PvPHR1* activates the expression of *PvNIN*, and then interplay between these two transcription factors is required to activate other components of the AON pathway. However, the potential interplay between *PvPHR1* and *PvNIN* needs to be validated experimentally.

Studies in different legumes indicate that NARK receptors, located on vascular tissue cells, are central components of the AON pathway (Miyazawa *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2019b). Here, through split-root and reciprocal grafting analyses, we demonstrated that the negative effect of Pi deficiency on nodule formation is NARK-dependent. We also provide evidence indicating that the AON pathway not only reduces the number of nodules in the Pi-deficient plant, but also restricts the number of rhizobial infections, which was reflected in a reduction in the number of rhizobia-induced root hair deformation events (Figure 4) (Isidra-Arellano *et al.*, 2018). Our data support early observations indicating that CLE-HAR1 signaling inhibits rhizobial infection in *L. japonicus* (Yoro *et al.*, 2019b). The fact that Pi deficiency induces the expression of critical components of the AON pathway, and also that the reduction of both rhizobia-induced root hair deformation events and number of nodules in Pi-deficient plants is NARK-dependent, is supportive of our hypothesis that the Pi deficit itself triggers the AON pathway and nodule limitation. Based on the data presented in the present study, we propose a mechanism of action, whereby the interplay between the transcription factors *PvNIN* and *PvPHR1* might play a crucial role in the activation of the AON pathway (Figure 7). However, further experimentation is needed to confirm this mechanism.

## Conclusions

The data reported in the present study led us to conclude that Pi deficiency inhibits the root nodule symbiosis in common bean and soybean through activation of the AON pathway. The activation of AON-related genes by *PvPHR1* under Pi deficit may be a critical legume response to limit the carbon demands of rhizobial symbiosis.

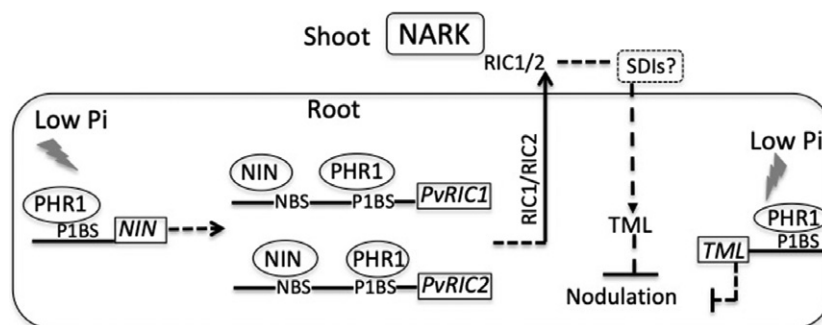
## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plant material

*Phaseolus vulgaris* wild-type cultivars, Negro Jamapa and OAC Rico; *G. max* wild-type cultivar, Bragg; the *P. vulgaris nark* mutant line R32 (developed in the OAC Rico cultivar; Park and Buttery, 1988, 1989; kindly provided by Dr Brett Ferguson, University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia); and the *G. max nark* mutant line nts1007 (developed in the Bragg cultivar; Carroll *et al.*, 1985; kindly provided by Dr Ramiro Lascano, Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, Argentina) were used in the present study. Seeds were surfaced sterilized as reported in Isidra-Arellano *et al.* (2018). Sterilized seeds were germinated for 2 days at 25°C in Petri dishes containing wet and sterile germination paper (Anchor PCO, St Paul, MN, USA). Petri dishes containing common bean or soybean seeds were kept in the dark at 25°C.

### Bacterial strains and culture conditions

*Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* USD110 strains were used to inoculate common bean and soybean seedlings, respectively. *Rhizobium tropici* cells were grown for 2 days at 30°C on PY medium (5 g L<sup>-1</sup> peptone; 3 g L<sup>-1</sup> yeast extract) supplemented with 0.7 M CaCl<sub>2</sub> and 20 µg ml<sup>-1</sup> nalidixic acid. *Bradyrhizobium diazoefficiens* cells were grown for 2 days at 30°C on YEM medium (10 g L<sup>-1</sup> mannitol, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 g L<sup>-1</sup> yeast extract, pH 7). After 2 days, *R. tropici* or *B. diazoefficiens* cells were harvested and resuspended in sterile water at OD<sub>600</sub> = 0.3. One milliliter of this bacterial suspension was used to individually inoculate common bean or soybean seedlings.



**Figure 7.** Proposed model of the activation of the autoregulation of nodulation (AON) pathway under phosphate (Pi)-deficient conditions.

Upon Pi-deficit sensing, it is likely that PHOSPHATE STARVATION1 (PHR1) directly binds to the promoter region of *NIN*. Once *NIN* is activated, a potential interplay between nodule inception (NIN) and PHR1 might be required to activate the expression of *RIC1* and *RIC2*. These two AON-related peptides are transported from the root to the shoot, where the nodule autoregulation receptor (NARK) receptor detects them. Upon *RIC1/2* perception, shoot-derived inhibitory signals (SDIs) are likely produced. The SDIs are transported to the root, where Too Much Love (TML) is activated, leading to the inhibition of further nodule development. Alternatively, Pi deficiency, through PHR1, might directly activate the expression of *TML* and contribute to the reduction of nodule number under this nutritional condition.

### Phosphate, iron, and nitrogen deficiency treatments

Two-day-old common bean seedlings were transferred into modified Fahræus medium plates (Catoira *et al.*, 2000) supplemented with 1 mM PO<sub>4</sub> (optimal-Pi conditions), 5 µM PO<sub>4</sub> (low-Pi conditions), 5 mM NH<sub>4</sub> (optimal-nitrogen conditions), 0.4 mM NH<sub>4</sub> (low-nitrogen conditions), 50 µM Fe<sup>3+</sup> (Optimal-Fe<sup>3+</sup> conditions) or 1 µM Fe<sup>3+</sup> (low-Fe<sup>3+</sup> conditions). Three days after, Pi, nitrogen or iron deficiency, the roots were harvested, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for total RNA extraction. Five biological replicates, each containing roots from five different seedlings, were generated independently.

### Pi deficiency and Pi replenishment assays

Two-day-old common bean seedlings were transferred into modified Fahræus medium plates (Catoira *et al.*, 2000) supplemented with 1 mM PO<sub>4</sub> (optimal-Pi conditions) or 5 µM PO<sub>4</sub> (low-Pi conditions). Three days after the onset of Pi deficiency, seedlings growing under optimal-Pi conditions were transferred onto new modified Fahræus medium plates supplemented with 1 mM PO<sub>4</sub> (control conditions). By contrast, seedlings growing under low-Pi conditions were transferred into a new modified Fahræus medium plates supplemented with 1 mM PO<sub>4</sub> (Pi-replenish conditions) or 5 µM PO<sub>4</sub> (non-Pi-replenish conditions). One day after Pi replenishment, roots were harvested, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used for total RNA extraction. Five biological replicates, each containing roots from three different seedlings, were independently generated.

### Grafting experiments

For reciprocal grafting experiments, surface-sterilized seeds of the *P. vulgaris* wild-type cultivar, OAC Rico, *G. max* wild-type cultivar, Bragg, and the *P. vulgaris* and *G. max nark* mutant lines were germinated for 2 days at 25°C in Petri dishes containing wet and sterile germination paper. Two-day-old seedlings were transferred into 1-L pots containing wet perlite. When seedlings were 7 days old and containing cotyledonary leaves, a 'V'-shaped notch was cut in the rootstock stem above the cotyledons. Then, a wedge-shaped scion was connected to the rootstock, and the junction was supported with a 2-cm long cotton cord. Grafted plants were kept under clear plastic bags and watered as necessary to maintain high humidity, which is critical for graft unions to form. After 7 days, plastic bags were removed, and plants were inoculated with 4 ml of rhizobia solution (OD<sub>600</sub> = 0.3). From 2 days post-inoculation, plants were watered every 2 days with Summerfield nutrient solution (Summerfield *et al.*, 1977) supplemented with 1 mM PO<sub>4</sub> (Optimal-Pi conditions) or 5 µM Pi (Low-Pi conditions). Fifteen days post-treatment, the number of nodules per plant was evaluated. For this experiment, the following reciprocal grafts were established: wild-type (scion)/wild-type (rootstock), *nark* (scion)/*nark* (rootstock), wild-type (scion)/*nark* (rootstock), and *nark* (scion)/wild-type (rootstock). For each reciprocal grafting, four biological replicates, each containing three different grafted plants, were independently generated.

### Split-root experiments

For split-root experiments, surface-sterilized seeds of the *P. vulgaris* wild-type cultivar OAC Rico and *G. max* wild-type cultivar Bragg were germinated for 2 days at 25°C in Petri dishes containing wet and sterile germination paper. After 2 days of germination, the root tip of each seedling was cut with a sterile scalpel blade and the

wounded zone was covered with a 100-µl pipette tip. The cut seedlings were immediately transferred onto modified Fahræus medium plates to encourage lateral root formation (Catoira *et al.*, 2000). After 3 days, seedlings with at least four lateral roots were used to establish the split-root system. To this end, two 0.5-L pots were joined, and the junction was transversally cut. Then, a seedling was placed in the transversally cut junction, and two lateral roots were placed in each 0.5-L pot. Finally, lateral roots were covered with wet perlite. Three days after transplanting, cotyledons of each plant were carefully removed, and the following treatments were established: (i) both root systems were watered with Summerfield nutrient solution (Summerfield *et al.*, 1977) supplemented with 1 mM Pi (Optimal-Pi conditions); (ii) both root systems were watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 0.5 µM Pi (Low-Pi conditions); and (iii) one root system was watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 1 mM Pi, and the other root system was watered with Summerfield nutrient solution supplemented with 0.5 µM Pi. Three days after treatment, plants were inoculated with a 4 ml of rhizobia solution (OD<sub>600</sub> = 0.3). One day post-inoculation, Pi treatments were reestablished. After 15 days of post-Pi-deficiency treatment, the number of nodules per plant was evaluated. For each split-root system, four biological replicates, each containing four different split-root plants, were independently generated.

### Plasmid construction

To analyze the activity of the *PvRIC1* promoter, a 1700-bp DNA fragment upstream of the start codon was PCR-amplified from genomic DNA of *P. vulgaris* var. Negro Jamapa using specific primers. The amplified fragment was then cloned into the pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vector. The resulting pENTR-*pPvRIC1* plasmid was recombined into the pKGWFS7 binary vector containing the open CDS of both *GUS* and *eGFP*, yielding the transcriptional *pPvRIC1::eGFP::GUS* fusion.

To generate an RNAi construct against *PvPHR1* (Phvul.006G134700), a specific fragment of 213 bp from the 3'-UTR region of *PvEPP1* was amplified using gene-specific primers. The amplified fragment was then cloned into the pENTR-D-TOPO (Thermo Fisher Scientific) vector. The resulting pENTR-*PvPHR1*-RNAi plasmid was recombined into the pK7GWIWG2(II)-RR binary vector containing the constitutively expressed fluorescent *DsRED* protein. The correct orientation was verified by PCR using the primers Forward-Intron (5'-GCACACCAGAGCATATATATTGGTGG-3') and Reverse-35SPromoter (5'-CCAATATCCTTCGCAAGACCCCTCC-3').

Constructs were verified by DNA sequencing. Primer sequences for plasmid constructions are shown in Table S2.

### *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation

Binary vectors with *pPvRIC1::eGFP::GUS* or *PvPHR1*-RNAi constructs were mobilized into *A. rhizogenes* K599 by electroporation. The empty vectors pKGWFS7 or pK7GWIWG2(II)-RR were used as controls. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation was performed as described by Estrada-Navarrete *et al.* (2007). Common bean composite plants (plants with the transformed root system and untransformed shoot system) were grown in 1-L pots containing wet perlite. eGFP or *DsRed* fluorescence in transgenic roots was observed with a fluorescence stereomicroscope.

### *PvRIC1* promoter activity in response to Pi deficiency

To evaluate *PvRIC1* promoter activity, *A. rhizogenes*-mediated *pPvRIC1::eGFP::GUS* transgenic roots were generated in the



*P. vulgaris* wild-type cultivar 'Negro Jamapa' as described above. Composite plants were watered with Summerfield nutrient solution (Summerfield *et al.*, 1977) supplemented with 1 mM Pi (Optimal-Pi conditions) or 5  $\mu$ M Pi (Low-Pi conditions). After 3 days of Pi-deficiency treatment, transgenic roots showing eGFP fluorescence were immersed in GUS staining solution [0.05% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7), 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA and 0.1% Triton X-100] and incubated for 2 h at 37°C. After being cleared in diluted NaClO and rinsing in phosphate buffer, roots were examined under a bright-field microscope. For this experiment, five biological replicates, each with ten composite plants and ten roots, were included.

### Gene expression analysis

To analyze the expression of *PvRIC1*, *PvRIC2*, *PvIPS1*, *PvPHR1*, *PvTML*, and *PvNIN*, *P. vulgaris* wild-type, grafted, and split-root plants were treated with optimal- or low-Pi concentrations as described above. To evaluate the expression of these genes in transgenic roots, only those roots showing *DsRed* fluorescence were harvested. Upon Pi-deficiency treatment, roots were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used. Total RNA was isolated from roots from different three different plants using the E.Z.N.A. Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of genomic DNA-free total RNA. This cDNA was used to analyze the above-mentioned genes by qRT-PCR in a Step-One qPCR thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The housekeeping gene *PvActin* was used to normalize gene expression levels. The expression level of different genes was calculated according to the equation  $E = P_{\text{eff}}^{-\Delta Ct}$ , as reported in Isidra-Arellano *et al.* (2018). The nucleotide sequences of the qRT-PCR primers used in the present study are provided in Table S2. For this experiment, six biological replicates, each with three technical replicates, were included.

### Root hair deformation analysis in supernodulation *nark* mutant plants

Three-day-old *P. vulgaris* and *G. max* wild-type, and *nark* seedlings grown for 3 days under optimal-Pi or low-Pi conditions, were inoculated with 1 ml of *R. tropici* or *B. diazoefficiens* (OD<sub>600</sub> = 0.3), respectively. Forty-eight hours after inoculation, roots were collected and stained with methylene blue to maximize contrast, and then observed under a bright-field microscope. In total, 20 independent biological replicates, each including 10 plants, were generated.

### Nodulation assay in supernodulation *nark* mutant plants

Two-day-old *P. vulgaris* var. OAC Rico (wild-type), *G. max* var. Bragg (wild-type), and *nark* mutant *P. vulgaris* and *G. max* plants were transferred into 1-L pots containing wet perlite and inoculated with 1 ml of *R. tropici* or *B. diazoefficiens* (OD<sub>600</sub> = 0.3), respectively. Two days after rhizobia inoculation, both *P. vulgaris* and *G. max* plants were watered with Summerfield nutrient solution (Summerfield *et al.*, 1977) supplemented with 1 mM Pi (Optimal-Pi conditions) or 5  $\mu$ M Pi (Low-Pi conditions). After 20 days of Pi-deficiency treatment, the number of nodules per plant was evaluated. For this experiment, four biological replicates, each containing five independent plants, were included.

### Promoter analysis

Promoter sequences of *PvNIN*, *PvRIC1*, *PvRIC2*, and *PvTML*, as well as from their orthologous genes in *G. max* (*GmNIN*, *GmRIC1*, *GmRIC2*, and *GmTML*), *M. truncatula* (*MtNIN*, *MtCLE12*, *MtCLE13*, and *MtTML*), and *L. japonicus* (*LjNIN*, *LjCLE-RS1*, *LjCLE-RS2*, and *LjTML*), were retrieved from: (i) Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) for *P. vulgaris* and *G. max* genes; (ii) MtrunA17r5.0-ANR (<https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR>) and Phytozome v12.1 for *M. truncatula* genes; and (iii) Lotus Base (<https://lotus.aun.dk>) for *L. japonicus* genes. The promoter regions of each gene were obtained by extracting the sequences 6–7 kb upstream of the start codon. These 6–7-kb genomic sequences did not contain coding sequences from upstream genes in the four analyzed legume species (*P. vulgaris*, *G. max*, *M. truncatula*, and *L. japonicus*). Identification of known *cis*-regulatory elements in the promoter region of each gene was conducted using the New PLACE tool (A Database of Plant Cis-acting Regulatory Elements; <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (Higo, *et al.*, 1999). Identified *cis*-regulatory elements in *PvRIC1* and *PvRIC2* are shown in Table S1.

### Statistical analysis

All of the statistical analyses were conducted using R, version 3.01 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The specific statistical tests performed are indicated as and where appropriate.

### ACKNOWLEDGEMENTS

M.C.I.-A. is a Doctoral Student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and receives a doctoral student fellowship from CONACyT (CVU: 919676). This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM grants No. IN213017 and IN201320) and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT grant No. A1-S-9454) to O.V.-L. Research in the L.C. laboratory is supported by grants from PAPIIT-UNAM (grants No. IN-209118 and CV-200519). We thank Dr Brett Ferguson and Dr Ramiro Lascano for providing seeds of the *Pvnark* and *Gmnark* mutant lines, respectively. We also thank Dr Jean-Michel Ané (University of Wisconsin-Madison, USA), Dr Thomas Irving (University of Wisconsin-Madison, USA), Dr Georgina Hernández (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, Mexico), Dr Caspar C. C. Chater (University of Sheffield, UK), Dr Kiwamu Tanaka (Washington State University, USA), and Dr Alexandre Thomas (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, Mexico) for constructive discussion.

### CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

OV-L, MCI-A, AC-R, and LC proposed and designed the study. MCI-A, EAP-R, and JA-C generated common bean composite plants. MCI-A generated the p*PvRIC1*::GUS and *PvPHR1*-RNAi construct. MCI-A developed the common bean and soybean plants with the split-root system, as well as the common bean and soybean grafted plants. MCI-A, EAP-R, and MDRR-S analyzed the spatiotemporal expression pattern of *PvRIC1*. MCI-A and SF-O identified potential

cis-regulatory elements in PvRIC1 and PvRIC2. MCI-A and EAP-R analyzed the expression of symbiosis-related genes and performed nodulation assays. MCI-A and MDSS-C performed the rhizobia-induced root hair deformation assays. OV-L and MCI-A wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript submitted for publication.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors confirm that all relevant experimental data are available and accessible within the manuscript and its supporting information.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1.** Expression levels of *PvRIC1* and *PvRIC2* under iron- and nitrogen-deficient conditions.

**Figure S2.** *pPvRIC1::GUS* activity under Pi-deficient conditions.

**Figure S3.** *pPvRIC1::GUS* activity under iron-, nitrogen-, and Pi-deficient conditions.

**Figure S4.** *PvNIN* and *PvTML* possess a putative P1BS cis-regulatory element in their promoter region.

**Table S1.** Cis-regulatory elements identified in the promoter region of *PvRIC1* and *PvRIC2*.

**Table S2.** Primers used for gene cloning and qRT-PCR analyses.

## REFERENCES

- Araya, T., Miyamoto, M., Wibowo, J. et al. (2014) CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2029–2034.
- Brogammer, A., Krussel, L., Blaise, M. et al. (2012) Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharides signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13859–13864.
- Broughton, W.J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)-Model food legumes. *Plant Soil*, **252**, 55–128.
- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F. et al. (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **6**, e1001102.
- Cabeza, R.A., Liese, R., Lingner, A. et al. (2014) RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N<sub>2</sub> fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *J. Exp. Bot.* **65**, 6035–6048.
- Carroll, B., McNeil, D.L. and Gresshoff, P.M. (1985) Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4162–4166.
- Castro-Guerrero, N.A., Isidra-Arellano, M.C., Mendoza-Cozatl, D.G. and Valdés-López, O. (2016) Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Front. Plant. Sci.* **7**, 600.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F. et al. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell*, **12**, 1647–1666.
- Chen, Z., Cui, Q., Liang, C., Sun, L., Tian, J. and Liao, H. (2011) Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomics analysis. *Proteomics*, **11**, 4648–4659.
- Dénarié, J., Debéllé, F. and Promé, J.C. (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503–535.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R. and Long, S.R. (1996) Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell*, **85**, 673–681.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantrager, X., Olivares, J.E. et al. (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat. Protoc.* **2**, 1819–1824.
- Ferguson, B.J., Li, D., Hastwell, A.H., Reid, D.E., Li, Y., Jackson, S.A. and Gresshoff, P.M. (2014) The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnol. J.* **12**, 1085–1097.
- Ferguson, B.J., Minamisawa, K., Muñoz, N.B. and Lam, H.M. (2019a) Editorial: metabolic adjustments and gene expression reprogramming for symbiotic nitrogen fixation in legume nodules. *Front. Plant Sci.* **10**, 898.
- Ferguson, B.J., Mens, C., Hastwell, A. et al. (2019b) Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ.* **42**, 41–51.
- Franco-Zorrilla, J.M., González, E., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A. and Paz-Ares, J. (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* **55**, 285–293.
- Funayama-Noguchi, S., Noguchi, K., Yoshida, C. and Kawaguchi, M. (2011) Two CLE genes are induced by phosphate in roots of *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* **124**, 155–163.
- Genre, A. and Russo, G. (2016) Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions? *Front. Plant Sci.* **7**, 96.
- Gutiérrez-Alanis, D., Yong-Villalobos, L., Jiménez-Sandoval, P. et al. (2017) Phosphate starvation-dependent iron mobilization induces CLE14 expression to trigger root meristem differentiation through CLV2/PEPR2 signaling. *Dev. Cell*, **41**, 555–570.
- Hernández, G., Valdés-López, O., Ramírez, M. et al. (2009) Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant Physiol.* **151**, 1221–1238.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**, 297–300.
- Isidra-Arellano, M.C., Reyero-Saavedra, M.D.R., Sánchez-Correa, M.D.S. et al. (2018) Phosphate deficiency negatively affects early steps of the symbiosis between common bean and rhizobia. *Genes*, **9**, E498.
- Kassaw, T., Nowark, S., Schnabel, E. and Frugoli, J. (2017) ROOT DETERMINED NODULATION1 is required for *M. truncatula* CLE12, but not CLE13, peptide signaling through the SUNN receptor kinase. *Plant Physiol.* **174**, 2445–2456.
- Kosliak, R.M. and Bohloul, B.B. (1984) Suppression of nodule development of one side of split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol.* **75**, 125–130.
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R.J., Downie, J.A. and Oldroyd, G.E. (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9823–9828.
- Krusell, L., Madsen, L.H., Sato, S. et al. (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, **420**, 422–426.
- Lim, C.W., Lee, Y.W. and Hwang, C.H. (2011) Soybean nodule-enhanced CLE peptides in roots act as signal in GmNARK-mediated nodulation suppression. *Plant Cell Physiol.* **52**, 1613–1627.
- Liu, C.W., Breakspear, A., Guan, D. et al. (2019a) NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* **179**, 1704–1722.
- Liu, C.W. and Murray, J.D. (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants*, **11**, E33.
- Liu, J., Rutten, L., Limpens, E. et al. (2019b) A remote cis-regulatory region is required for *NIN* expression in the pericycle to initiate nodule primordium formation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **31**, 68–83.
- Miri, M., Janakirama, P., Huebert, T., Ross, L., McDowell, T., Orosz, K., Markmann, K. and Szczyglowski, K. (2019) Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytol.* **222**, 1523–1537.
- Miyazawa, H., Oka-Kiwa, E., Sato, N. et al. (2010) The receptor-like kinase KLAVIER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development*, **137**, 4317–4325.
- Morcillo, R.J.L., Singh, S., He, D. et al. (2020) Rhizobacterium-derived diacyl modulates plant immunity in a phosphate-dependent manner. *EMBO J.* **39**, e102602.

- Mortier, V., Den Herder, G., Whitford, R., Van de Velde, W., Rombauts, S., D'haeseleer, K., Holsters, M. and Goormachtig, S. (2010) CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiol.* **153**, 222–237.
- Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L. and Nielsen, T.H. (2007) Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol.* **143**, 156–171.
- Murakami, E., Cheng, J., Gysel, K. *et al.* (2018) Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signaling in *Lotus japonicus*. *ELife*, **7**, e33506.
- Nasr Esfahani, E.M., Inoue, K., Chu, H.D. *et al.* (2017) Comparative transcriptome analysis of nodules of two *Mesorhizobium*-chickpea associations with differential symbiotic efficiency under phosphate deficiency. *Plant J.* **91**, 911–926.
- Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y. *et al.* (2018) A NIN-like protein mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* **9**, 499.
- Nishimura, R., Hayashi, M., Wu, G.J. *et al.* (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*, **420**, 426–429.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S. and Kawaguchi, M. (2009) Nod Factor/Nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-Mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiol.* **50**, 67–77.
- Park, S.J. and Buttery, B.R. (1988) Nodulation mutants of white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) induced by ethyl-methane sulphonate. *Can. J. Plant Sci.* **68**, 199–202.
- Park, S.J. and Buttery, B.R. (1989) Inheritance of nitrate-tolerant supernodulation in EMS-induced mutants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Hered.* **80**, 486–488.
- Puga, M.I., Mateos, I., Charukesi, R. *et al.* (2014) SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14947–14952.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B. *et al.* (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585–592.
- Reid, D.E., Ferguson, B.J. and Gresshoff, P.M. (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 606–618.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J. and Paz-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122–2133.
- Schnabel, E., Journet, E.P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G. and Frugoli, J. (2005) The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Mol. Biol.* **58**, 809–822.
- Schnabel, E.L., Kassaw, T.K., Smith, L.S., Marsh, J.F., Olroyd, G.E., Long, S.R., Long, S.R. and Frugoli, J. (2011) The *ROOT DETERMINED NODULATION1* gene regulates nodule number in roots of *Medicago truncatula* and defines a highly conserved, uncharacterized plant gene family. *Plant Physiol.* **157**, 328–340.
- Searle, I.R., Men, A.E., Laniya, T.S., Buzas, D.M., Iturbide-Oxmaetxe, I., Carroll, B.J. and Gresshoff, P.M. (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. *Science*, **299**, 109–112.
- Sieberer, B.J., Chabaud, M., Timmers, A.C., Monin, A., Fournier, J. and Barker, D.G. (2009) A nuclear-targeted chameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol.* **151**, 1197–1206.
- Sobkowiak, L., Bielewicz, D., Malecka, E.M., Jakobsen, I., Albrechtsen, M., Szwejkowska-Kulinska, Z. and Pacak, A. (2012) The role of the P1BS element containing promoter-driven genes in Pi transport and homeostasis in plants. *Front. Plant Sci.* **3**, 58.
- Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M. and Kawaguchi, M. (2014) NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14607–14612.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A. and Hayashi, M. (2013) Nodule inception directly targets *NF-Y* subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet.* **9**, 31003352.
- Suleiman, S., Ha, C.V., Schulze, J. and Tran, L.S.P. (2013) Growth and nodulation of symbiotic *Medicago truncatula* at different levels of phosphorus availability. *J. Exp. Bot.* **64**, 2701–2712.
- Suleiman, S., Kusano, M., Ha, C.V. *et al.* (2019) Divergent metabolic adjustments in nodules are indispensable for efficient N<sub>2</sub> fixation of soybean under phosphate stress. *Plant Sci.* **289**, 110249.
- Summerfield, R.J., Huxley, P.A. and Minchin, F.R. (1977) Plant husbandry and management techniques for growing grain legumes under stimulated tropical conditions in controlled environments. *Exp. Agric.* **13**, 113–121.
- Suzuki, A., Hara, H., Kinoue, T., Abe, M., Uchiumi, T., Kucho, K., Higashi, S., Hirsch, A.M. and Arima, S. (2008) Split-root study of autoregulation of nodulation in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Plant Res.* **121**, 245–249.
- Takahara, M., Magori, S., Soyano, T. *et al.* (2013) Too Much Love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol.* **54**, 433–447.
- Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D.B. *et al.* (2018) Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, **362**, 233–236.
- Valdés-López, O., Arenas-Huertero, C., Ramirez, M., Girard, L., Sánchez, F., Vance, C.P., Reyes, J.L. and Hernández, G. (2008) Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signaling in common bean roots. *Plant Cell Environ.* **31**, 1834–1843.
- Valdés-López, O. and Hernández, G. (2008) Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: what about legumes? *J. Integr. Plant Biol.* **157**, 423–447.
- Vance, C.P., Udhe-Stone, C. and Allan, D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**, 423–447.
- Venkateshwaran, M., Volkening, J.D., Sussman, M.R. and Ané, J.M. (2013) Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**(118), 127.
- Vernié, T., Kim, J., Frances, L. *et al.* (2015) The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the *Medicago truncatula* root. *Plant Cell*, **27**, 3410–3424.
- Wang, L., Sun, Z., Su, C., Wang, Y., Yan, Q., Chen, J., Ott, T. and Li, X. (2019) A GmNINA-miR172c-NNC1 regulatory network coordinates the nodulation and autoregulation of nodulation pathways in soybean. *Mol. Plant*, **12**, 1211–1226.
- Wang, Q. and Zhu, H. (2018) Genetic and molecular mechanism underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Front. Plant Sci.* **9**, 313.
- Yoro, E., Nishida, H., Ogawa-Ohnishi, M., Yoshoda, C., Suzuki, T., Matsubayashi, Y. and Kawaguchi, M. (2019a) PLENTY, a hydroxyproline O-arabinoxyltransferase, negatively regulates root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.* **70**, 507–517.
- Yoro, E., Suzuki, T. and Kawaguchi, M. (2019b) CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne mutant of *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **33**, 320–327.