



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis del avance del hilo de infección y la dinámica de la citocinesis en el sitio de infección en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium etli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Elizabeth Monroy Morales

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosana Sánchez López
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, IBt-UNAM
Dra. Alicia Gamboa de Buen, Instituto de Ecología-UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2023



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.

MONROY MORALES ELIZABETH
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **16 de mayo de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis del avance del hilo de infección y la dinámica de la citocinesis en el sitio de infección en raíces de Phaseolus vulgaris con Rhizobium etli**", dirigida por el/la Dr(a). **SÁNCHEZ LÓPEZ ROSANA**.

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

REYES TABOADA JOSÉ LUIS	PMDCBQ	PRESIDENTE
FORMEY DE SAINT LOUVENT DAMIEN	PMDCBQ	SECRETARIO
CRUZ GARCÍA FELIPE	PMDCBQ	VOCAL
RONCERET ARNAUD JACQUES MARCEL	PMDCBQ	VOCAL
SÁNCHEZ JIMÉNEZ MA. DE LA PAZ	PMDCBQ	VOCAL

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de mayo de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser descubierto”. Carl Sagan

DEDICATORIA

Le dedico el resultado de este trabajo a toda mi familia, a mi maravillosa mamá, Juanita, a mi papá, Luciano y a mis dos hermanas, amigas y confidentes, Laura Maricela y Dalia Esmeralda. Gracias por su amor incondicional, por sus sacrificios y por estar ahí siempre. Gracias Dios por mi familia, que mi hogar siempre sea un buen lugar.

A Jonathan Lagunas, por creer en mí desde el primer día, por siempre ver lo mejor de mí, por motivarme a ser mejor y por todo su apoyo durante mi proyecto de investigación. Gracias por estar en mi vida.

¡Thank you so much! ♥

Tienen un lugar especial en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al instituto de biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM), por haberme brindado la oportunidad de ser parte de su comunidad y de formarme académicamente.

Agradezco de manera especial y sincera, a mi asesora de tesis, la Dra. Rosana Sánchez López, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por la formación académica y la confianza que tiene en mí. Por guiar este proyecto de investigación que ha sido la clave del buen trabajo que hemos realizado y culminado.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Alicia Gamboa de Buen, miembro de mi comité Tutorial, por la orientación, discusión crítica y aportaciones en el desarrollo de mi trabajo de investigación, así como su asesoría en la revisión del escrito del artículo científico derivado de mi trabajo de investigación.

Un agradecimiento muy especial, a la Dra. Rosario Vera Estrella, quien formo parte de mi comité Tutorial durante los primeros cuatro semestres de doctorado, por su participación activa y aportaciones en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Adán Guerrero Cárdenas, miembro de mi comité Tutorial, a partir del quinto semestre de doctorado, por su valiosa crítica, por sus conocimientos transmitidos y por sus aportaciones enriquecedoras a este proyecto.

Así mismo mi más profundo agradecimiento, al Dr. Damien Formey de Saint Louvent, la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez, el Dr. Arnaud Jaques Marcel Ronceret y la Dra. Claudia Díaz Camino, integrantes del jurado de mi examen de Candidatura, por su evaluación e importante aporte al proyecto, que me permitió mejorar, profundizar y ampliar mis conocimientos.

Agradecimiento al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del IBt-UNAM. Particularmente, al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, al M.C. Andrés Martin Saralegui Amaro y a la Dra. Verónica Rojo León por su servicio, asesoría, apoyo técnico y capacitación para convertirme en super-usuaria del microscopio Confocal Olympus FV1000 Invertido.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, por sus servicios y el apoyo técnico con la síntesis de los oligonucleótidos diseñados durante este proyecto.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por el apoyo económico para la realización de este proyecto (595064) durante los cuatro años. Y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN204721) por la beca otorgada para culminar este proyecto de investigación.

CONTENIDO	
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Modelo de estudio: la nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i>	5
1.1.1 Generalidades de <i>P. vulgaris</i>	5
1.1.2 La importancia y generalidades de la nodulación	6
1.1.3 La nodulación en leguminosas	7
1.2 El nódulo fijador de nitrógeno.....	8
1.3 Infección epidermal y división celular al inicio de la nodulación.....	11
1.3.1 El pelo radical, una célula peculiar	12
1.3.2 Diálogo molecular entre rizobia y el pelo radical susceptible a la infección	14
1.3.3 La cámara de infección.....	15
1.3.4 La infección epidermal	18
1.3.5 División celular	21
1.3.6 Coordinación entre la infección epidermal y la división celular	23
1.4 La división de las células vegetales	24
1.5 KNOLLE, una sintaxina específica de la citocinesis	30
2. ANTECEDENTES	33
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO GENERAL	37
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	37
6. METODOLOGÍA	38
6.1 Germinación de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv Negro jamapa	38
6.2 Extracción de RNA total	38
6.3 Ensayos de RT-qPCR	39
6.4 Construcción de los cassettes de expresión	40
6.5 PCR en colonia	41
6.6 Generación de raíces transgénicas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	42

6.7 Inoculación de las raíces transgénicas con <i>Rhizobium etli</i> CE3-DsRed pMP604	43
6.8 Montaje de la planta con raíces transgénicas	43
6.9 Tinción DAPI	44
6.10 Microscopía confocal	44
6.11 Procesamiento de imágenes	45
7. RESULTADOS	46
7.1 Desarrollo de herramientas moleculares	46
<i>Rhizobium etli</i> CE3-DsRed pMP604, una excelente herramienta para visualizar el proceso de infección <i>in vivo</i>	46
NLS-Turquoise, un marcador para visualizar núcleo	48
YFP-PvKNOLLE, un marcador de citocinesis en células vegetales	49
7.2 Interpretación de las imágenes del sitio de infección capturadas por microscopía confocal	54
7.3 Etapas del proceso de infección epidermal	55
7.4 Tamaño de las células subepidermales (S-E) en el sitio de la infección epidérmica	56
7.5 Posición del núcleo en las células S-E adyacentes al sitio de infección	59
7.6 La citocinesis en las células subepidermales (S-E) adyacentes el sitio de infección con rizobia	62
7.7 Modelo de la dinámica entre el avance del hilo de infección y la división de las células subepidermales adyacentes al sitio de infección	64
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	72
10. PERSPECTIVAS	74
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
12. ANEXO 1	104
13. ANEXO 2	108

ABREVIATURAS

C1: capa cortical 1 o capa cortical subepidermal

C2: capa cortical 2

C3: capa cortical 3

C4: capa cortical 4

C5: capa cortical 5

CCV: (*clathrin coated vesicles*): vesículas cubiertas de clatrina

DPC: dominio de proliferación celular;

DsRed (*red fluorescent protein*): proteína fluorescente roja

DT: dominio de transición

ENODs: nodulinas tempranas

FN: factores Nod

HI: hilo de infección

hpg: horas post-germinación

hpi: horas post-inoculación

MFs: microfilamentos de actina

MTs: microtúbulos

NLS (*nuclear localization signal*): señal de localización nuclear

PC: placa celular

PPB (*preprophase band*): banda de preprofase

S-E: células subepidermales

SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*):

receptores de proteínas de fijación soluble de NSF

TGN/EE (*transGolgi network/early endosome*): red trans-Golgi/endosoma temprano

WT (*wild-type*): tipo silvestre

YFP (*Yellow fluorescent protein*): proteína fluorescente amarilla

ZE: zona de elongación.

RESUMEN

La etapa inicial en el desarrollo de un nódulo simbiótico, fijador de nitrógeno, en las raíces de las leguminosas involucra la regulación de dos procesos, la infección epidermal con rizobia y la reactivación del ciclo celular. La infección epidermal ocurre, principalmente, a través de hilos de infección (HI) que se forman y elongan en el pelo radical. Mientras que las rondas de división celular tienen lugar en el córtex de la raíz ubicado frente al sitio de infección. Análisis genéticos indican que el éxito de la nodulación depende de una fina coordinación espacio-temporal de estos dos programas; sin embargo, aún falta dilucidar la dinámica y los mecanismos celulares que les conecta. La estrategia utilizada en este trabajo de tesis se basa en la visualización de la dinámica entre el desarrollo del HI y la división celular al inicio de la nodulación de *Phaseolus vulgaris*. En la raíz de esta leguminosa, las primeras divisiones ocurren en la capa más externa del córtex (C1 o capa subepidermal, S-E), en el sitio de infección epidermal. Para monitorear el desarrollo del HI y la citocinesis se utilizaron las siguientes herramientas moleculares: una cepa de *Rhizobium etli* que expresa DsRed y el marcador específico de citocinesis en plantas, YFP-PvKNOLLE, respectivamente. Evidencias adicionales sobre la división celular fueron obtenidas mediante la visualización del núcleo marcado con DAPI o NLS-mTurquoise2, y la autofluorescencia de la pared celular.

Los resultados de este trabajo son pioneros al demostrar que la reactivación del ciclo celular en las células S-E que subyacen el sitio de infección epidermal tiene lugar durante la etapa inicial de la infección epidermal, es decir, cuando se forma una microcolonia en el pliegue del pelo radical a ser infectado. Las imágenes confocales del sitio de infección muestran que en esta etapa las células S-E subyacentes presentan una reducción gradual en su longitud y el núcleo se desplaza hacia el centro de la célula. También se encontró que, en estas células, el inicio de la citocinesis tiene lugar cuando el HI está en la etapa de elongación en el pelo radical; mientras que la salida del HI del pelo radical para ingresar a una célula S-E subyacente, sucede cuando la célula se encuentra al final de la etapa de citocinesis o post-citocinesis. En su conjunto, los resultados aquí descritos son una importante aportación al conocimiento actual del proceso simbiótico *P. vulgaris*-

rizobia al demostrar que la infección del pelo radical y la división de las células S-E adyacentes al sitio de infección son eventos que inician y concluyen en paralelo.

ABSTRACT

The initial stage in the development of a symbiotic nitrogen-fixing nodule in the roots of legumes involves the regulation of two processes, epidermal infection and cell cycle reactivation. Epidermal infection occurs mainly through transcellular infection threads (IT) that form and elongate in the root hair. Rounds of cell division take place in the root cortex located in front of the infection site. nodule organogenesis begins with cortical cell divisions at the site of infection. Genetic analysis indicate that the success of nodulation depends on a fine spatiotemporal coordination of these two programs; however, the dynamics and cellular mechanisms that connect them remain to be elucidated. The strategy used in this thesis is based on the visualization of the dynamics between the IT development and the cell division at the beginning of the nodulation in *Phaseolus vulgaris*. In the root of this legume, the first divisions occur in the outermost layer of the cortex (C1 or subepidermal layer, S-E), in the epidermal infection site. To monitor the IT development and the cell division process, the following tools were used: a *Rhizobium etli* strain expressing DsRed and the plant cytokinesis marker YFP-*PvKNOLLE*, respectively. Additional evidence on cell division was obtained by visualizing the nucleus labeled with DAPI or NLS-mTurquoise2, and the cell wall auto-fluorescence.

The results of this work are pioneering in demonstrating that the reactivation of the cell cycle in the S-E cells underlying the epidermal infection site occurs during the initial step of the epidermal infection, that is, when a microcolony forms at the fold of the root hair to be infected. Confocal images of the infection site show that at this stage, the adjacent S-E cells display a gradual reduction in the cell length and the nucleus moves to the center of the cell. It was also found that initiation of cytokinesis in the underlying S-E cell takes place when the IT is in the elongation stage in the root hair; whereas the exit of the IT from the root hair, to enter the underlying S-E cell, occurs when the cell is at the end of cytokinesis or post-cytokinesis stage. Taken together, the results described here are a significant contribution to current understanding of the *P. vulgaris*-rhizobia symbiotic process by demonstrating that infection of the root hair and the division of S-E cells underlying the infection site are events that begin and end in parallel.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Modelo de estudio: la nodulación en *Phaseolus vulgaris*

1.1.1 Generalidades de *P. vulgaris*

La planta modelo de estudio en este proyecto es el frijol común, cuyo nombre científico es *Phaseolus vulgaris* y pertenece a la familia Fabaceae o Leguminosae. Es la leguminosa de grano más importante para el consumo humano en el mundo, ya que representa una fuente de proteínas, vitaminas, minerales y fibra. De acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), a nivel mundial México es el séptimo productor en frijol, con 1.18 millones de toneladas al año (CEDRSSA, 2020). La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) señaló que en el campo mexicano se cosecha el 4% de la leguminosa producida a nivel mundial. Durante el 2021, Zacatecas se posicionó como la entidad mexicana líder en producción de frijol (SADER, 2022). En México el consumo anual per cápita es de 11 kg (INIFAP, 2021; SIAP, 2022).

La distribución actual de *P. vulgaris* tipo silvestre abarca una gran área geográfica, desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina (Bitocchi y cols., 2012). Evidencias de restos fósiles y características morfológicas, agronómicas y genéticas, establecen que el frijol común se originó en Mesoamérica (Bitocchi y cols., 2012). A partir del frijol silvestre se formaron dos acervos genéticos domesticados distintos, Mesoamericano y Andino (Bitocchi y cols., 2012; Rendón-Anaya y cols., 2017). En este contexto, la variedad Negro Jamapa utilizada en este estudio es de tipo Mesoamericano.

P. vulgaris es una planta herbácea, autógama, de ciclo anual, diploide con once cromosomas y un genoma de 587 Mb (Andino) y 549 Mb (Mesoamericano) (Subramani y cols., 2023). Los frutos son vainas curvadas, de color verde, morada a casi negra, y dehiscentes (frutos que al alcanzar la madurez se abren naturalmente), en cuyo interior se disponen de 4 a 12 semillas. Sus semillas

comestibles se denominan legumbres, tienen diversas formas, tamaños y colores según la variedad (SIAP, 2022). Al igual que otras leguminosas, el frijol común puede establecer asociaciones simbióticas con bacterias del suelo llamadas rizobia, formando nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de la leguminosa. En el nódulo, la rizobia adquiere la capacidad de fijar nitrógeno para el beneficio de las plantas. Como resultado, una parte importante del nitrógeno que requiere el cultivo sustentable de leguminosas es suministrado por este proceso simbiótico, disminuyendo así la necesidad y el uso de fertilización química.

1.1.2 La importancia y generalidades de la nodulación

El desarrollo y funciones de los seres vivos dependen de la adquisición de nutrientes orgánicos e inorgánicos que contienen los elementos esenciales como carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo, entre otros, que se requieren para el metabolismo celular. La disponibilidad de suelos enriquecidos en nitrógeno y fósforo biológicamente asimilables es la principal limitante para el crecimiento de las plantas, un requisito que cada vez es más difícil de cumplir dadas las condiciones de sequía, cambio climático y otros factores asociados a la agricultura moderna. La agricultura actual se basa en el uso, con frecuencia excesivo, de fertilizantes químicos enriquecidos en nitratos y fosfatos asimilables, lo que genera el empobrecimiento y la contaminación en suelos y agua (Kumar y cols., 2022; Mahmud y cols., 2020).

Una alternativa a esta problemática es el enriquecimiento de suelos con biofertilizantes compuestos por microorganismos que evolutivamente han desarrollado la capacidad de establecer una relación simbiótica con plantas. Por ejemplo, la micorrización arbuscular, o interacción simbiótica que se establece entre plantas y hongos micorrízicos (Glomeromicetes), favorece el aporte y transporte de fósforo (Ho-Plágaro y García-Garrido, 2022).

La nodulación simbiótica en leguminosas y en actinorrizas es otro importante beneficio agrícola a tener en cuenta ya que contribuye a la fijación biológica del nitrógeno (Wang y cols., 2018; Gauthier-Coles y cols., 2019; Roy y cols., 2020). Este

proceso consiste en la reducción o fijación enzimática del nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+), una forma de nitrógeno asimilable por las plantas. El complejo enzimático denominado nitrogenasa es el responsable de esta actividad. Los organismos con capacidad de fijar nitrógeno son de origen bacteriano y pertenecen a un grupo conocido como diazótrofos (diazó: nitrógeno, trofo: nutrición). Los diazótrofos se encuentran en vida libre (género *Azotobacter*; Mahmud y cols., 2020) y en asociaciones simbióticas con leguminosas (bacterias rizobiales; Oldroyd y Downie, 2008) o con plantas actinorrhizas (bacterias filamentosas del género *Frankia*; Frioni y cols., 1999; Chetri y cols., 2022). La nodulación se caracteriza por la formación *de novo* de un órgano único que emerge de la raíz, conocido como nódulo fijador de nitrógeno, cuyo tejido central está enriquecido en células infectadas con actinobacterias o rizobia (Roy y cols., 2020; Chetri y cols., 2022; Yang, 2022). Es de mencionar que la nodulación en leguminosas es la mejor estudiada.

1.1.3 La nodulación en leguminosas

Rizobia es el nombre genérico de las bacterias del suelo que participan como endosimbiontes en la nodulación en leguminosas. Las más comunes pertenecen a la clase Alphaproteobacteria (α -rizobia), denominadas familia Rhizobiaceae, que incluyen los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*) *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, entre otros (Andrews y Andrews, 2017; Ma y Chen, 2021).

Si bien una especie de rizobia puede establecer simbiosis con más de una leguminosa, en términos generales, se considera que la simbiosis leguminosa-rizobia es especie-específica (Ferguson y cols., 2010; Wang y cols., 2012; Lindström y Mousavi, 2020; Ma y Chen, 2021). Por ejemplo, *Ensifer meliloti* y *Mesorhizobium loti* son endosimbiontes específicos de *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, respectivamente, mientras que *Rhizobium etli* y *R. tropici* son los endosimbiontes predominantes asociados a *P. vulgaris* silvestre y cultivado en suelos mesoamericanos y andinos (Aguilar y cols., 2004; Mnasri y cols., 2009; Shamseldin

y Velázquez, 2020; Clúa y cols., 2022). No obstante, desde el punto de vista simbiótico, el frijol común es una especie promiscua ya que puede ser nodulada por diferentes géneros de rizobia, por ejemplo, *Ensifer*, *Pararhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Burkholderia*, considerados endosimbiontes específicos de otras leguminosas, pero capaces de nodular *P. vulgaris* (Mnasri y cols., 2009; Peralta y cols., 2016; Lardi y cols., 2017; Shamseldin y Velázquez, 2020; Tong y cols., 2020). En esta relación simbiótica las rizobias ceden formas de nitrógeno (amoníaco y derivados) asimilables por la planta y obtienen fuentes de carbono en forma de azúcares sintetizados por la leguminosa (Boivin y Lepetit, 2020; Lindström y Mousavi, 2020). La simbiosis mutualista leguminosa-rizobia evolucionó hace unos 58 millones de años (Sprenst, 2007).

1.2 El nódulo fijador de nitrógeno

El nódulo maduro, fijador de nitrógeno, es una estructura tisular que emerge de la raíz como resultado de un complejo proceso en el que la infección con rizobias y el desarrollo u organogénesis del nódulo están finamente regulados por programas genéticos y de desarrollo (Roy y cols., 2020; Velandia y cols., 2022). La regulación hormonal también juega un papel importante en la nodulación (ver [Figura 1](#); Lin y cols., 2020; Velandia y cols., 2022). El papel de las hormonas vegetales en la nodulación es estudiado en las raíces de *M. truncatula* y en *L. japonicus*.

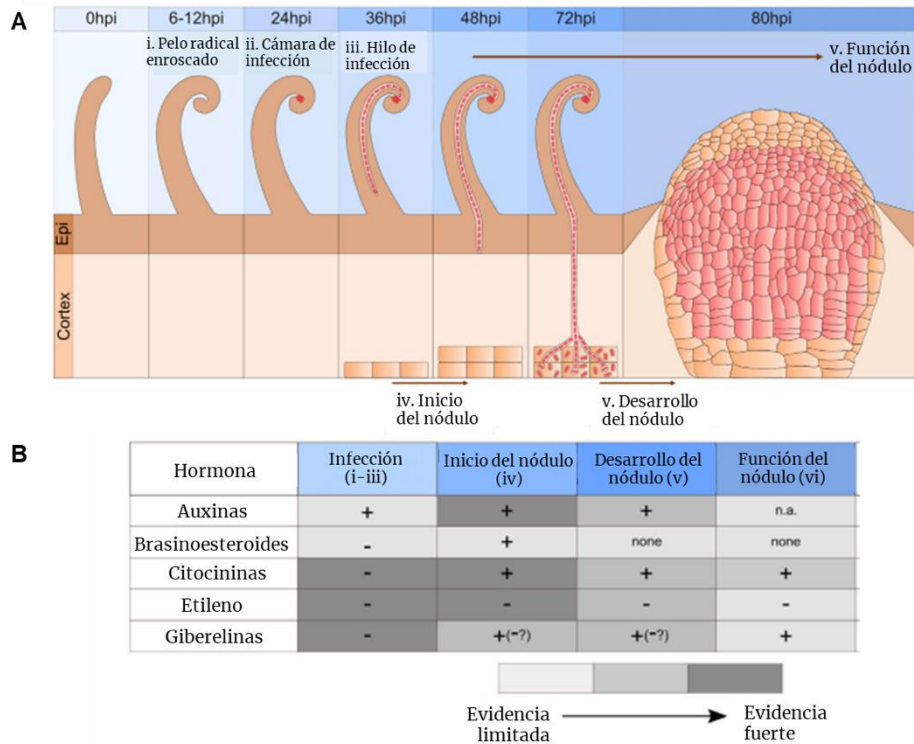


Figura 1. Esquema general de la nodulación **(A)** y la participación de hormonas **(B)**. **A)** Se ilustran las etapas de la infección epidermal, la división celular y la organización del nódulo, así como la temporalidad de estos eventos en la leguminosa *Medicago truncatula*. Las bacterias y células en etapas de la infección se indican en rojo. Los signos +, -, y -? se refieren a un papel positivo, negativo o también hay evidencia de un posible papel negativo en la regulación por la hormona indicada **(B)**. Epi, epidermis. hpi, horas post-infección con rizobia. Imagen tomada de Velandia y cols., 2022.

El nódulo tiene su origen en la reactivación del ciclo celular y división celular en la zona opuesta al polo de xilema en el sitio de infección con rizobia. La activa división celular genera una masa celular o primordio, cuyas células se diferencian para generar los tejidos que constituyen el nódulo maduro: los tejidos periféricos y el tejido central o zona de infección. Los tejidos periféricos comprenden una monocapa de células epidermales, el córtex externo, el cual está constituido de 2 a 7 capas celulares según la leguminosa, y el córtex interno, o parénquima del nódulo, en el cual se encuentran inmersos los haces vasculares del nódulo en conexión con el sistema vascular de la raíz (Guinel, 2009a; [Figura 2](#)). El tejido central se caracteriza por la presencia de células infectadas, intercaladas con células no infectadas. En este punto, el proceso de infección en la zona central consiste en la liberación de

las rizobias al entorno intracelular en una estructura membranosa subcelular, un *quasi* organelo conocido como simbiosoma, en donde las rizobias se diferencian a bacteroides que expresan el complejo enzimático nitrogenasa (King y Weber, 2007; Wang y cols., 2012; Ma y Chen, 2021).

Dependiendo de la leguminosa y su endosimbionte son de tipo indeterminado (con forma ovalada) o determinado (con forma esférica). Ejemplos de nódulos indeterminados son los que se desarrollan en las leguminosas de *M. truncatula*, *M. sativa* (alfalfa), *Pisum sativum* (chícharo), *Trifolium sp* (trébol) y *Vicia sativa*; mientras que las leguminosas *P. vulgaris*, *Glycine max* (soya,) y *L. japonicus* desarrollan nódulos determinados (Sprent, 2007; Ferguson y cols., 2010; Yang y cols., 2022).

Otras características que los distinguen son la capa celular en la que se reactiva la división celular e inicia la formación del primordio, la persistencia de la actividad meristemática y la organización del tejido central (ver [Figura 2](#); Sprent, 2007; Ferguson y cols., 2010; Yang y cols., 2022).

- En nódulos indeterminados ([Figura 2A](#)), las células del córtex interno que corresponden a la capa 4 y 5 (C4 y C5) y del periciclo son las primeras en reactivar su ciclo celular tras la infección por rizobia (Ferguson y cols., 2010; Popp y Ott, 2011; Xiao y cols., 2014; Kohlen y cols., 2018). Estos nódulos, el tejido central está organizado en cinco zonas, descritas como: I, con actividad meristemática persistente; II, la zona de infección; III, la zona de fijación de N₂; IV, la zona de senescencia y V, la zona saprofítica (Guinel, 2009a; Łotocka y cols., 2012).
- Los nódulos determinados ([Figura 2B](#)) se originan a partir de la división de las células de las capas externas del córtex de la raíz (Hayashi y cols., 2000), que en *P. vulgaris* corresponde a la capa 1 (C1) o también llamada capa subepidermal (Van Spronsen y cols., 2001); mientras que en *L. japonicus* las capas C2/C3 son las primeras en dividirse (Hayashi y cols., 2000). La actividad mitótica (meristemática) cesa en las etapas tardías del desarrollo del nódulo determinado (Ferguson y cols., 2010; Popp y Ott, 2011). El tejido central no está

zonificado y presenta células en diferentes estadios de infección con rizobia, las cuales están intercaladas con células no infectadas (Patriarca y cols., 2004).

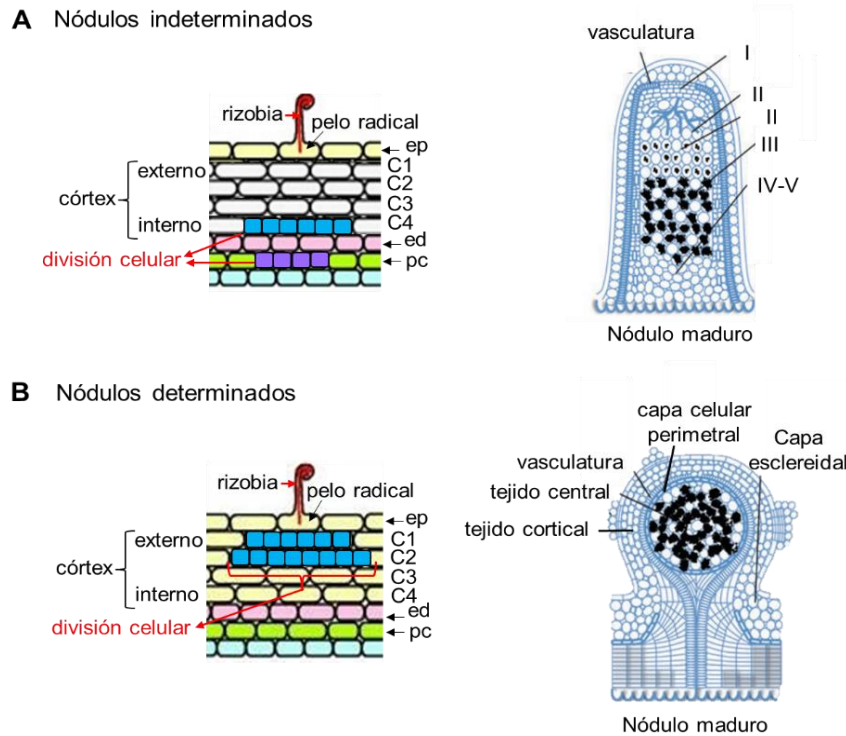


Figura 2. Características de los nódulos indeterminados **(A)** y determinados **(B)**. Se ilustran la formación del hilo de infección (HI, en rojo), las primeras divisiones de células corticales (en azul) y del periciclo (en morado). **A)** El tejido central en los nódulos indeterminados maduros presenta una organización zonal: meristemo persistente (I), de infección (II), de fijación de N₂ (III), de senescencia y zona saprofítica (IV y V). **B)** En los nódulos determinados la organización del tejido central es menos compleja y está constituida por células infectadas, intercaladas por células no infectadas. ep, epidermis; ed, endodermis; pc, periciclo; C1, primera capa cortical; C2, segunda capa cortical; C3, tercera capa cortical; C4, cuarta capa cortical. Esquemas modificados de Ferguson y cols., 2010 y Popp y Ott, 2011.

1.3 Infección epidermal y división celular al inicio de la nodulación

Si bien el proceso de nodulación aún no ha sido analizado en todas las leguminosas, se estima que en un 25% de las especies, las rizobias ingresan a la raíz a través de sitios de agrietamiento ("cracking" en inglés) o fisura de la epidermis y penetración intercelular. Tal es el caso de *Sesbania rostrata*, *Arachis hypogaea* (cacahuete), *Lupinus albus* y *Lotus uliginosus* (Ibáñez y cols., 2017; Montiel y cols., 2021; Quilbé

y cols., 2022). Recientemente, este proceso ha despertado gran interés, no obstante, aún es poco lo que se sabe sobre los mecanismos moleculares y celulares involucrados en este tipo de ingreso de rizobia a la raíz.

En contraste, en aproximadamente el 75% de las especies de leguminosas, la entrada de rizobia a la raíz es vía el pelo radical (Quilbé y cols., 2022), siendo el mecanismo de infección simbiótica mejor caracterizado y utilizado en la infección de *M. truncatula*, *L. japonicus*, *G. max* y *P. vulgaris*.

1.3.1 El pelo radical, una célula peculiar

Los pelos radicales son células epidérmicas que se encuentran en la zona de diferenciación de la raíz y son importantes para la adquisición de agua y nutrientes, el anclaje de las plantas y la interacción simbiótica con rizobia (Grierson y cols., 2014; Stéger y Palmgren, 2022). Estas células presentan un estatus de diferenciación peculiar, que se caracteriza por la formación de una extensión de forma tubular (“shank”, en inglés) que emerge hacia la rizosfera, lo que da a la raíz una apariencia pilosa, por lo que se denominan pelos radicales (“root hair”, en inglés). El tricoblasto es la célula epidérmica precursora del pelo radical, mientras que las células epidérmicas vecinas, que no se extienden (“non-hair cell”, en inglés) derivan de un a-tricoblasto (Grierson y cols., 2014; Salazar-Henao y cols., 2016; Stéger y Palmgren, 2022). En *Arabidopsis thaliana*, el patrón de especificación del destino celular (“cell fate specification”, en inglés) depende de información posicional de origen embrionario o post-embrionario y de una compleja maquinaria de regulación hormonal y genética. En la fase inicial o polarización del tricoblasto, y en el crecimiento o extensión tubular del pelo radical participan auxinas, brasinosteroides, etileno, ácido jasmónico, citocininas, entre otras hormonas, así como una serie de genes, entre los que se encuentran *WEREWOLF* (*WER*), *TRANSPARENT TESTA GLABRA* (*TTG*), *GLABRA2* (*GL2*), *GLABRA3/ ENHANCER OF GLABRA3* (*GL3/EGL3*), *ROOTHAIRLESS* (*RHL*), *ECTOPIC ROOT HAIR* (*ERH*), *TORNADO* (*TRN*), *JACKDAW* (*JKD*), *SCRAMBLED* (*SCM*), *CAPRICE* (*CPC*), entre otros (Molendijk y cols., 2001; Grierson y cols., 2014;

Salazar-Henao y cols., 2016; Shibata y Sugimoto, 2019; Vissenberg y cols., 2020; Li y cols., 2022).

El crecimiento del pelo radical es polarizado, se restringe a la región apical de la célula (Kubenova y cols., 2022; Stéger y Palmgren, 2022) y es regulado por el citoesqueleto (Takatsuka y Ito, 2020), el tráfico vesicular (Novák y cols., 2016; Stanislas y Jaillais, 2019), la endocitosis, la exocitosis y la remodelación de la membrana plasmática y la pared celular (Gu y Nielsen, 2013). En la zona tubular de los pelos radicales en crecimiento, el citoplasma se concentra en las regiones apical y subapical, mientras que la región basal está ocupada por una gran vacuola (Sieberer y Emons, 2000; Grierson y cols., 2014; Zhang y cols., 2019; Singh y cols., 2021; Stéger y Palmgren, 2022). En la región citoplasmática subapical se encuentra el núcleo, el cual se mueve hacia la parte apical del pelo radical, acompañando el crecimiento polar del pelo radical en crecimiento (Ketelaar y cols., 2002; Sieberer y cols., 2002; Brueggeman y cols., 2022). Durante la simbiosis, el núcleo también se posiciona en la parte apical del pelo radical infectado con rizobia y delante del hilo de infección epidermal, para guiar la formación del hilo de infección.

La pared celular vegetal está compuesta por proteínas y polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina (Loix y cols., 2017); de donde, los procesos de remodelación de la pared celular involucran la deposición, endocitosis, hidrólisis, esterificación, oxidación y reciclaje de componentes de pared celular (Grierson y cols., 2014; Barnes y Anderson, 2018; Anderson y Kieber, 2020). En conjunto, estas actividades contribuyen a la relajación y flexibilidad de la pared celular, lo que propicia la plasticidad que permite los cambios morfológicos y el encorvamiento del ápice del pelo radical en respuesta a la rizobia (Peleg-Grossman y cols., 2007; Emons y Ketelaar, 2009; Su y cols., 2023).

Los pelos radicales en pleno crecimiento polar son los que establecen el diálogo molecular con rizobia, lo que conduce a la infección epidermal e inicio de la nodulación (Madsen y cols., 2004; Oldroyd y cols., 2011; Fournier y cols., 2015). En buena medida, el éxito en la formación de un nódulo fijador de nitrógeno está determinado por una fina coordinación entre la infección epidermal y la reactivación

de la división celular al inicio de la nodulación (Oldroyd y cols., 2011; Wang y cols., 2018; Chakraborty y cols., 2022; Yang y cols., 2022).

1.3.2 Diálogo molecular entre rizobia y el pelo radical susceptible a la infección

En términos generales, el diálogo molecular que detona el inicio de la nodulación se establece cuando la rizobia sensa compuestos de tipo flavonoide, exudados por la raíz de la leguminosa, lo que activa la expresión de un grupo de genes bacterianos de nodulación (genes *nod*), responsables de la síntesis y secreción de moléculas señalizadoras tipo lipoquitooligosacáridos, conocidos como factores Nod o FN (Wang y cols., 2012; Yang y cols., 2022). A su vez, los FN son percibidos por receptores tipo cinasa con dominios LysM, conocidos como *LjNFR1/NFR5*, *MtLYK3/NFP* o *PsSYM37/SYM10*, presentes en el ápice de pelos radicales (Figura 3; Limpens y Bisseling, 2003; Radutoiu y cols., 2003; Arrighi y cols., 2006; Zhukov y cols., 2008). En respuesta, en el pelo radical se desencadenan una serie de eventos de tipo: fisiológico (*p.e.* influjo y oscilaciones de calcio, y producción de especies reactivas de oxígeno o ROS, entre otros), molecular (*p.e.* expresión de genes, cascadas de señalización mediadas por el receptor SYMRK, remodelación de la pared celular, entre otros) y celular. Entre las respuestas celulares reportadas se encuentran la suspensión temporal del crecimiento tubular del pelo radical, la reorganización del citoesqueleto en el ápice del pelo radical, la acumulación de vesículas, el desplazamiento del núcleo hacia la zona apical, así como el hinchamiento y la deformación de esta zona del pelo radical (Cárdenas y cols., 1995, 2000; Timmers y cols., 1999; Esseling y cols., 2003; Sieberer y cols., 2005; Oldroyd y Downie, 2008; Maekawa-Yoshikawa y Murooka, 2009; Wang y cols., 2012; Perrine-Walker y cols., 2014). El lapso en el que se presentan estos eventos varía entre leguminosas.

La relajación y flexibilidad de la pared celular, asociada a actividades enzimáticas de modificación de la organización de pectinas, y celulosa, y de endocitosis-exocitosis, propician la plasticidad que permite los cambios morfológicos y el encorvamiento del ápice del pelo radical que preceden la infección epidermal con

rizobia (Peleg-Grossman y cols., 2007; Emons y Ketelaar, 2009; Xie y cols., 2012; Wang y cols., 2015; Liu y cols., 2019; Liu y cols., 2023; Su y cols., 2023).

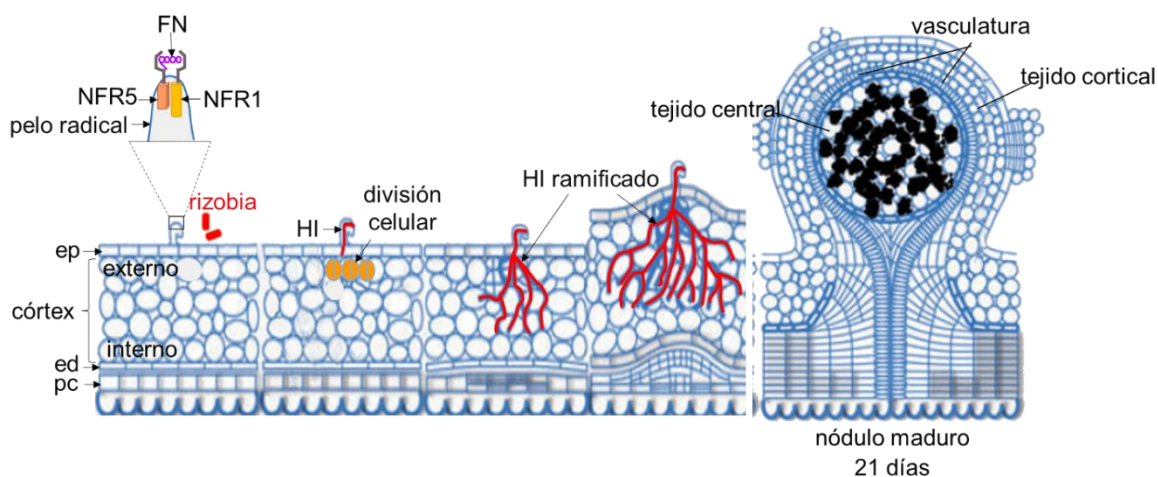


Figura 3. Esquema de la organogénesis del nódulo determinado. Los factores Nod (FN) son percibidos por receptores específicos (*LjNFR1/NFR5*, en *Lotus japonicus*), presentes en la membrana plasmática de los pelos radicales de la raíz, lo que promueve que las rizobias queden atrapadas en una cámara de infección. La colonización de rizobias se inicia en los pelos radicales a través de hilos de infección (HI), que se originan por la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical. El HI sigue un crecimiento polar hacia las capas celulares internas, alcanzando el primordio del nódulo, formado por la activación de la división celular en el córtex. Los primordios de nódulos dan lugar a nódulos maduros, en los que las bacterias se liberan del HI en simbiosomas y se diferencian para convertirse en bacteroides fijadores de nitrógeno. A los 21 días, en *P. vulgaris*, se ha desarrollado un nódulo maduro. ep, epidermis; ed, endodermis; pc, periciclo. Esquema modificado de Ferguson y cols., 2010.

1.3.3 La cámara de infección

El encorvamiento del pelo radical en respuesta al diálogo molecular con rizobias suele tener un giro de 180-360° (Esseling y cols., 2003), de donde se dice que el ápice se enrosca. En el pliegue que genera el enroscamiento del pelo radical, las rizobias quedan atrapadas y proliferan para formar una microcolonia. A este entorno extracelular se le conoce como cámara de infección (ver Figura 4A). La composición de la matriz de la cámara de infección aún no ha sido caracterizada, pero se sabe que contiene exopolisacáridos y lipopolisacáridos de origen bacteriano (Jones y cols., 2008; Kawaharada y cols., 2017; Maillet y cols., 2020). También se han

identificado glicoproteínas de matriz extracelular vegetal, por ejemplo, extensinas (MtN12, PsRNE1), proteínas ricas en prolina (MtENOD11/MtENOD12), así como la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP721e), entre otras (Rathbun y cols., 2002; Brewin, 2004; Xie y cols., 2012; Fournier y cols., 2015; Rae y cols., 2021; Tsyganova y cols., 2021; Lace y cols., 2022). En preparación para la infección, la cámara de infección se expande paulatinamente (Van Brussel y cols., 1992; Brewin, 2004; Murray, 2011). En pelos radicales de *M. truncatula* esta expansión transcurre en un lapso de 10 a 20 hrs (Fournier y cols., 2015).

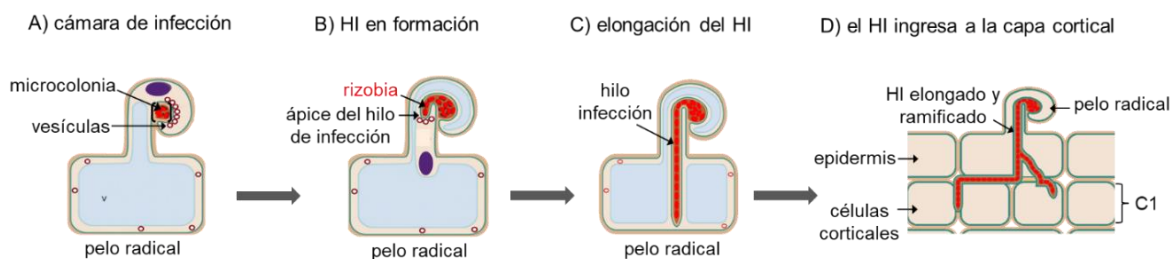


Figura 4. Esquemización del proceso de infección epidermal. **A)** En presencia de la rizobia, el ápice del pelo radical se encorva alrededor de la bacteria para formar una cámara de infección, en donde la bacteria prolifera para formar una microcolonia. En este sitio, se origina una invaginación de la membrana plasmática del pelo radical que dará lugar a la formación del hilo de infección (HI) colonizado por bacterias **(B)**. **C)** El HI se elonga como una estructura tubular hacia la base del pelo radical. **D)** Posteriormente, el HI sale del pelo radical infectado e ingresa a las células corticales subepidermales (C1) adyacentes al sitio de infección. En el caso particular de la nodulación en *P. vulgaris*, las células en C1 son las que presentan las primeras divisiones celulares (Van Spronsen y cols., 2001). A-D) Imágenes modificadas de Harrison e Ivanov, 2017).

Otra característica de la cámara de infección es la degradación de la pared celular, en la que participan tanto enzimas bacterianas (*p.e.* pectato liasa HrpW y celulasa CelC2; Robledo y cols., 2008; Fauvart y cols., 2009), como de origen vegetal, entre las que se encuentran poligalacturonasas (*MsPG3*; Muñoz y cols., 1998), pectin metilesterasas (Rodríguez-Llorente y cols., 2004; Su y cols., 2023) y pectato liasas (Xie y cols., 2012; Su y cols., 2023). La remodelación de la pared celular favorece que se genere una estructura transcelular conocida como hilo de infección (HI, o IT por siglas en inglés de “infection thread”; Figura 4B), por el que las rizobia acceden

a la raíz, lo que define el sitio de infección (Brewin, 2004; Gage, 2004; Fauvart y cols., 2009; Tsyganova y cols., 2021). En el proceso de maduración de la cámara de infección y el inicio de la formación del HI participan una batería de proteínas entre las que se encuentran NPL (siglas en inglés de “Nodulation Pectate Lyase”), una enzima pectato liasa que promueve la degradación de la pared celular en la cámara de infección y del del HI (Xie y cols., 2012; Liu y cols., 2019); VAMP721e (siglas en inglés de “Vesicle-Associated Membrane Protein721e”), involucrada en la exocitosis de NPL (Fournier y cols., 2015; Gavrin y cols., 2016; Su y cols., 2023); LIN (LUMPY INFECTION)/CERBERUS, una proteína con potencial actividad de E3 ubiquitin-ligasa, presenta un dominio U-box (modificación de dominio RING), y tres repetidos WD-40 (Kiss y cols., 2009; Yano y cols., 2009). Esta proteína está involucrada en la progresión del HI y el desarrollo del nódulo, el fenotipo de la mutante *cerberus* muestra hilos de infección que permanecen en la epidermis (Yano y cols., 2009). ARPC1 (siglas en inglés de “Actin-Related Protein Component 1”), que participa en la nucleación de actina y el reordenamiento del citoesqueleto durante la formación del HI (Hossain y cols., 2012). También se han identificado factores de transcripción, entre los que se encuentran NIN (acrónimo de Nodule Inception), cuya función es central en la nodulación, ya que participa en la formación del HI, la inducción de la división en células corticales y la proliferación celular, funciones que median la regulación de la expresión de una batería de genes simbióticos, entre ellos, *NPL*, *NF-YA1*, *NF-YA2*, *RPG*, *CRE1* y *LBD16* (acrónimos de Nuclear Factor Y, A subunit, Rhizobium-directed Polar Growth, Cytokinin Response 1 y lob-Domain protein 16, respectivamente (Laloum y cols., 2014; Clavijo y cols., 2015; Rípodas y cols., 2019; Lebedeva y cols., 2021).

RPG es una proteína tipo "coil-coil", con una estructura compleja en la que el N-terminal presenta estructuras tipo alfa hélice y beta plegada, seguidas de una región intrínsecamente desordenada y un extremo C-terminal con estructura "coil-coil" que predice una función tipo enlace/acoplamiento ("tethering" en inglés); también porta una secuencia tipo NLS o de localización nuclear (Arrighi y cols., 2008). CYCLOPS/IPD3, un regulador de la formación del HI que induce la expresión de los genes de dos factores de transcripción *ERN1* y *NIN* (Liu y cols., 2019; Akamatsu y

cols., 2022); *ERN1* (acrónimo de Ethylene Responsive Factor Required for Nodulation 1), participa en la formación del HI y el desarrollo de primordios de nódulos, su expresión en la epidermis es dependiente del complejo formado por la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CCaMK) y CYCLOPS (Cerri y cols., 2016); NSP1 y NSP2 (siglas en inglés de “Nodulation Signaling Pathway 1 y 2”), los cuales forman un complejo transcripcional que regula la expresión de los genes *ENOD11*, *ERN1* y *NIN*, esenciales para el inicio de la simbiosis leguminosa-rizobia (Xiao y cols., 2014).

1.3.4 La infección epidermal

1.3.4.1 Formación del hilo de infección (HI)

El HI es una estructura tubular, transcelular, con crecimiento invertido, que tiene su origen en la invaginación de una sección de la membrana plasmática y la pared celular que rodea la cámara de infección y la secreción de material de la pared celular (Gage, 2004; Tsyganova y cols., 2021). Un modelo alternativo es el propuesto por Fournier y cols. (2015), en el que la cámara de infección se torna en un compartimento apoplástico que se expande de manera radial. En una segunda etapa, la expansión pasa a tener un punto de elongación con crecimiento polarizado, lo que conduce el inicio del desarrollo del HI (Fournier y cols., 2015).

Morfológicamente, el HI es una extensión tubular delimitada por un continuo de la pared celular y membrana plasmática del pelo radical, que se alarga (elonga) progresivamente desde la zona apical hacia a la base del pelo radical (Figura 4C) y cruza hacia la zona del córtex frente al sitio de infección (Figura 4D).

La "boca" del HI en formación es un continuo con la matriz de la cámara de infección, lo que permite el paso de las rizobia hacia el lumen del HI, es decir, las bacterias se encuentran físicamente separadas del citoplasma del pelo radical (Tsyganova y cols., 2021). El lumen del HI es un espacio apoplástico conformado por una matriz extracelular con componentes de origen vegetal (*p.e.* glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas arabinosiladas, extensinas, peroxidasas y cisteín-proteasas; Brewin, 2004) y bacteriano (*p.e.* exopolisacáridos y lipopolisacáridos; Monahan-Giovanelli y cols., 2006). En este entorno las rizobia proliferan y se

desplazan conforme el HI se elonga (Napoli y Hubbell, 1975; Brewin, 2004; Gage, 2004; Fournier y cols., 2008, 2015; Tsyganova y cols., 2021).

El crecimiento o elongación del HI en raíces de *Medicago* tiene un patrón escalonado en el que se detectan pulsos discretos de crecimiento, que van acompañados por rondas de crecimiento apical del HI seguidos de una fase de proliferación bacteriana (Gage, 2002; Esseling y cols., 2003). En el crecimiento apical del HI, la generación y remodelación de membrana plasmática y pared celular demandan una constante actividad de síntesis y exocitosis de lípidos, proteínas y polisacáridos, y enzimas vegetales y bacterianas. En la actividad de remodelación participan enzimas vegetales y bacterianas (Robledo y cols., 2008; Xie y cols., 2012; Tsyganova y cols., 2019). El proceso de crecimiento del HI también involucra modificaciones en la biología celular del pelo radical que porta un HI. El núcleo se desplaza desde la parte media de la zona tubular hacia el ápice del pelo radical enroscado y, conforme el HI inicia la elongación, revierte la direccionalidad de su movimiento para "guiar" al ápice del HI hacia la base del pelo radical (Sieberer y Emons, 2000; Gage, 2004). Este movimiento nuclear está regulado por rearrreglos de microtúbulos (Perrine-Walker y cols., 2014a; Su y cols., 2020; Jin-Peng y cols., 2022; Lace y cols., 2022; Zhang y cols., 2022; Singh y cols., 2023), formina (Liang y cols., 2021) y filamentos de actina mediados por la formación de los complejos SCAR/WAVE o ARP2/3 (Yokota y cols., 2009; Miyahara y cols., 2010; Hossain y cols., 2012; Qiu y cols., 2015). Si bien aún han sido poco explorados, se sabe que la ruta endocítica/exocítica y el tráfico vesicular son procesos celulares que acompañan la elongación del HI (Sieberer y Emons, 2000; Fournier y cols., 2008; Perrine-Walker y cols., 2014b; Suzaki y cols., 2015; Liu y cols., 2019; Tsyganova y cols., 2021). Recientemente, varios grupos documentaron la formación de un complejo multi-proteico denominado complejo infectosoma (Liu y cols., 2019; Roy y cols., 2020; Lace y cols., 2022; Li y cols., 2023). El infectosoma está formado por las proteínas VPY (VAPYRIN), LIN /CERBERUS, EXO70H4 (EXOCYST subunit H4) y RPG, sin excluir la posibilidad de una interacción con otras proteínas. VPY es una proteína que presenta un dominio tipo MSP (siglas en inglés de "Major Sperm

Protein”) y una serie de repetidos de anquirina ("ankyrin repeats", en inglés) en el extremo C-terminal (Murray y cols., 2011). Con excepción de EXO70H4, aún poco caracterizada en este contexto, las proteínas del infectosoma son esenciales para la formación del HI y su progresión hacia la zona cortical.

En la regulación de la infección epidermal, así como en la organogénesis del nódulo, las hormonas vegetales también juegan un papel muy importante. El etileno, las giberelinas, los brasinoesteroides y las citocininas regulan negativamente la infección epidérmica, mientras que las auxinas son reguladores positivos de este proceso (McGuinness y cols., 2020; Velandia y cols., 2022). El papel positivo de las auxinas se ha evidenciado por el bloqueo de las proteínas de biosíntesis de auxinas, como *LjTAR1* (acrónimo de Tryptophan Amino-transferase Related) y miembros de la familia YUC (YUCCA). Mutaciones en los genes *LjTAR1* y *YUCCA* reducen la formación de hilos de infección en Lotus (Nadziejka y cols., 2018). La mutación en el gen *MtARF16* (Auxin Response Factor 16) también desencadena una reducción en el número de HI en Medicago (Breakspear y cols., 2014).

Durante la organogénesis, se promueve la biosíntesis local de auxinas a través de la inducción de los genes *STYLISH* y *YUCCA* (*YUC2* y *YUC8*) mediada por la activación de LBD16, generando una acumulación de auxinas en las células corticales en división, lo que conduce al inicio de la organogénesis del nódulo al inhibir el transporte polar de auxinas (Schiessl y cols., 2019). Por ejemplo, la aplicación de auxinas exógenas o de inhibidores del transporte de auxinas induce la formación de estructuras tipo nódulos (pseudonódulos) en raíces de Medicago en ausencia de rizobia (Rightmyer y Long, 2011), indicando que el inicio de la división celular se correlaciona con la presencia de un máximo de auxina.

Mientras que, la señalización de citocininas juega un papel regulador negativo en la infección por rizobia, ya que en *L. japonicus*, la mutación del receptor de citocininas (*lhk1*, *Lotus histidine kinase1*) provoca en las raíces un fenotipo de hiperinfección epidermal (Murray y cols., 2007; Held y cols., 2014; Miri y cols., 2019).

1.3.5 División celular

Paralelo a la formación del HI, se induce la desdiferenciación y reactivación del ciclo celular en la zona de la raíz adyacente al sitio de infección. En el caso de la nodulación en *M. truncatula*, son las capas corticales C5/C6 y las células del periciclo las que inician las rondas de división, mientras que en *L. japonicus* corresponden a las capas C2/C3 (Hayashi y cols., 2000; Xiao y cols., 2014). En el caso de *P. vulgaris*, la primera división celular tiene lugar en la capa cortical C1, es decir, las células subepidermales (S-E) adyacentes al sitio de infección (Van Spronsen y cols., 2001). En esta leguminosa el HI sale del pelo radical para penetrar las células que han reactivado su ciclo celular (Tate y cols., 1994; Van Spronsen y cols., 2001; Cárdenas y cols., 2006).

Es importante mencionar que, sin distinción del tipo de nódulo, las primeras rondas de división celular son anticlinales, es decir, el plano de la división celular es perpendicular a la superficie de la raíz (Murray, 2011; Xiao y cols., 2014). Las rondas posteriores de división celular pueden ser tanto anticlinales como periclinales, y en ocasiones oblicuas (Ferguson y cols., 2010). Es de resaltar que, en buena medida, la definición del fenotipo de reactivación del ciclo celular al inicio de la nodulación se refiere, principalmente, a la observación histológica de células con menor tamaño que las células que flanquean el sitio de infección (Cárdenas y cols., 2006; Suzaki y cols., 2014). Este es un indicativo de división celular, no obstante, se requiere un análisis más profundo que lo sustente y brinde información sobre la etapa del ciclo celular en la que se encuentran las células.

Los mecanismos moleculares y la señalización responsables de la inducción de la desdiferenciación y reactivación de la división celular al inicio de la nodulación aún no han sido explorados a detalle; se sabe que la aplicación exógena de citocinas o FN en la zona de la raíz con pelos radicales en crecimiento induce la división de las células corticales, es decir, mimetiza lo que sucede en el córtex de la raíz inoculada con rizobia (Van Zeijl y cols., 2015). Un avance significativo en la comprensión de la participación de estas hormonas se obtuvo al identificar y caracterizar genes involucrados en nodulación, entre los que se encuentran los genes de biosíntesis, metabolismo, señalización, transporte y degradación de citocininas y auxinas

(Suzaki y cols., 2012; Mortier y cols., 2014; Kohlen y cols., 2018; Saňko-Sawczenko y cols., 2019; Schiessl y cols., 2019; Lin y cols., 2020; Gao y cols., 2021). En las raíces de *M. truncatula* y *L. japonicus* con pérdida de función de receptores de citocininas (mutantes *cre1* y *lhk1*, respectivamente) inoculadas con rizobia se forman HIs pero no se observa división en células corticales (Gonzalez-Rizzo y cols., 2006; Murray y cols., 2007; Suzaki y cols., 2013; Miri y cols., 2019), mientras que en las mutantes con ganancia de función de estos receptores se induce la división de células corticales en ausencia de rizobia, promoviendo la formación espontánea de estructuras tipo-nódulos (Tirichine y cols., 2007; Suzaki y cols., 2013; Held y cols., 2014). Estos resultados fueron reforzados al caracterizar genes involucrados en la activación de citocininas (LONELY GUY o LOG; Kurakawa y cols., 2007; Mortier y cols., 2014; Reid y cols., 2017). Estos fenotipos indican que la cascada de señalización por citocininas son necesarias para activar la división de células corticales que conduce a la organogénesis del nódulo. Respecto al papel de las auxinas, se sabe que la posición de las primeras células en reactivar la división coincide con la presencia y señalización de auxina (Pacios-Bras y cols., 2003; Suzaki y cols., 2012; Kohlen y cols., 2018; Gao y cols., 2021). Se postula que el balance en la acumulación y transporte polar de auxinas, mediado por las proteínas PIN y AUX/LAX, es también un aspecto crítico al inicio de la etapa de división celular, si bien el papel que tienen en el desarrollo de nódulos determinados e indeterminados es, aparentemente, diferente (Cai y cols., 2017; Kohlen y cols., 2018; Ng y Mathesius, 2018).

Adicionalmente, estudios recientes sugieren que la división celular al inicio de la nodulación está mediada por reguladores y redes transcripcionales reclutados de programas de desarrollo de la raíz, a saber, SHR-SCR (SHORTROOT-SCARECROW), factores de transcripción que se activan en respuesta a la infección por rizobia y son necesarios para la inducción de la división de células corticales. Las mutaciones en SHR o en SCR muestran una disminución en el número de nódulos en raíces de *Medicago* (Dong y cols., 2021); LBD16 promueve la biosíntesis de auxinas por la activación de los genes *STYLISH* y *YUCCAs*. La mutante *lbd16* presenta una reducción en la formación de raíces laterales, así como en el número

de nódulos en raíces de *Medicago* (Schiessl y cols., 2019). Mutaciones en los genes *MtWOX5* (*MtWUSCHEL*-related homeobox5) y *MtPLETHORA* (*MtPLT*) dan como resultado un número reducido de nódulos y/o nódulos en los que ha cesado la actividad del meristemo (Osipova y cols., 2012; Franssen y cols., 2015), por citar algunos.

1.3.6 Coordinación entre la infección epidermal y la división celular

El conocimiento actual sobre la coordinación entre el proceso de infección epidermal, vía formación del HI, y la división celular al inicio de la nodulación se basa, principalmente, en el análisis del fenotipo de leguminosas mutantes descritas como como *HI minus* o *HI⁻* (*IT minus* o *IT⁻* por sus siglas en inglés), las cuales presentan deficiencias en la formación, elongación y avance del HI (ver [Anexos Tabla 1](#)). A los genes afectados en estas mutantes se les denominó nodulinas tempranas o ENODs (acrónimo en inglés de "early nodulins"; Limpens y Bisseling, 2003; Radutoiu y cols., 2003; Bottomley y Myrold, 2006). Algunas de las mutantes *HI⁻* (p.e. *nin*, *symrk*, *dmi3*, entre otras; ver [Anexos Tabla 1](#)) también son deficientes en la reactivación del ciclo celular, es decir, tienen un fenotipo *ccd⁻* (siglas en inglés de "cortical cell division minus"). No obstante, en algunas de las mutantes *HI⁻* se observan eventos de división celular y la formación de estructuras tipo primordio, o estructuras pequeñas tipo nódulos, blancas, indicativo de no infección (ver [Anexos Tabla 1](#); Roy y cols., 2020). Estas características fenotípicas indican que las maquinarias genéticas que regulan la infección epidermal y la reactivación de la división celular en la nodulación están coordinadas de manera espacio-temporal.

Uno de los genes candidato a la función de coordinador de ambos procesos es el factor de transcripción NIN, ya mencionado en las secciones anteriores. NIN, el miembro fundador de la familia de factores de transcripción NLP (siglas en inglés de "NIN-Like Protein"), tiene un papel central en la regulación de la expresión de genes asociados con la remodelación de la pared celular, la infección epidermal, la división celular, la síntesis y señalización hormonal (auxinas, giberelinas y jasmonato), el reordenamiento del citoesqueleto, activación de la replicación del

DNA y la traducción, ciclo celular, entre otros (Vernié y cols., 2015; Liu y cols., 2019; Schiessl y cols., 2019; Lebedeva y cols., 2021).

1.4 La división de las células vegetales

El ciclo celular es una serie ordenada de eventos, finamente regulados, en donde la célula crece, duplica su material genético y se divide para dar lugar a dos células hijas (Jürgens y cols., 2015). Si bien el ciclo celular en plantas tiene algunas peculiaridades, en términos generales es similar al de células animales y otros eucariontes. El ciclo celular comprende la interfase (estado de no división) y la fase M (estado de división). A su vez, la interfase se subdivide en tres fases: G1, S y G2 (Francis, 2007; Sablowski y Gutierrez, 2022). En la fase G1, la célula crece, las células sintetizan proteínas, orgánulos, incluidos los ribosomas y las mitocondrias, y aumentan de tamaño. En células vegetales, en esta fase se inicia el proceso de definición del plano de la división celular y el núcleo se desplaza hacia esta posición (Facette y cols., 2019). La función de la fase S es la síntesis o replicación del DNA, cuyo propósito es duplicar el material genético que posteriormente será distribuido entre los núcleos de las futuras células hijas. En la fase G2 o fase premitótico, el plano de la división celular queda definido de manera precisa y la célula se prepara para la mitosis (Monroy-Morales y cols, 2021; Sablowski y Gutierrez, 2022). Al final de la fase G2, la organización de los microtúbulos transita de una configuración cortical, próxima a la periferia celular, hacia la formación de un anillo transitorio, conocido como banda de preprofase (PPB, siglas en inglés de “preprophase band”; ver [Figura 5](#); Rasmussen y Bellinger, 2018; Monroy-Morales y cols., 2021; Sablowski y Gutierrez, 2022).

Formación de la PPB

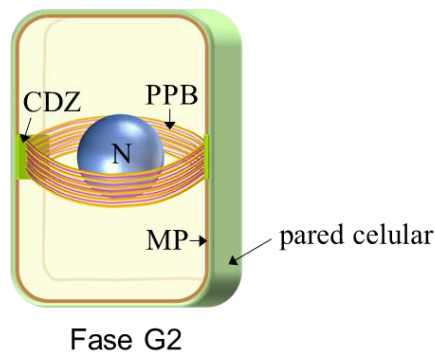


Figura 5. La banda de la preprofase o PPB. Al final de fase G2 de la célula premitótica (en preprofase), se forma la banda de la preprofase o PPB (siglas en inglés de preprophase band), un anillo transitorio formado por microtúbulos y filamentos de actina, que se organiza alrededor del núcleo y predetermina el plano de la división celular. Imagen tomada de Monroy-Morales y cols., 2021.

La PPB está constituida, principalmente, por microtúbulos (MTs), microfilamentos de actina (MFs), en menor proporción, y múltiples proteínas interactoras. La PPB se ensambla en la zona de división cortical o CDZ (siglas en inglés de “cortical division zone”) de la célula, alrededor del núcleo, y predetermina el plano de división celular (Rasmussen y Bellinger, 2018). La PPB se desensambla al inicio de la mitosis, en la transición profase/prometafase y posterior al desensamble de la envoltura nuclear (Smertenko y cols., 2017; Vavrdová y cols., 2019; Sablowski y Gutierrez, 2022).

Es importante puntualizar que las fases G1, S y G2 se suceden como un continuo, siendo difícil precisar el punto de inicio de cada una, por lo que se suelen definir como una transición G1/S, S/G2 y G2/M. La transición entre las fases G1/S y G2/M requiere de puntos de control medulares (checkpoints, en inglés), regulados por el ensamblado, actividad, inhibición y degradación de complejos proteicos específicos de fases del ciclo celular, llamados cinasas dependientes de ciclina (CDK, “Cyclin-Dependent Kinases), así como ciclinas y complejos transcripcionales específicos (Barnum y O’Connell, 2014; Wang, 2021; Sablowski y Gutierrez, 2022).

La fase M comprende la mitosis y la citocinesis, dos procesos estrechamente acoplados. En la mitosis tiene lugar la cariocinesis o división del núcleo, cuyo proceso se subdivide en profase, metafase, anafase y telofase. En la profase, los

cromosomas se condensan, la membrana nuclear se desensambla y se forman las fibras del huso mitótico. En la metafase, los cromosomas se segregan hacia el plano ecuatorial. En la anafase, las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los extremos opuestos de la célula y, finalmente, durante la telofase, la envoltura nuclear comienza a reensamblarse alrededor de los cromosomas en descondensación para formar dos núcleos hijos y la nueva membrana celular se forma para generar dos células independientes (Civelekoglu-Scholey y Cimini, 2014).

Por último tiene lugar la citocinesis, un proceso de división del citoplasma y repartición de organelos entre las futuras células hijas, lo que concluye con la separación de las dos células hijas (Sablowski y Gutierrez, 2022).

En células vegetales, el proceso citocinético inicia en la anafase, entre los núcleos hijos, en el punto medio del plano de la división celular, en donde se organiza el fragmoplasto o aparato citocinético. La función del fragmoplasto es favorecer la formación *de novo* de la placa celular o PC (“cell plate”, en inglés; ver [Figura 6](#); ver [Anexo 2](#); Smertenko, 2018; Smertenko y cols., 2018). La formación de la PC requiere un proceso altamente coordinado de reordenamiento del citoesqueleto, acumulación y fusión de vesículas y maduración de la membrana (Hong y Verma, 2007; Shi y cols., 2023).

El fragmoplasto es una estructura transitoria con forma cilíndrica y muy dinámica, conformada por arreglos de MTs y MFs, forminas, cinesinas, componentes de la ruta de señalización de MAPK y complejos proteicos de nucleación, polimerización y organización de MTs y MFs, entre otros (Smertenko y cols., 2018). En el fragmoplasto, los MTs están organizados en dos arreglos bipolares cortos, en los cuales los extremos positivos (“plus ends” en inglés) de ambos están ubicados en la zona media del plano de la división celular, en contacto con la matriz de ensamblaje de la PC o CPAM (siglas en inglés de “cell plate assembly matrix”; Smertenko y cols., 2018; Monroy-Morales y cols., 2021).

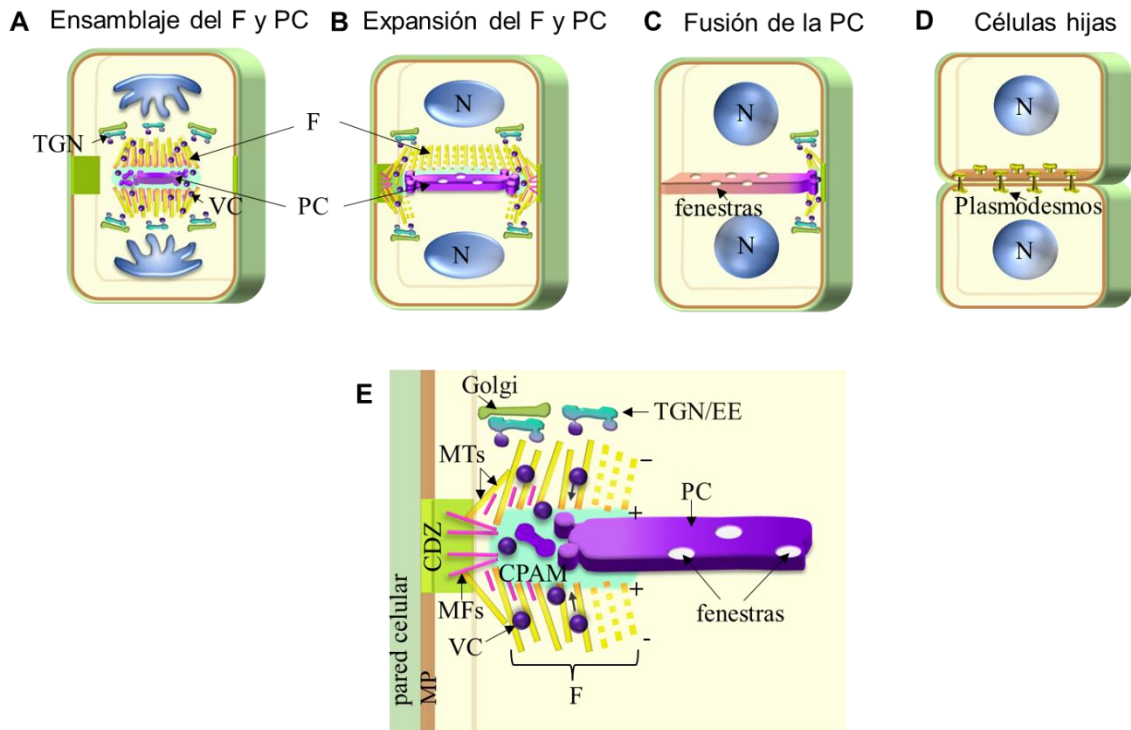


Figura 6. Citocinesis somática en plantas. **A)** En el centro del fragmoplasto o aparato citocinético, se inicia el ensamblaje *de novo* de una estructura endomembranosa o placa celular (PC), que surge por la activa acumulación y fusión de vesículas citocinéticas (VC) derivadas de la red trans-Golgi/endosoma temprano (TGN/EE, por siglas en inglés). **B)** La PC se expande hacia la periferia de la célula y se fusiona con la membrana plasmática parental **(C)**, separando las dos células hijas **(D)**. En **E)** se ilustra a detalle uno de los extremos de la PC en formación. Conforme la PC se expande radialmente, los MTs/MFs se desplazan hacia los extremos de la PC, gracias a una continua polimerización (zona de pre-expansión) y despolimerización (zona post-expansión) de los MTs, respectivamente. La región central de la PC presenta fenestraciones, que corresponde a zonas con menor fusión de vesículas. CDZ, zona de división cortical (siglas en inglés de “cortical division zone”); CPAM, matriz de ensamblaje de la placa celular (siglas en inglés de “cell plate assembly matrix”), en azul cian; F, fragmoplasto; MP, membrana plasmática, en café; MTs y MFs, microtúbulos y microfilamentos de actina, respectivamente, en amarillo; PC placa celular, en morado. Imagen modificada de Monroy-Morales y cols., 2021.

En la zona media del CPAM, y guiadas por los MTs, convergen las vesículas citocinéticas (ver [Figura 6](#)). Estas vesículas son de tipo recubiertas con clatrina o CCV (siglas en inglés de “clathrin coated vesicles”) y se originan en el organelo híbrido conocido como red trans-Golgi/endosoma temprano o TGN/EE (por siglas

en inglés de “transGolgi network/early endosome”; ver [Figura 7](#); ver [Anexo 2](#)). El destino de las vesículas citocinéticas es fusionarse para generar la PC, un compartimento, endomembranoso planar y transitorio ([Figuras 6B y 7](#); Sinclair y cols., 2022).

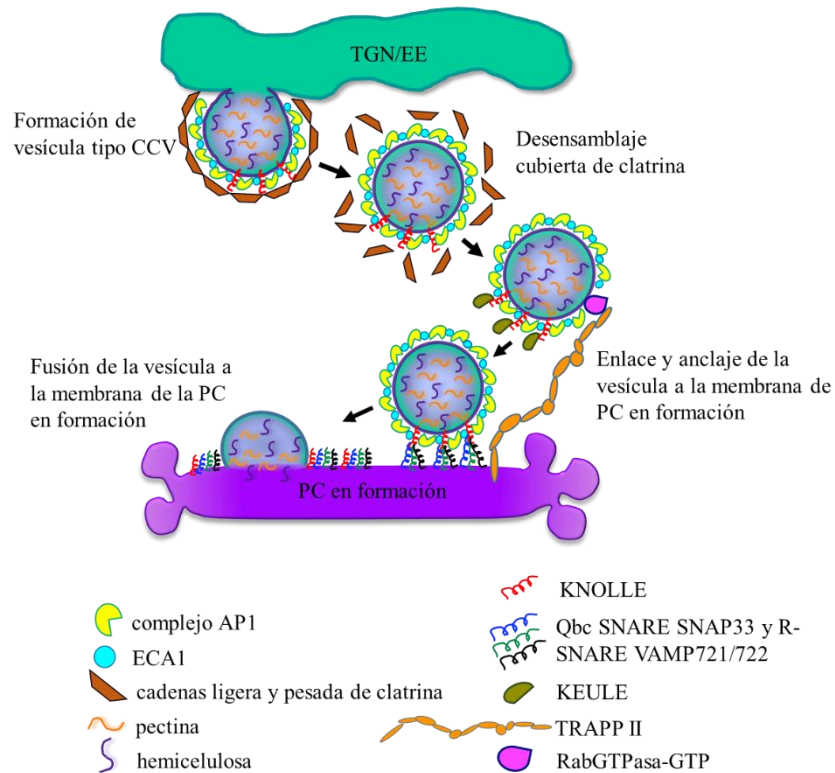


Figura 7. Esquemas del proceso de formación y fusión de vesículas citocinéticas para formar la placa celular (PC). Las vesículas citocinéticas son de tipo vesículas recubiertas de clatrina o CCV (siglas en inglés de “clathrin-coated vesicle”) y se originan en TGN/EE (siglas en inglés de “transGolgi network/early endosome”). Una vez escindidas, las vesículas pierden la cubierta de clatrina y se desplazan hacia el sitio de ensamblaje de la PC. La fusión de estas vesículas citocinéticas aporta los componentes de la membrana de la PC y de la pared celular (polisacáridos pectina y hemicelulosa que se sintetizan en el aparato de Golgi). Las vesículas tipo CCV se componen de cadenas ligeras y pesadas de clatrina, proteínas adaptadoras (complejo AP1) y proteínas accesorias tipo Epsin, como ECA1. A la vesícula citocinética en formación se incorpora KNOLLE, una syntaxina específica de la citocinesis vegetal y parte de la maquinaria de fusión de vesículas citocinéticas y PC. La fusión está mediada por el complejo SNARE conformado por KNOLLE y otras proteínas SNARE presente en la membrana blanco o diana, en este caso de la PC. KEULE es una proteína citosólica que interactúa con KNOLLE para inhibir la formación del complejo SNARE, mientras que la interacción entre una RabGTPasa, asociada a la vesícula, y complejo enlazante TRAPP II, presente en la membrana de la PC, favorece el

acercamiento de las membranas a fusionarse y la formación del complejo SNARE. El evento de fusión implica que la membrana vesicular pase a formar parte de la membrana de la PC y que las moléculas transportadas en la vesícula (p.e. hemicelulosa y pectina) sean depositadas en el lumen de la PC. Imagen modificada de Monroy-Morales y cols., 2021.

El proceso de fusión de vesículas citocinéticas está regulado por una batería de RabGTPasas, factores de anclaje tipo TRAPP II, componentes del complejo exocisto (SEC6, SEC15B, EXO70A1, EXO84B, entre otros) y las proteínas SNARE KNOLLE/SPY111, SYP132, SYP121/PEN1, NPSN11, SNAP33, VAMP722, entre otras ([Anexos Tabla 2](#); Shi y cols., 2023). Al origen, la fusión de vesículas es homotípica, pero la llegada de nuevas vesículas propicia una fusión heterotípica que hace que la PC se expanda de forma radial, es decir, la PC inicia en el centro de la célula y se expande hacia la periferia de la célula parental, por lo que se dice que tiene un crecimiento centrífugo (ver [Figura 6B](#)). La constante fusión de vesículas enriquece la composición de la PC. Las vesículas citocinéticas transportan componentes de membrana (proteínas y lípidos, principalmente), así como los complejos enzimáticos transmembranales celulosa sintasa y calosa sintasa, los cuales, por fusión de membranas se incorporan a la membrana de la PC (Miar y cols., 2014; Park y cols., 2014). Por lo tanto, la celulosa y la calosa son sintetizadas en la membrana de la PC y se vierten al lumen de la PC. La calosa es el polisacárido más abundante en la PC, se acumula transitoriamente durante la expansión de la PC para ser reemplazada por celulosa cuando la PC madure (Jawaid y cols., 2022). Por otro lado, las vesículas citocinéticas también portan componentes de pared celular, como pectinas y hemicelulosa, que se sintetizan en el aparato de Golgi (Rosquete y cols., 2018; Sinclair y cols., 2022). De donde, conforme la PC madura, la membrana se enriquece en los componentes propios de la futura membrana plasmática de las células hijas. A su vez, el lumen de la PC derivará en la pared celular de las células hijas (Sinclair y cols., 2022).

En las zonas de la PC con baja fusión de vesículas se originan fenestras o ventanas que conectan las zonas citosólicas que flanquean la PC, las cuales derivarán en plasmodesmos (Seguí-Simarro y cols., 2004; Sinclair y cols., 2022).

El borde o periferia de la PC en etapa de expansión está delimitado por el arreglo de MTs y MFs en constante actividad de polimerización (en la zona pre-expansión) y despolimerización (en la zona post-expansión). En la telofase tardía, el borde de la de la PC se aproxima a la membrana plasmática parental en dirección a la zona de división cortical (CDZ), el fragmoplasto se desensambla y se observa la fusión de la de la membrana de la PC con la membrana plasmática parental (Figura 6), lo que concluye la citocinesis, dando lugar a la separación de las dos células hijas (Lin y cols., 2019; Sablowski y Gutierrez, 2022).

Como referencia, en *Arabidopsis* la citocinesis transcurre en un periodo de 30 min (Zhang y cols., 2011), mientras que en *N. tabacum* dura 40 minutos (van Oostende-Triplet y cols., 2017).

1.5 KNOLLE, una sintaxina específica de la citocinesis

Entre los genes que regulan la correcta fusión vesicular para formar la PC está el gen llamado *KNOLLE*, también conocido como *SYP111* (acrónimo en inglés de “SYNTAXIN OF PLANTS 111”; Lauber y cols., 1997; Touihri y cols., 2011). La caracterización fenotípica de mutantes *knolle* marcó la pauta para determinar la función de este gen. Las plántulas de mutantes *knolle* de *Arabidopsis* tienen forma de tubérculo (“knolle”, en alemán), lo que dio nombre al gen afectado (Mayer y cols., 1991). El análisis histológico y por microscopía electrónica de embriones *knolle* reveló un fenotipo de citocinesis deficiente, en el que se observaron células binucleadas, parcialmente separadas por fragmentos de pared celular, y la acumulación de vesículas no fusionadas presentes en el plano de la división celular. En su conjunto este fenotipo corresponde a una división celular incompleta (Lukowitz y cols., 1996). La función de *KNOLLE* ha sido estudiada, principalmente, en el meristemo apical de raíz (RAM por sus siglas en inglés) de *Arabidopsis* y en células en cultivo BY2 de *Nicotiana tabacum* (Zhang y cols., 2011; van Oostende-Triplet y cols., 2017).

El gen unicopia *KNOLLE* se transcribe específicamente en la etapa G2 del ciclo celular, pero el transcrito se traduce en mitosis y la proteína se degrada al concluir la citocinesis (Lukowitz y cols., 1996; Lauber y cols., 1997; Reichardt y cols., 2007;

El Kasmi y cols., 2013). La especificidad de la transcripción del gen *KNOLLE* está determinada por los elementos de regulación en *cis* llamados MSA (siglas en inglés de “Mitosis-Specific Activator”; Ito y cols., 1998) presentes en los promotores de *AtKNOLLE* (Ito y cols., 1998), *PvKNOLLE* (Ayala Guzmán, E, 2016; Bucarey-Ruiz, F.C.A, 2021) y un conjunto de genes de ciclo celular (Menges y cols., 2005; Haga y cols., 2011; Ito y cols., 2001; Jin-Peng y cols., 2022; Zheng y cols., 2022).

La proteína KNOLLE, de aproximadamente 34 kDa, es una syntaxina o proteína Qa-SNARE específica de citocinesis (Touihri y cols., 2011). Las proteínas Qa-SNARE se caracterizan por tener haces de tres α -hélice antiparalelas (Habc) en el extremo N-terminal, separadas del dominio SNARE por una secuencia conectora, y un dominio transmembranal hacia el extremo C-terminal (Figura 8).



Figura 8. Esquema de la estructura primaria de KNOLLE. Imagen modificada de Monroy-Morales y cols., 2021.

El dominio SNARE (acrónimo en inglés de “Soluble NSF Attachment Protein Receptor”) es de aproximadamente 60-70 aminoácidos, dispuestos en repeticiones de heptadas, está presente en las proteínas de las subfamilias SNARE (Qa-SNARE, Qb-SNARE, Qc-SNARE, Qbc-SNARE y R-SNARE). Las proteínas SNARE, esenciales para la fusión de membranas, forman complejos SNARE tri o tetraméricos conformados por dos proteínas SNARE presentes en la membrana donadora y una o dos en la membrana aceptora (Jahn y Scheller, 2006). KNOLLE está presente en la membrana de las vesículas citocinéticas (membrana donadora; Figura 7). La evidencia experimental indica que, KNOLLE puede formar dos complejos SNARE diferentes: 1) KNOLLE/SNARE-SNAP33/R-SNARE-VAMP721/722 y 2) KNOLLE/Qb-SNARE NPSN11/Qc-SNARE-SYP71/R-SNARE-VAMP721/722, que contribuyen a la fusión de membranas en la citocinesis (El Kasmi y cols., 2013).

En resumen, KNOLLE se requiere específicamente para la fusión de vesículas citocinéticas, lo que da lugar a la formación de la placa celular durante la citocinesis (Lukowitz y cols., 1996; Lauber y cols., 1997; Waizenegger y cols., 2000; Touihri y cols., 2011; Steiner y cols., 2016). Al final de la citocinesis KNOLLE se dirige a la vacuola para su degradación (Reichardt y cols., 2007). Por lo que en este proyecto se utilizó una versión fluorescente de *PvKNOLLE* (YFP-*PvKNOLLE*) para visualizar la formación de la PC e identificar las células que han iniciado la citocinesis en el sitio de infección con rizobia en raíces de *P. vulgaris*.

2. ANTECEDENTES

En la tesis de licenciatura de E. Ayala Guzmán (2016), realizada en nuestro grupo de trabajo, se reportó la identificación y caracterización del promotor del gen *KNOLLE* (prom*PvKNOLLE*) de *P. vulgaris*, cuyo número de acceso es Phvul.004G077900.1. El fragmento definido como prom*PvKNOLLE* comprende la secuencia de 1.76 kb localizada río arriba del codón de inicio de la traducción de *PvKNOLLE*. Este fragmento presenta tres copias de los elementos en *cis* MSA, presentes en el promotor de una serie de genes específicos de la transición G2/M del ciclo celular (Ito y cols., 2001; Menges y cols., 2005; Haga y cols., 2011; Gao y cols., 2022; Zheng y cols., 2022). El análisis de la especificidad espacio-temporal de la actividad de la fusión transcripcional prom*PvKNOLLE*::GFP-GUS en raíces transgénicas de *P. vulgaris*, confirmó de manera fehaciente que el fragmento prom*PvKNOLLE* tiene una actividad de promotor muy activo en la zona de proliferación del RAM, si bien también se observa actividad en la zona de transición entre las zonas meristemática y de elongación (Figura 9A) así como en primordios de raíces laterales (Figura 9B-C). En las raíces inoculadas con rizobia, la actividad se observó en primordios de nódulos (Figura 9D, E), y en las células corticales subepidermales (S-E) que subyacen el sitio de infección epidérmica (Figura 9F).

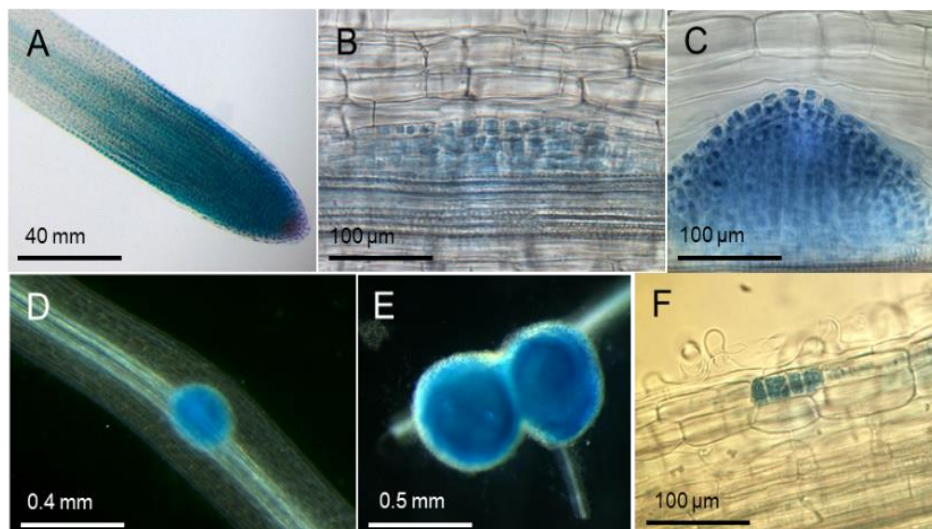


Figura 9. Actividad espacio-temporal del promotor *PvKNOLLE* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* no inoculadas (A-C) e inoculadas con rizobia (D-F). El promotor es activo en

células de: **A)** meristemo apical de la raíz (RAM), **B** y **C)** de primordio de raíz lateral en formación, **D)** de primordio del nódulo, **E)** nódulo joven y **F)** subepidermales adyacentes al sitio de infección. La actividad de *promPvKNOLLE::GFP-GUS* se determinó como tinción histoquímica de la actividad de GUS. Tomada de tesis de licenciatura de E. Ayala Guzmán (2016).

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento actual de los eventos celulares que se desencadenan al inicio de la nodulación indica que el desarrollo del HI y la reactivación del ciclo celular en células corticales son eventos coordinados, pero ¿cómo es la dinámica entre estos eventos? ¿cómo es la dinámica de la citocinesis durante el proceso de infección en la capa S-E adyacente al sitio de infección con rizobia?

Para responder a estas preguntas, en este trabajo se planteó visualizar *in vivo*, y en paralelo, el avance del HI, el estatus de división celular y la citocinesis en las células subepidermales (capa S-E) en el sitio de infección en raíces transgénicas de *P. vulgaris* inoculadas con rizobia.

4. HIPÓTESIS

La formación de la placa celular durante la citocinesis en las células subepidermales (S-E) adyacentes al sitio de infección con rizobia está coordinada con la llegada del hilo de infección a la base del pelo radical en raíces de *P. vulgaris*.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la dinámica del avance del hilo de infección en relación con la formación de la placa celular en las células subepidermales adyacentes al sitio de infección con rizobia en raíces de *Phaseolus vulgaris*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Realizar un análisis de la acumulación de transcrito de *PvKNOLLE* en secciones de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *Rhizobium etli* CE3 vs no inoculadas mediante RT-qPCR.
- II. Determinar la distribución subcelular del marcador molecular de citocinesis, YFP-*PvKNOLLE*, en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que portan p*PvKNOLLE*::YFP-*PvKNOLLE*, no inoculadas e inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604.
- III. Visualizar el avance del hilo de infección epidermal y la citocinesis en las células subepidermales a diferentes tiempos post-inoculación con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que portan p*PvKNOLLE*::YFP-*PvKNOLLE*.
- IV. Analizar la longitud celular y la posición del núcleo en las células adyacentes al sitio de infección y la formación del hilo de infección con *R. etli* CE3-DsRed pMP604.

6. METODOLOGÍA

6.1 Germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* cv Negro jamapa

Las semillas de *P. vulgaris* se lavan con agua de la llave, este paso se repite de 5 a 8 veces, hasta que las semillas de frijol queden limpias (libres de polvo). Posteriormente, en campana de flujo laminar, las semillas se esterilizan con etanol al 100% por 1 min, se realizan aproximadamente tres lavados con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a etanol. Después se incuban las semillas en hipoclorito al 20% durante 5 min, se hacen 5 lavados con agua destilada estéril. La germinación se realiza en charola estéril sobre un papel absorbente humedecido con medio Fähræus líquido estéril (el cual contiene CaCl₂, 90 mM; MgSO₄, 58.8 mM; KH₂PO₄, 73 mM; Na₂HPO₄, 1.08 mM; FeC₆H₅O₇, 204 mM y trazas Gibson: MnSO₄, 120 µM; ZnSO₄, 76.5 nM; H₃BO₃, 460 µM; CuSO₄, 32 nM y H₂MoO₄, 38.8 nM), y se incuba a 28°C durante 48 hrs en oscuridad.

6.2 Extracción de RNA total

La muestra de cada sección de raíz: ápices, pelos radicales, o zona de diferenciación rasurada (desprovista de pelos radicales) se congela en presencia de nitrógeno líquido y se tritura en mortero por separado, en presencia de nitrógeno líquido. Una vez pulverizado el tejido, se pasa a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agrega 1 ml de Trizol (suspensión que contiene fenol e isotiocianato de guanidina, Invitrogen) por cada 100 mg de tejido y se mezcla con ayuda de un vórtex. Se agregan 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v:v) y se mezcla con ayuda de vórtex durante 15 min. Se separan las fases mediante centrifugación a 12,000 x g durante 15 seg a 4°C; se pasa la fase superior a un tubo eppendorf de 1.5 ml que contiene 500 µl de isopropanol. Se homogeniza la mezcla y se centrifuga a 12000 x g durante 10 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante, y la pastilla se resuspende en 500 µl de LiCl 4M; posteriormente, el tubo se centrifuga a 3000 x g durante 10 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante, la pastilla se resuspende en 500 µl TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, 1 mM EDTA) y se agrega 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v:v). Después de mezclar con vórtex y centrifugar a 3000 x g por 10

min a 4°C, se pasa la fase superior a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregan 500µl de isopropanol y 66 µl de acetato de sodio 3M, pH 5.2, y se mezcla la suspensión con ayuda de vórtex. En seguida, el tubo eppendorf se centrifuga a 12,000 x g por 10 min a 4°C. Por último, se elimina el sobrenadante, y la pastilla se seca al aire para luego resuspender la muestra de RNA en 50 µl de H₂O DEPC. Para evitar degradación del RNA, las muestras se almacenan a -80°C. La determinación de la concentración de RNA en las muestras se realiza por nano-espectrofotometría (NanoDrop 2000, ThermoScientific).

6.3 Ensayos de RT-qPCR

Actualmente, la técnica de RT-qPCR (por sus siglas en inglés, Reverse Transcription - quantitative PCR) es el método más sensible para detectar y cuantificar un RNA específico presente en una muestra. La técnica utilizada combina dos procesos: 1) síntesis de cDNA a partir de RNA, por acción de una transcriptasa reversa, y 2) PCR cuantitativo o PCR en tiempo real con un par de oligonucleótidos específicos del transcrito de interés. Se procede como a continuación se describe: 1) para sintetizar el cDNA, se incuban 2 µg de RNA total, libre de DNA y 500 ng oligonucleótido oligo (dT) en un volumen de 10 µl, a 70°C durante 10 min, después se agregan 8 µl de una mezcla, preparada con 1 µl de dNTP's 10 mM, 3 µl de H₂O tetradestilada estéril y 4 µl de buffer de reacción 5X, y se incuba a 42°C durante 2 min. En seguida, se agrega 1 µl de la enzima comercial Maxima Reverse Transcriptase (200 U/µl, Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase) y se continúa la incubación a 50°C durante 30 min. Por último, se inactiva la enzima a 70°C durante 10 min. El cDNA se utiliza en reacción de qPCR o se guarda a -62°C. 2) La cuantificación por qPCR se realiza en un volumen de 15 µl de reacción que contiene: 50 ng de cDNA, 7.5 µl de reactivo SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) y 4.5 µl de H₂O tetradestilada estéril. Como transcrito de referencia se utilizó el mRNA de EF1 alfa (siglas en inglés de factor de elongación 1 alfa), un referente ampliamente utilizado por varios grupos, incluyendo el nuestro (Montiel y cols., 2013). Las reacciones de qPCR se llevan a cabo en el LightCycler®

96 Instrument (Roche). En la [Tabla 3](#) (ver Anexos), se enlistan los oligonucleótidos transcrito-específicos utilizados en las reacciones de qPCR. Se analizaron muestras de tres réplicas biológicas independientes, y cada muestra por triplicado.

6.4 Construcción de los cassettes de expresión

- La construcción del cassette de expresión *promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE* involucró 3 etapas de clonación: 1) construcción de *pENTR-PvKNOLLE* cds; 2) reacción de recombinación del fragmento *PvKNOLLE* cds en el vector de expresión en plantas *pEarleyGate104* y 3) sustitución de la secuencia *p35S* por la de *promPvKNOLLE*. Para las etapas de clonación, se procedió de la siguiente manera: 1) la secuencia codificante (cds, siglas en inglés de “coding sequence”) de *PvKNOLLE* (*PvKNOLLE* cds) fue identificada en la base de datos de Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>; número de acceso Phvul.004G077900), y amplificada mediante PCR a partir de cDNA total de ápice de raíz de *P. vulgaris*, utilizando oligonucleótidos secuencia-específicos *PvKNOLLE*-ATG y *PvKNOLLE*-stop. El producto de PCR de 953 pb fue clonado en el plásmido aceptor *pENTRTM/D-TOPO[®]*, siguiendo las indicaciones del proveedor (Invitrogen/ThermoFisher, https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pentr_dtopo_man.pdf). 2) Para generar la fusión transduccional *YFP-PvKNOLLE*, el fragmento *PvKNOLLE* cds fue recombinado en el vector de expresión en plantas *pEarleyGate104*, utilizando la mezcla de enzimas LR ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen/ThermoFisher), generando la construcción fue nombrada *pEarleyGate-p35S::YFP-PvKNOLLE*, para enfatizar que la expresión del cassette *YFP-PvKNOLLE* será bajo el control del promotor constitutivo *p35S*. 3) La construcción de *pEarleyGate104_pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE* requirió la amplificación por PCR del fragmento *promPvKNOLLE* utilizando como templado *pENTR-promPvKNOLLE* (tesis de licenciatura de E. Ayala Guzmán, 2016) con los oligonucleótidos *pPvKNL-FwEcoRI* y *pPvKNL-RvNcoI*, y su clonación para generar el plásmido *pENTR-EcoRI-promPvKNOLLE-NcoI*. Posteriormente, este plásmido fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* para liberar y purificar el fragmento *EcoRI-promPvKNOLLE-NcoI* (1,779 pb). En paralelo, el plásmido *pEarleyGate-*

p35S::YFP-PvKNOLLE (con dos sitios de corte con *EcoRI*), se le escindió la secuencia de p35S por digestión parcial con *EcoRI* y, posteriormente con *NcoI* y defosforilación con la enzima FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (ThermoFisher). Al DNA plasmídico resultante, pEarleyGate104-YFP-PvKNOLLE (10,422) con extremos *EcoRI* y *NcoI*, se le ligó el fragmento *EcoRI*-promPvKNOLLE-*NcoI*, en una reacción de ligación, con una relación molar 1:3 (vector, 10,422 pb:inserto, 1,779 pb) utilizando los reactivos del Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific), un volumen final de reacción de 20 μ l y una incubación a 22°C por 5 min. Por último, se utilizaron 5 μ l de la mezcla de ligación para transformar *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. La selección de clonas que portan el plásmido de interés, pEarleyGate104_promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE (12,2 kb) se realizó por PCR en colonia.

- Para generar la construcción pK2GW7-NLS-mTurquoise2 se diseñó una estrategia de amplificación por PCR de un cDNA quimérico (751pb), que codifica para una proteína fluorescente NLS-mTurquoise2. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos NTUR y mCherry LW y como templado el plásmido mTurquoise-ER (amablemente donado por el Dr. Takuya Nishigaki, IBt). El producto de PCR, XhoI-NLS-Turquoise2 fue clonado en pENTR™/D-TOPO® (pENTR-NLS-Turquoise) y subclonado por recombinación en el vector de expresión en plantas pK2GW7 para generar la fusión transcripcional p35S::NLS-mTurquoise2 en pK2GW7-NLS-mTurquoise2.

Todas las reacciones de clonación fueron transformadas en *E. coli* DH5 α quimiocompetentes, las clonas seleccionadas por PCR en colonia y secuenciación. La información de los oligonucleótidos utilizados se enlista en la [Tabla 3](#) (ver Anexos), y los esquemas de los diferentes plásmidos construidos durante el desarrollo de esta tesis se recapitulan en la [Figura Suplementaria S1](#) (ver Anexos).

6.5 PCR en colonia

Este método permite identificar qué colonias bacterianas portan el plásmido con el inserto de interés. El procedimiento es el siguiente: se resuspende una asada de la colonia bacteriana en un volumen de 20 μ l de H₂O tetradestilada estéril en tubo

ependorf, posteriormente, se lisan las bacterias mediante tres ciclos de congelación (-70°C) y de ebullición (100°C). El lisado se centrifuga (14000 rpm durante 60 seg) y se utiliza 1 µl del sobrenadante como templado en una reacción de PCR de 25 µl. La mezcla de PCR contiene: buffer con KCl 10X (2.5 µl), MgCl₂ 25 mM (1.6 µl), dNTP's 10 mM (0.5 µl), el par de oligonucleótidos M13 Fw y M13 Rv o bien un par de gene-específicos y 2 µl de la enzima recombinante Taq DNA Polymerase LC 1U/µl (Thermo Scietific) en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de reacción suelen ser: un ciclo a 98°C/2 min, 35 ciclos a 98°C/10 seg, 55°C/15 seg, 72°C/45 seg y 1 ciclo a 72°C/7 min. Como templado en la reacción de control positivo de amplificación se utiliza el fragmento usado como inserto en la clonación correspondiente. Como control negativo, la mezcla de reacción sin templado. Finalmente, se analizan 10 µl de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1% en fluoróforo intercalante de DNA GreenSafe (NYZ Tech)

6.6 Generación de raíces transgénicas en *Phaseolus vulgaris*

La generación de raíces transgénicas se basa en el protocolo descrito por el grupo del Dr. Federico Sánchez (Estrada-Navarrete y cols., 2007), con algunas modificaciones. En breve, las plantas de frijol, germinadas bajo condiciones de esterilidad durante 2 días a 28°C, se inoculan con una suspensión de *Agrobacterium rhizogenes* K599 que porta la construcción de interés. La inoculación se realiza alrededor del nodo del cotiledón, hiriendo levemente con la aguja de una jeringa para inmediatamente inyectar 5-10 µl de la suspensión de bacterias. Posteriormente, las plantas se transfieren a tubos de boca ancha que contienen un tubo falcon de 15 ml con medio Fähræus líquido. Las plantas se colocan en el cuarto de crecimiento (fotoperiodo de Luz / Oscuridad= 16 h/8 h, T= 28°C) durante 7-10 días hasta observar el desarrollo de pequeños tumores en el sitio de inoculación y la formación de primordios de raíces. Se determina cuáles de los primordios de raíz son transgénicos mediante observación directa de la planta bajo un estereomicroscopio con iluminación epifluorescente y utilizando como criterio de selección la fluorescencia de GFP. Se eliminan los primordios de raíz no fluorescentes para favorecer el desarrollo de las raíces transgénicas que expresen

la proteína quimérica. Previo a la observación al microscopio, se permite que las raíces fluorescentes se recuperen por dos días. Para su observación al microscopio, las raíces transgénicas se montan como se describe en la sección 6.8.

6.7 Inoculación de las raíces transgénicas con *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604

Para preparar el cultivo de la cepa *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604, tomar una asada del vial en glicerol e inocular en 100 ml de medio PY suplementado con 7 mM de CaCl₂, en matraz Erlenmeyer de 250 ml, he incubar a 30°C durante 24 h con agitación (300 rpm). Centrifugar el cultivo a 500 rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 7 ml de MgSO₄ 10 mM. Centrifugar, resuspender la pastilla en 7 ml de MgSO₄ 10 mM, medir absorbancia (longitud de onda 600 nm) de la suspensión. Inocular las raíces pilosas, de plantas transgénicas de 12 días post-inoculación, con *A. rhizogenes* K599 que portan el plásmido pEarleyGate-pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE, considerando diluir (con medio Fähræus) la suspensión bacteriana hasta ajustar a 0.05 unidades arbitrarias de absorción (longitud de onda 600 nm). Se considera que una unidad de absorbancia equivale a 5x10⁸ células por mililitro. Se agregan 10 ml de inóculo por planta (colocadas en macetas utilizando como sustrato de vermiculita) e incubar a 28°C en fotoperiodo de 16 h/8 h luz/oscuridad durante 2-5 días según los intervalos que demande el experimento (2, 3 y 5 días post inoculación). Posteriormente, para su observación al microscopio, las raíces transgénicas se montan como se describe en la sección 6.8.

6.8 Montaje de la planta con raíces transgénicas

A una caja Petri cuadrada (90 X 90 X 15 mm) se le hace un orificio rectangular, de aproximadamente 45 x 60 mm en el centro, que se cubre por la parte exterior de la caja Petri con un cubreobjetos (48 x 65 mm), pegado con silicón. Para evitar el maltrato de la planta, se hace una ranura en el borde de la caja de Petri en donde se colocará el tallo de la planta. Para el montaje de la planta con raíces transgénicas, se coloca la planta de manera que las raíces queden extendidas sobre el

cubreobjetos y el tallo en la ranura de la caja Petri. Se adicionan 2 ml de medio Fähræus líquido a las raíces, se coloca papel celofán sobre la raíz con la finalidad de que la raíz quede adherida al cubreobjetos y se procede a su observación al microscopio confocal.

6.9 Tinción DAPI

Las raíces silvestres de *P. vulgaris* se cosecharon 4 días después de la inoculación (dpi) con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 y se fijaron durante la noche en paraformaldehído (PFA) al 4% en una solución de PIPES 80 mM pH7. Luego, las muestras se enjuagaron tres veces durante 5 min en PIPES 80 mM pH 7.0 (Nadzieja y cols., 2019). Los núcleos de las raíces fijadas se tiñen con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) a 1 µg/ml en Triton X-100 al 0,1% (v/v) durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y se lavan tres veces con H₂O destilada y se procede al montaje de las raíces para su visualización mediante microscopia confocal.

6.10 Microscopía confocal

Las plantas transgénicas o silvestres de *P. vulgaris* se recolectaron y se colocaron en una placa de Petri cuadrada de poliestireno modificado (ver metodología 6.11) y se observaron en un microscopio de barrido láser confocal invertido FV1000 (con un objetivo seco de 40x/NA 0,75). Se tomaron imágenes de las muestras utilizando una línea láser de excitación/emisión [nm]: 405 nm/430-470 nm para detectar la señal de DAPI, mTurquoise2 y autofluorescencia; 488 nm/505–525 nm para YFP y 543 nm/560–660 nm par DsRed. La microscopia confocal permite el seccionamiento óptico de la muestra generando cortes ópticos sucesivos o pila en Z (o "z-stacks", en inglés). La distancia en µm entre cada corte óptico es de 0,8 a 1,0 µm. Las imágenes de YFP-*PvKNOLLE* se capturaron utilizando un microscopio de disco giratorio confocal Marianas 3I acoplado a un tipo invertido Zeiss Observer Z.1 (agua x40 objetivo 0.75 N.A., ZEISS, Jena, Alemania). El z-stack, puede ser procesado por softwares para crear una imagen 2D o 3D.

6.11 Procesamiento de imágenes

El análisis 2D de imágenes confocales se hace utilizando el software ImageJ/Fiji (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). Las imágenes en z se analizaron utilizando la proyección de máxima intensidad para generar imágenes 2D. Se aplicó deconvolución a cada pila de imágenes para cada canal. La deconvolución se realizó utilizando el complemento "Iterative Deconvolve 3D" en ImageJ y " Diffraction PSF 3D " para la creación de PSF teórico, con 4-10 iteraciones máximas. Para generar las reconstrucciones 3D, la pila z de dos canales (DAPI o NLS-mTurquoise2 + DsRed; canales YFP-*P ν* KNOLLE + DsRed; o bien canales NLS-mTurquoise2 + YFP-*P ν* KNOLLE) se fusionó y convirtió a formato RGB, utilizando el comando de menú Imagen › Tipo › Color RGB. Las reconstrucciones tridimensionales se crearon utilizando el software Vaa3D® (3D Visualization-Assisted Analysis).

7. RESULTADOS

Este proyecto de tesis se planteó en el contexto de una pregunta central: ¿cuál es la dinámica entre el hilo de infección y la división de las células corticales subepidermales (S-E) en raíces de *P. vulgaris* infectadas con rizobia? La estrategia propuesta fue la visualización de estos procesos por microscopía confocal *in vivo* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresan marcadores moleculares específicos.

7.1 Desarrollo de herramientas moleculares

Entre las herramientas moleculares desarrolladas se encuentran:

- una cepa de rizobia que expresa la proteína fluorescente DsRed (*Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604; Dávila-Delgado y cols., 2020).
- NLS-mTurquoise2, un marcador para visualizar núcleo.
- el cassette prom*PvKNOLLE*::YFP-*PvKNOLLE*, un marcador de citocinesis en células vegetales.

Rhizobium etli CE3-DsRed pMP604, una excelente herramienta para visualizar el proceso de infección *in vivo*

Uno de los principales obstáculos a superar al proponer un análisis por microscopía confocal al inicio de la nodulación en *P. vulgaris* es el grosor (~1.5 mm) que adquieren las raíces en esta leguminosa durante su desarrollo. Por lo que, reducir el lapso en el que se establece la infección con rizobia era una opción interesante. La alternativa a explorar fue caracterizar el proceso de infección con la cepa *R. etli* CE3 pMP604. El plásmido pMP604 codifica un gen *nodD* híbrido que confiere la activación, independiente de flavonoides, de la transcripción de los genes de síntesis y secreción de los FN. La inserción cromosomal de la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente, DsRed en la cepa *R. etli* CE3-DsRed pMP604, permite el rastreo del proceso de infección por microscopía confocal. Los datos obtenidos indicaron que *R. etli* CE3 pMP604, así como la versión que expresa una proteína roja fluorescente, *R. etli* CE3-DsRed pMP604, inician el proceso de infección 12-24 h antes que *R. etli* CE3 (Delgado-Dávila y cols., 2020). El análisis por microscopía confocal *in vivo* mostró que, en las raíces silvestres de 48 días post-

germinación inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604, la formación de microcolonias se detecta a partir de las 36 hpi (horas post-inoculación); a las 48 hpi, hubo en promedio 2.5 veces más eventos de infección (27.8 ± 5.5 SE) que en las raíces control inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed (10.7 ± 2.2 SE); en la misma proporción se encontró que a las 72 hpi, hubo un promedio de 295 (± 48.7 SE) y 116 (± 21.1 SE) eventos de infección, respectivamente (Figura 10A; ver Anexo 2; Dávila-Delgado y cols., 2020).

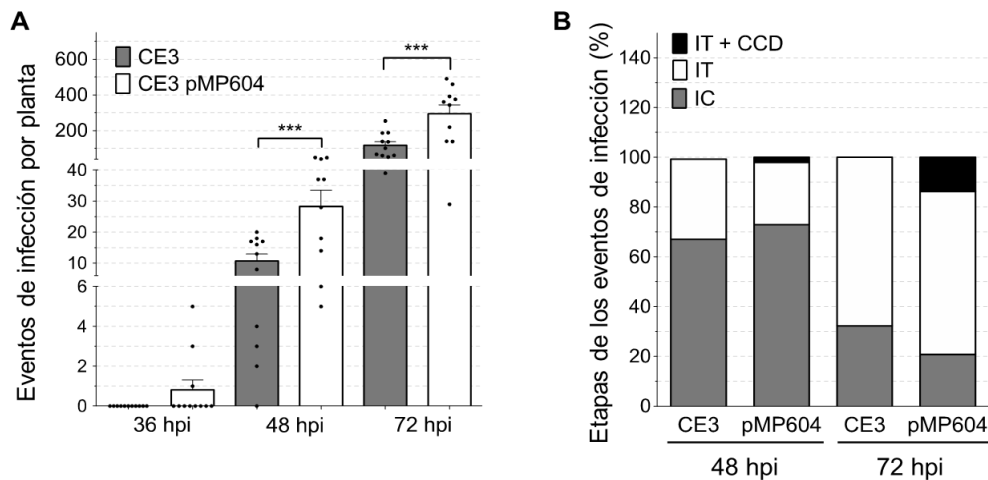


Figura 10. Análisis comparativo del proceso de infección de *R. etli* CE3-DsRed y *R. etli* CE3-DsRed pMP604 en raíces silvestres de *Phaseolus vulgaris* de 36, 48 y 72 hpi. IC, cámara de infección; IT, hilo de infección; IT + CCD, hilo de infección y división de células corticales adyacentes al sitio de infección. Tomada de Dávila-Delgado y cols., 2020.

Otra diferencia significativa fue que a las 48 y 72 hpi con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 el 2.1% y el 13.7% de los eventos de infección, respectivamente, presentaron división celular en la capa S-E en el sitio de infección (Figura 10B; Dávila-Delgado y cols., 2020). En contraste, a esos tiempos de post-infección con *R. etli* CE3-DsRed, no se observó división en células S-E. A los 5 dpi (días post-inoculación), se encontraron nódulos pequeños de $0.44 (\pm 0.01$ SE) y $0.38 (\pm 0.01$ SE) mm en raíces inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 y *R. etli* CE3-DsRed, respectivamente (Dávila-Delgado y cols., 2020). Por lo que en este estudio se optó por analizar los sitios de infección en raíces de *P. vulgaris* cosechadas a los 4 dpi, en las cuales la división en células S-E es más frecuente.

NLS-Turquoise, un marcador para visualizar núcleo

El análisis de la posición del núcleo durante el proceso de formación del HI en el pelo radical rompió uno de los paradigmas celulares al demostrar que el núcleo se desplaza "guiando" el avance del extremo apical del HI (Fournier y cols., 2008; Fournier y cols., 2015; Liu y cols., 2019; Lace y cols., 2022). Sin embargo, la información respecto a la posición del núcleo en las células corticales en división en el sitio de infección es escasa (Timmers y cols., 1999; Suzaki y cols., 2014; Nadzieja y cols., 2019; Lace y cols., 2022). En este proyecto, para describir la información posicional del núcleo en las células S-E, se utilizó la expresión constitutiva del marcador molecular NLS-mTurquoise2. La validación de este marcador se ilustra en la [figura 11](#), representativa del meristemo apical de raíces transgénicas de *P. vulgaris* de 12 días post-inoculación con *A. rhizogenes* K599 que porta el cassette p35S::NLS-mTurquoise2. Es de mencionar que la proteína fluorescente mTurquoise2 tiene un pico máximo de excitación a 405 nm, longitud de onda a la que se capturaron las imágenes *in vivo*. Dependiendo del tiempo de exposición, a esta longitud de onda es posible detectar la autofluorescencia de las paredes celulares en las raíces de *P. vulgaris*.

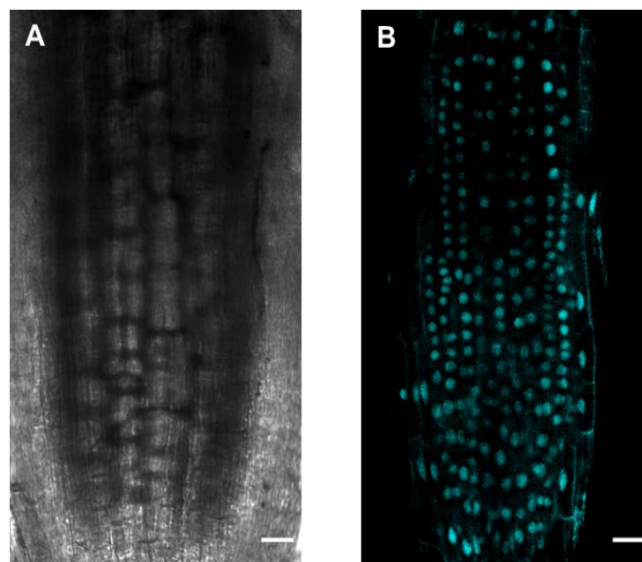


Figura 11. Micrografía representativa del meristemo apical de raíces transgénicas de *P. vulgaris* que portan el cassette p35S::NLS-mTurquoise2. **A)** Imagen en campo claro y **B)** La señal fluorescente de NLS-mTurquoise2 (en cian) se observa en el núcleo de todas las células del meristemo apical de la raíz (RAM). Imágenes obtenidas en microscopio confocal

multi-fotónico invertido (Olympus FV1000), con un objetivo 40X, en el LNMA (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada), ubicado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Barras: 20 μ m.

YFP-*PvKNOLLE*, un marcador de citocinesis en células vegetales

Previo a la construcción del cassette de expresión *promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*, era importante verificar la expresión del gen *PvKNOLLE* (Phvul.004G077900) en raíces de *P. vulgaris*. Por un lado, se buscó el perfil de expresión de este gen en la base de datos del Atlas de Expresión de *P. vulgaris* (Figura 12, *PvGEA*, A Common Bean Gene Expression Atlas; O'Rourke y cols., 2014). Este análisis mostró que la expresión del gen es mayor en ápices de raíz y en nódulos jóvenes (5 dpi).

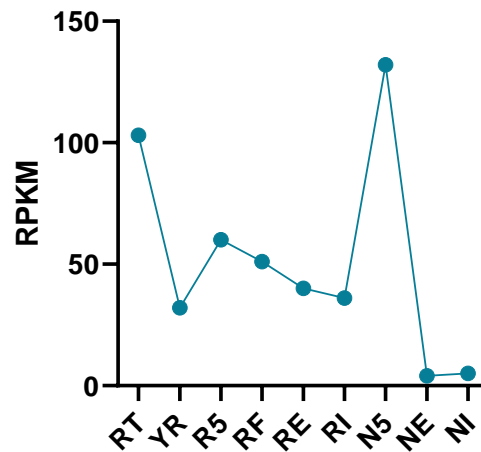


Figura 12. Perfil de expresión del gen *PvKNOLLE* en raíces de *Phaseolus vulgaris* no inoculadas y a diferentes tiempos post-inoculación con rizobia. Valores RPKM (Reads Per Kilobase Million) reportados en el Atlas de Expresión de *P. vulgaris* (*PvGEA*, A Common Bean Gene Expression Atlas; O'Rourke y cols., 2014). Siglas en inglés de las muestras analizadas: RT-Root Tips (ápices de raíz de 0.5 cm, de plantas fertilizadas, colectadas en la 2a. etapa trifoliar), YR-Young Roots (raíces de plantas colectadas en la 2a. etapa trifoliar), R5-Roots (raíces de 5 dpi con nódulos pre-fijadores), RF-Roots Fertilized (raíces fertilizadas de 21 días), RE-Roots Effective (raíces de 21 dpi, con nódulos fijadores de N₂), RI-Roots Ineffective (raíces inoculadas con rizobia ineficiente en la fijación de N₂), N5-Nodules (nódulos de 5 dpi), NE-Nodules Effective (nódulos fijadores de N₂, 21 dpi) y NI-Nodules Ineffective (nódulos ineficientes en la fijación de N₂). d, días; dpi, días post-inoculación.

Por otro lado, se analizó el patrón de acumulación de transcrito *PvKNOLLE* mediante experimentos de RT-qPCR, utilizando RNA total de secciones de raíz (ápice, pelos radicales y zona de diferenciación desprovista de pelos radicales o rasurada, ZD) de *P. vulgaris* de 48 hrs post-germinación. Los resultados obtenidos se muestran en la [figura 13](#). El transcrito *PvKNOLLE* tiene una mayor acumulación relativa en ápice *versus* raíz rasurada y pelos radicales ([Figura 13A](#)). Asimismo, se encontró que las muestras de raíces cosechadas a las 72 hpi con *R. etli* CE3 ([Figura 13B](#)), no presentan diferencias en el perfil de acumulación de transcrito *PvKNOLLE* con respecto a las raíces no inoculadas.

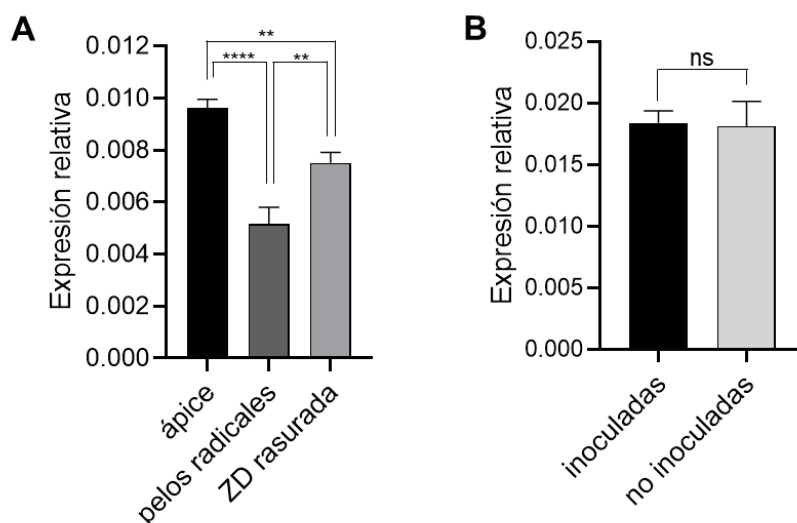


Figura 13. Análisis de la acumulación relativa del transcrito *PvKNOLLE* en raíces de *Phaseolus vulgaris*. En **A**) secciones de ápice, de pelos radicales y de zona de diferenciación (ZD) desprovista de pelos radicales (rasurada) de raíces de 48 hpg y en **B**) raíces inoculadas *R. etli* CE3 o sin inocular, cosechadas a las 72 hpi. La acumulación relativa de transcrito se determinó por RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos transcrito-específicos de KNOLLE ([Tabla 3](#), ver [Anexos](#)). Los datos fueron normalizados respecto a los valores de acumulación del transcrito del gen de referencia, Factor de Elongación 1 alfa (EF1 α). Las barras representan el promedio \pm error estándar de 3 réplicas biológicas. En el análisis estadístico se utilizó la prueba *t*-Student. Los valores $p < 0.05$ (*), < 0.01 (**) y < 0.0001 (****) indican que las diferencias entre las muestras son estadísticamente significativas, mientras que $p > 0.05$ indica que la diferencia no es significativa (n.s). hpg, horas post-germinación; hpi, horas post-inoculación.

Para confirmar la especificidad de la expresión del cassette *promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*, y la citolocalización de *YFP-PvKNOLLE* se realizó un análisis en el RAM de raíces transgénicas de *P. vulgaris*. En las imágenes ilustradas en la [figura 14](#), se observa que *YFP-PvKNOLLE* permite visualizar las células en las que la placa celular (PC) está en proceso de formación, un indicativo del estatus citocinético de la célula. Es de mencionar que la señal de *YFP-PvKNOLLE* con menor intensidad, detectada en la periferia de algunas de las células en división es, potencialmente, debido a una degradación menos eficiente de *YFP-PvKNOLLE* que la de la proteína *KNOLLE* endógena (Stierhof y El Kasmi, 2010), es decir, sugiere que las células están en proceso de concluir citocinesis.

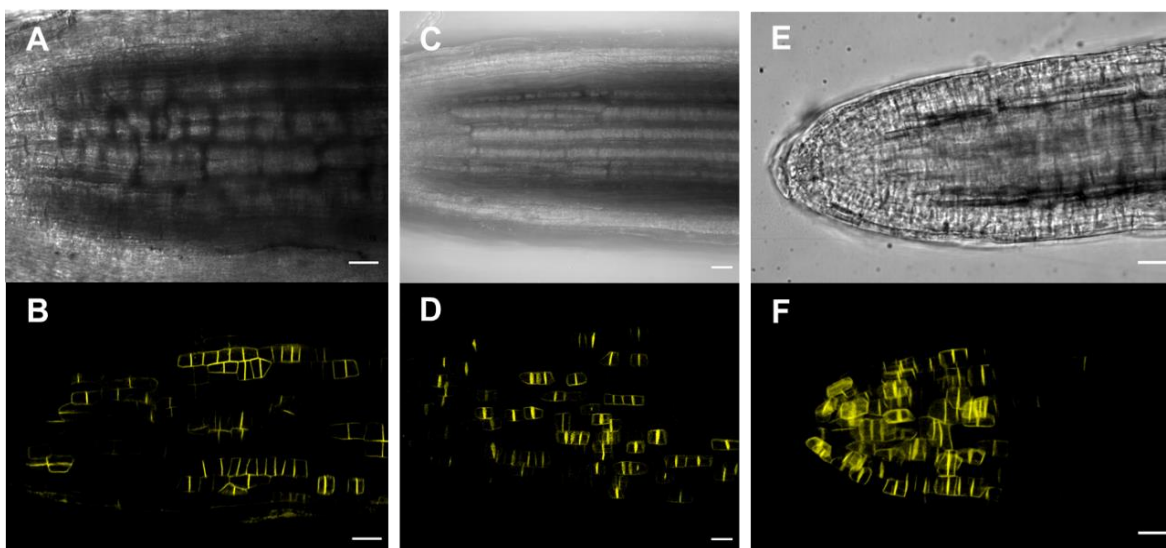


Figura 14. Micrografías representativas del meristemo apical de raíz (RAM) transgénica de *P. vulgaris* que porta el cassette *pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*. **A, C y E**) Imágenes en campo claro. **B, D y F**) Imágenes de fluorescencia de raíces independientes en las que *YFP-PvKNOLLE* (pseudocolor amarillo) permite visualizar el proceso de formación de la placa celular, indicativo de que las células están en la etapa de citocinesis. La detección de *YFP-PvKNOLLE* en la periferia de la célula post-citocinética es, potencialmente, debido a una menos eficiente degradación de esta proteína quimérica respecto a la proteína *KNOLLE* endógena (Stierhof y El Kasmi, 2010). Imágenes obtenidas por microscopía confocal. Barras: 20 μm .

Un análisis detallado de la señal de *YFP-PvKNOLLE*, como el que se muestra en la [figura 15](#), también permitió obtener información sobre la orientación de la PC, un indicativo del plano de la división celular ([Figura 15A](#)). En el RAM, el plano de la

división celular tiene una orientación predominantemente anticlinal (perpendicular al eje de la raíz). Igualmente, es posible identificar las pocas células con división periclinal u oblicua, en las cuales el plano de la división es paralelo o diagonal respecto al eje de la raíz, respectivamente (Figura 15B). Al igual que en la raíz de *A. thaliana*, un referente del desarrollo y organización de la raíz (Fisher y Sozzani, 2016), se encontró que en el RAM de la raíz transgénica de *P. vulgaris*, la división celular es, predominantemente, anticlinal, y representa el 90% de las divisiones celulares totales; mientras que el resto (10%) corresponde a divisiones periclinales en células localizadas cerca de la región apical de la raíz (Figuras 15A y B). Se sabe que alrededor del centro quiescente del RAM de Arabidopsis, las divisiones periclinales ocurren para generar las células iniciales o precursoras de los diferentes linajes celulares de la raíz (endodermis, córtex, epidermis y tejido vascular; Fisher y Sozzani, 2016). También es posible identificar el estatus citocinético de la célula en función del largo de la PC, que inicia en el centro de la célula y concluye con la fusión de la PC a la membrana plasmática parental (Figura 15C).

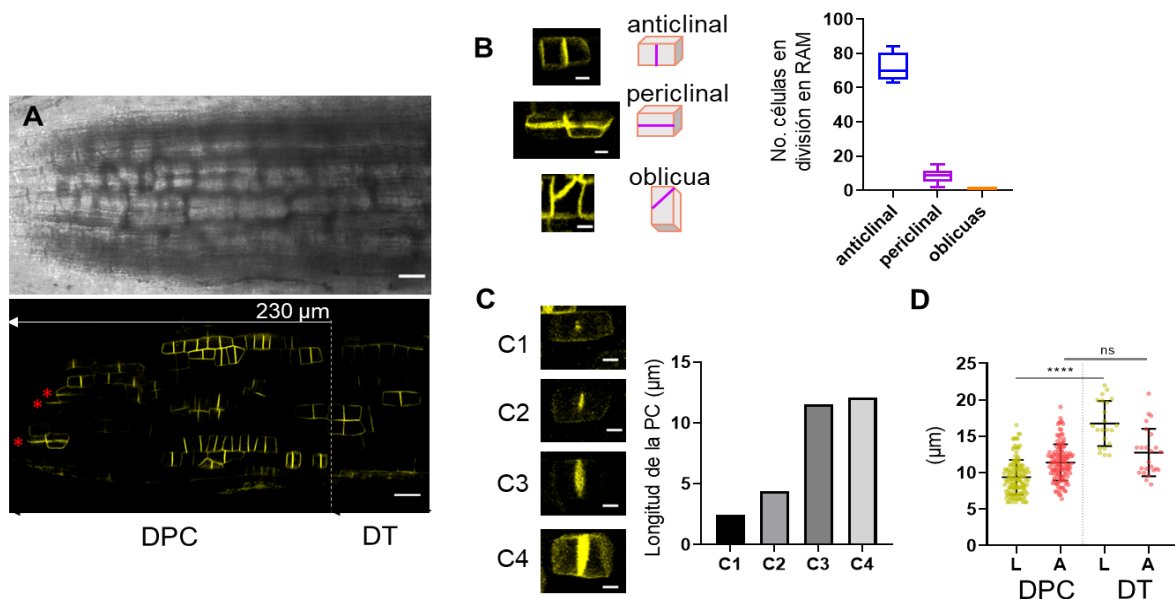


Figura 15. Información sobre la división celular en el RAM de raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* que portan el cassette *promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*. **A)** Imagen representativa en la que se observa la citolocalización de YFP-*PvKNOLLE* asociada a la placa celular (PC). **B)** Distribución de células con PC en orientación anticlinal, periclinal

(asterisco rojo en A) u oblicua, de 5 raíces independientes. **C)** Análisis ilustrativo de la longitud de la PC en formación. **D)** Promedio de la longitud (L) y ancho (A) de células en división en el RAM. Valores promedio: $9.38 \mu\text{m} \pm 2.36 \text{ DS}$ (L) y $11.41 \mu\text{m} \pm 2.49 \text{ DS}$ (A) en DPC y $16.75 \mu\text{m} \pm 3.09 \text{ DS}$ (L) y $12.77 \mu\text{m} \pm 3.27 \text{ DS}$ (A) en DT. $n= 146$ (L) y 131 (A) células analizadas. DPC, dominio de proliferación celular; DT, dominio de transición. Los datos fueron generados de 3 réplicas biológicas. Barra de escala: $20 \mu\text{m}$ (A) y $5 \mu\text{m}$ (B y C). Análisis estadístico con prueba One-way ANOVA; ****, diferencia significativa ($p < 0.0001$), ns: diferencia no significativa. Versión modificada de la Figura Suplementaria S5 en Monroy-Morales y cols., 2022.

Dado, que el RAM en *P. vulgaris* no ha sido caracterizado aún, como referencia en este trabajo se usó un esquema de la organización del RAM de *Arabidopsis*. De acuerdo a Ivanov y Dubrovsky (2013), en el RAM de *Arabidopsis* se distinguen dos zonas o dominios, el dominio de proliferación celular (DPC) y el dominio de transición (DT), caracterizados por tener una alta o baja probabilidad de dividirse, respectivamente (Figura 16). En este contexto, y de acuerdo a la señal de YFP-*PvKNOLLE* asociada a la PC y la longitud de las células en división, en el análisis de las imágenes de raíces transgénicas de *P. vulgaris* es posible distinguir la señal de las células en citocinesis, ubicadas en las zonas que tentativamente pudieran considerarse como los dominios DPC y DT (Figura 15D). En su conjunto, el análisis realizado permitió confirmar que la proteína YFP-*PvKNOLLE* se acumula en la PC en formación, lo que validó el uso de esta herramienta molecular para visualizar la citocinesis en las células S-E en el sitio de infección.

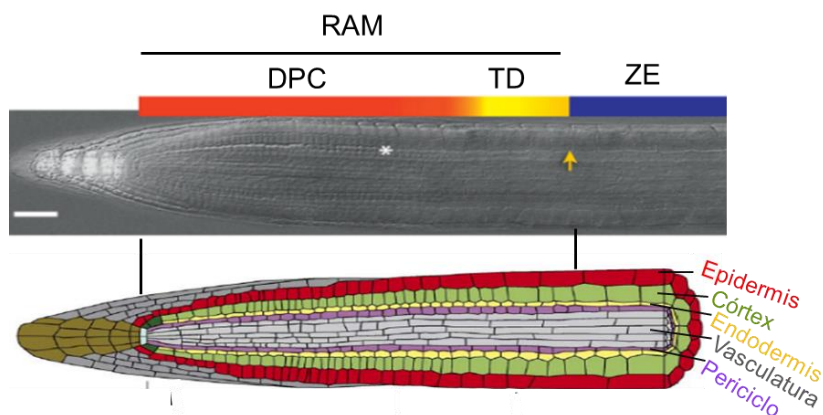


Figura 16. Esquemas ilustrativos de las zonas del meristemo apical (RAM) y de elongación de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tomados de Péret y cols., 2009; Ivanov y Dubrovsky, 2013. DPC, dominio de proliferación celular; TD, dominio de transición; ZE, zona de

elongación. El asterisco indica el borde definido entre el DPC y el TD; la flecha indica el borde hacia la ZE. Barra: 50 μm .

7.2 Interpretación de las imágenes del sitio de infección capturadas por microscopía confocal

La microscopía confocal es una técnica que permite la captura de cortes ópticos a lo largo del eje z (profundidad de la muestra). Los cortes ópticos sucesivos forman una pila de imágenes en Z ("z-stacks", en inglés), que pueden ser procesados por paquetes computacionales ("softwares", en inglés) para crear una proyección bi-(2D) o tri-dimensional (3D).

Para la correcta interpretación de las proyecciones 2D y 3D generadas en este estudio, es importante describir a detalle cómo las imágenes fueron capturadas y procesadas, considerando que al montar las raíces para su observación al microscopio confocal, los sitios de infección pueden encontrarse en diferentes ángulos respecto al plano focal. Por lo que, en este estudio se capturaron dos tipos de pilas de cortes ópticos en el eje z: "vista superior" o "vista lateral" (en inglés "top view" o "lateral view", respectivamente).

En las proyecciones tipo "vista superior", los cortes ópticos corresponden a secciones transversales del pelo radical e HI, en donde los cortes inician en la zona externa del pelo radical y terminan en la capa de células S-E adyacentes al sitio de infección (Figura 17A). Para facilitar la información en este tipo de proyecciones, fue necesario dividir la correspondiente pila en Z en dos procesos de proyección 2D independientes: la proyección epidermal, utilizando la pila en z de cortes ópticos de la epidermis, y la proyección subepidermal (S-E), conformada por la pila en z de cortes de la capa S-E adyacente al sitio de infección.

La información en las proyecciones 2D tipo "vista lateral" es relativamente fácil de interpretar, ya que cada corte óptico corresponde a una sección sagital del sitio de infección, en donde las capas corticales están en el plano longitudinal de la raíz (Figura 17B).

Según lo requiriera el análisis de imágenes, también se realizaron proyecciones en 3D.

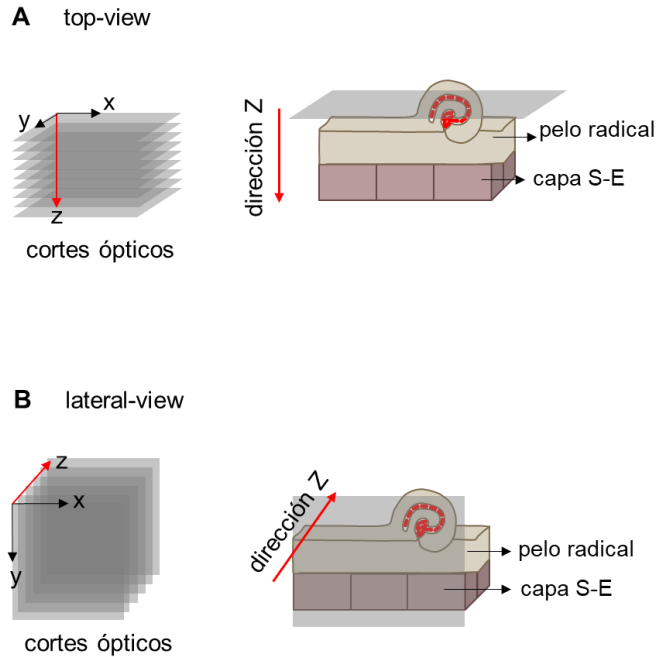


Figura 17. Representación esquemática de la orientación de las imágenes en los "z-stacks" adquiridos en sitios de infección con rizobia en raíces de *P. vulgaris*. **A)** vista superior o "top view": La muestra (sitio de infección) se escanea de la parte superior (inicia en pelo radical) hacia la parte interna (capa S-E), el seccionamiento inicia en la parte externa del pelo radical que porta un hilo de infección, donde el enroscamiento del ápice del pelo radical suele estar posicionado sobre la epidermis, y termina en el límite entre la capa S-E (C1) y la capa cortical C2. **B)** vista lateral o "lateral view": el sitio de infección a escanear tiene una posición lateral con respecto al plano focal, por tanto, los cortes ópticos incluyen el pelo radical que porta un HI y la capa cortical S-E. Los recuadros en gris representan los cortes ópticos o z-stacks en el eje z. La distancia de separación entre los cortes ópticos es 0.8-1 μm . Flecha en rojo muestra la dirección de la captura de los cortes ópticos que conforman el "z-stack". S-E, célula cortical subepidermal.

7.3 Etapas del proceso de infección epidermal

El objetivo central de este proyecto fue visualizar, en paralelo, el proceso de infección y la citocinesis en las células S-E adyacentes al sitio de infección en raíces de *P. vulgaris*. Considerando que los procesos de iniciación y de desarrollo del HI en el pelo radical es una sucesión de eventos continuos, se optó por subdividir el proceso de infección epidermal en 4 etapas (**Figura 18**). La etapa I, que corresponde a la formación de una microcolonia; la etapa II, en la que tiene lugar la formación y elongación del HI hacia la base del pelo radical; en la etapa III, el HI que ha llegado

a la base del pelo radical, pero ninguna de sus ramificaciones ha salido de esta célula epidérmica; y la etapa IV, en la que se observa que el HI ha salido del pelo radical y ha penetrado la célula S-E adyacente. Con este referente, se realizó la descripción de las células S-E adyacentes con el propósito de determinar en qué etapa de la infección se observaba la formación de la PC.

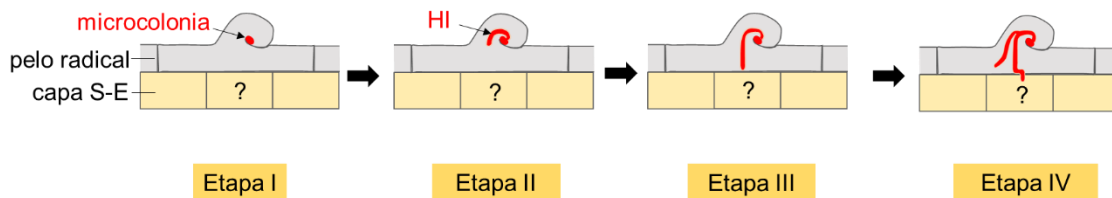


Figura 18. Clasificación de las etapas del proceso de infección. Etapa I, formación de la microcolonia. Etapa II, formación y elongación del HI hacia la base del pelo radical. Etapa III, el HI ha llegado a la base del pelo radical, pero ninguna de las ramas del HI ha salido de esta célula. Etapa IV) el HI ha salido del pelo radical y ha penetrado la célula S-E adyacente. En gris, se representa el pelo radical (epidermis) y en amarillo la capa subepidermal (S-E). El signo de interrogación (?) indica la pregunta: ¿cuál será el estado citocinético en la S-E durante las etapas (I-IV) del proceso de infección?, siendo el objetivo principal del proyecto.

7.4 Tamaño de las células subepidermales (S-E) en el sitio de la infección epidérmica

Una primera aproximación para describir las células S-E en el sitio de infección fue aprovechar la autofluorescencia de la pared celular a una longitud de onda de 405 nm para visualizar el contorno celular, según se describe en el trabajo de Nadzieja y cols., (2019). En la [figura 19](#) se muestra una serie de imágenes representativas del sitio de infección en las etapas I-IV de la infección epidérmica, en las que se visualiza el contorno de las células y el avance del proceso de infección. En las imágenes se observó que las células S-E, marcadas con un asterisco difieren, aparentemente, en su longitud.

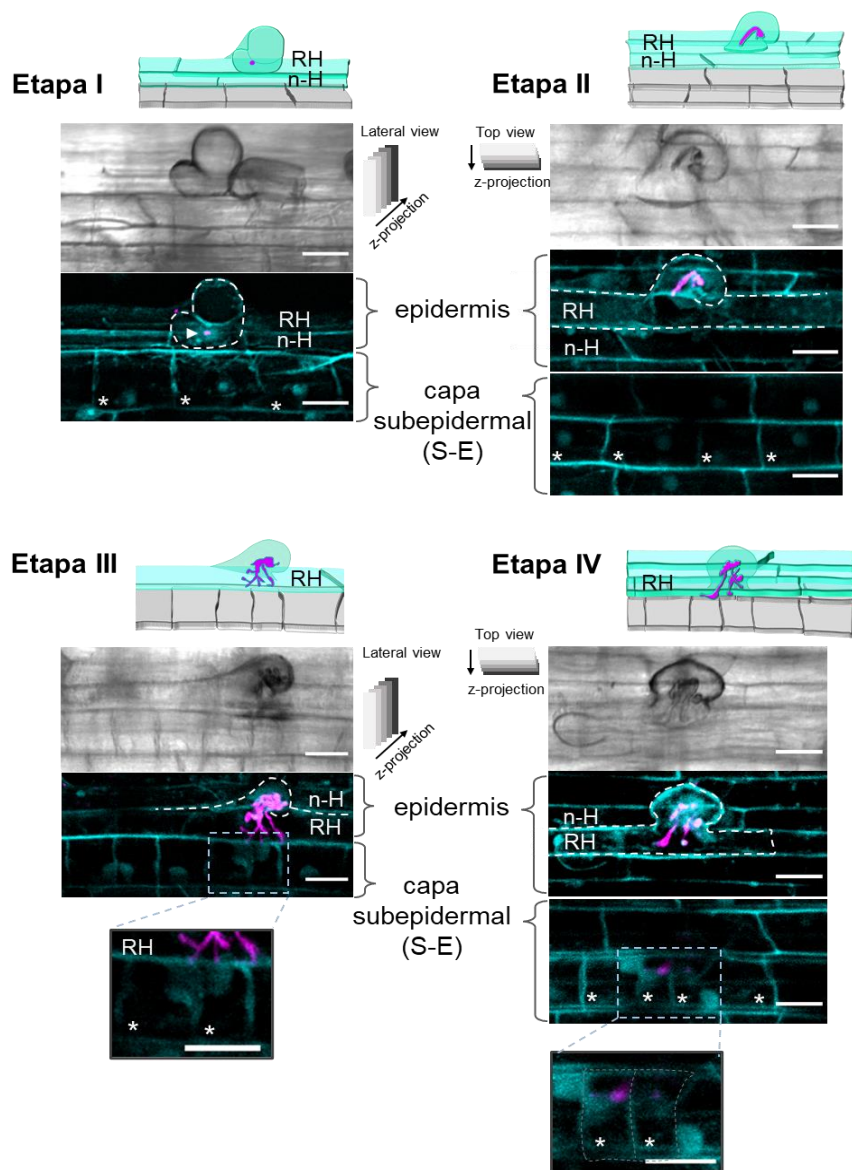


Figura 19. Proyecciones 2D de imágenes representativas de las etapas de infección epidérmica en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604. Las características de las etapas I-IV del proceso de infección se describen en el pie de la figura 18. Las imágenes son representativas de raíces de *P. vulgaris* tipo silvestre (48 hpg), cosechadas a los 4 días después de la inoculación (dpi) con *R. etli* CE3-DsRed pMP604. Cada bloque es representativo de las etapas I-IV, respectivamente; se muestra la imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC), seguido de la imagen de fluorescencia en pseudocolores magenta (rizobia) y azul (autofluorescencia de pared celular). Se incluye un esquema del proceso de infección visualizado en la imagen de microscopía correspondiente. Las células de la capa S-E adyacentes al sitio de infección se indican con un asterisco (*). Los recuadros son ampliaciones de la sección delimitada por líneas punteadas. RH = "root hair" o pelo radical, n-H = célula epidermal "non-hair" o no-pelo radical. Barras: 20 μm . Versión en español de figura 1 en Monroy-Morales y cols., 2022).

El análisis de la longitud de las células S-E en la zona de diferenciación en las raíces control, no inoculadas con rizobia (no-inoc), mostró que tienen una longitud promedio de 78.5 μm (± 9.7 SD), similar a la de las células corticales que flanquean (FI; 73.2 μm ± 9.6 SD) el sitio de infección en raíces inoculadas con rizobia (Figura 20). Mientras que, conforme avanzan las etapas del proceso de infección, las células S-E adyacentes al sitio de infección presentan una menor longitud. En las etapas I y II, la diferencia en la longitud celular es gradual. En las etapas III y IV la longitud de las S-E es equivalente al 25% de la longitud de las células no-inoc (ver Figura 20 y Anexo 2). Considerando que, al concluir su ciclo celular, las células hijas en el RAM de *Arabidopsis* presentan una longitud equivalente al 20% respecto a la longitud de célula parental (Seguí-Simarro y Staehelin, 2006), es factible considerar que en las raíces de *P. vulgaris*, las células S-E en el sitio de infección en las etapas III y IV han alcanzado un tamaño equivalente al de una célula hija. Por otro lado, la longitud de las células S-E en la etapa I sugiere que las células han reactivado su ciclo celular.

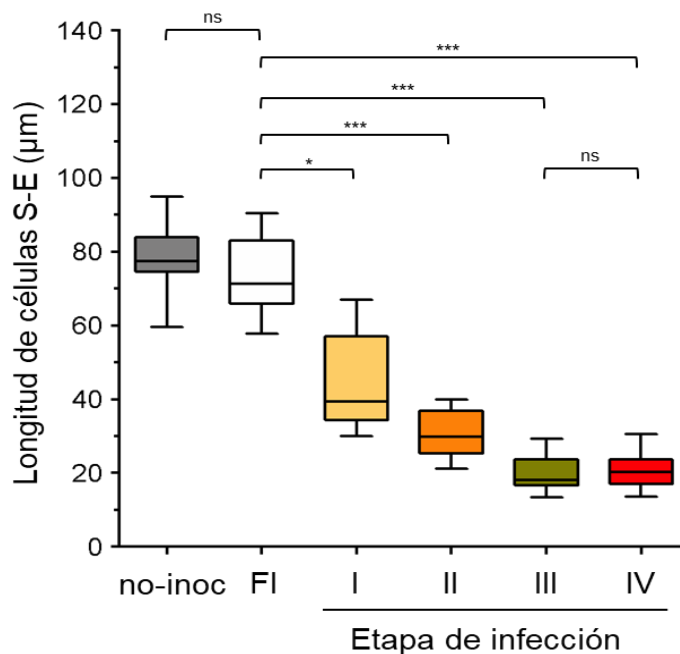


Figura 20. Longitud de las células subepidérmicas (S-E) en las etapas I-IV de la progresión del HI en los sitios de infección epidérmica en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604. La longitud fue determinada en las S-E que subyacen un pelo radical en raíces no inoculadas (no-inoc). En las raíces inoculadas con rizobia y cosechadas

a los 4 dpi, los valores de longitud corresponden a las células S-E que flanquean un sitio de infección (FI) o las que subyacen al pelo radical en proceso de infección (etapas I - IV). Los valores promedio (\pm desviación estándar) de la longitud de las células S-E son: no-inoc, de 78.5 ± 9.7 (n= 14 células); FI, 73.2 ± 9.6 (n = 23 células); etapa I, 46.5 ± 12.6 (n= 23 células); etapa II, 30.9 ± 6.5 (n= 19 células); etapa III, 20.2 ± 4.6 (n = 14 células); y en la etapa IV, 20.5 ± 4.8 (n = 18 células). El análisis estadístico tipo t-Student indica que no hay diferencia significativa entre las muestras no-inoc y FI ($p > 0.1$). El análisis tipo Kruskal–Wallis y post hoc la prueba Dunn's (comparaciones múltiples) tomando los valores FI como control indica diferencias significativas como se anota en la gráfica. La prueba tipo t-Student no paramétrica de Mann–Whitney muestra que las muestras III y IV no son significativamente diferentes ($p > 0.5$). En la gráfica, * y *** indican un valor de $p < 0.05$ y $p < 0.0001$, respectivamente; ns, sin diferencia significativa. Versión en español de figura 2 en Monroy-Morales y cols., 2022.

7.5 Posición del núcleo en las células S-E adyacentes al sitio de infección

Otro indicativo de que una célula vegetal ha reactivado su ciclo celular es el desplazamiento del núcleo hacia la zona central de la célula durante la interfase, en la transición S/G2; este movimiento está coordinado por la reorganización de los MTs y MFs (Van Brussel y cols., 1992; Van Spronsen y cols., 2001). De donde, se analizó la información posicional del núcleo o estructura nuclear en las células de la capa S-E adyacente al sitio de infección en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresan el cassette p35S::NLS-mTurquoise2 (NLS, siglas en inglés de señal de localización nuclear) y raíces tipo silvestre, teñidas con DAPI (Figura 21).

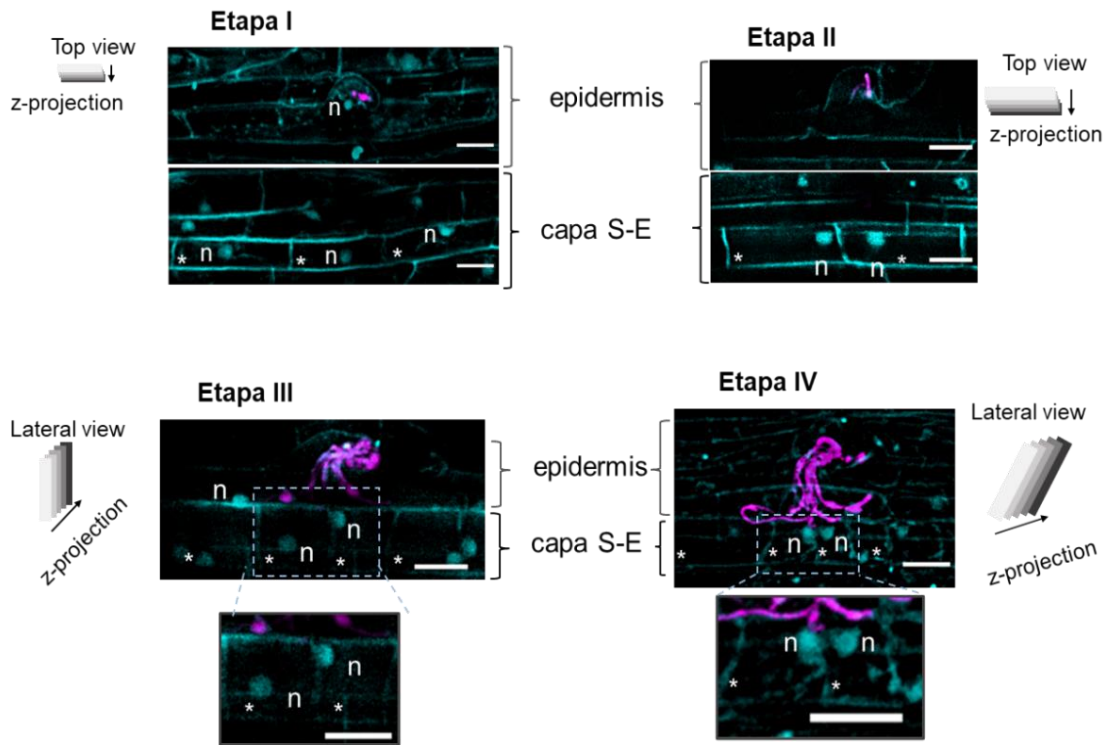


Figura 21. Visualización de la posición de la estructura nuclear en las células S-E adyacentes al sitio de infección epidermal. Las proyecciones 2D de raíces de *Phaseolus vulgaris* expresando el marcador nuclear NLS-mTurquoise2 o teñidas con DAPI (azul en ambos casos) e inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 cosechadas 4 dpi. Las imágenes son representativas de cada etapa de progresión del hilo de infección. La posición del núcleo muestra una tendencia durante las etapas de la infección. Los núcleos (azul en todos los paneles) en etapa I y IV están teñidos con DAPI; los núcleos en etapa II y III corresponde a la señal NLS-mTurquoise2. La autofluorescencia de la pared celular también se visualizó. *R. etli* CE3-DsRed pMP604 está en pseudocolor magenta. n = núcleo, el asterisco (*) indica la capa de células S-E subyacente al pelo radical que alberga un HI. Barras = 20 μ m.

Para describir la localización de la estructura nuclear, su posición se clasificó de manera arbitraria como: apical, cuando el núcleo está situado hacia la cara lateral externa, próxima a la base del pelo radical; central, cuando está en la zona central de la célula; y basal, cuando está situado en la zona de la cara lateral inferior de la célula (Figura 22). Este análisis resaltó que, en el 95% y 78% de las células S-E adyacentes al sitio de infección en las etapas I y II, respectivamente, la señal de fluorescencia de la estructura nuclear está posicionada en el centro de la célula. Este dato refuerza la propuesta de que en la etapa I del proceso de infección, las

células S-E que subyacen al sitio de infección han, potencialmente, reactivado su ciclo celular. En la etapa III, la distribución de la señal nuclear es heterogénea, mientras que en la etapa IV, el 55% de las estructuras nucleares tienen una posición tipo apical. La aparente transición de la estructura nuclear hacia una posición apical sugiere que, en la etapa IV, la posición del núcleo pudiera tener un papel en la definición del sitio de penetración del HI a la célula S-E, además del papel de “guía” en la infección epidermal, un aspecto a analizar a detalle en un proyecto a futuro.

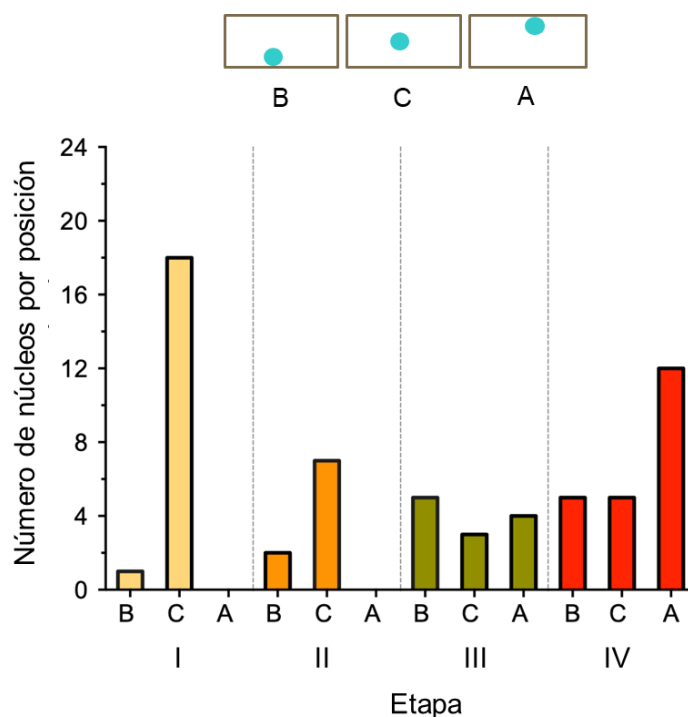


Figura 22. Distribución de la posición de la estructura nuclear en las células subepidermales (S-E) en las cuatro etapas (I-IV) de la progresión del hilo de infección en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604. Los núcleos de cada etapa se clasificaron en tres grupos, según su posición en la célula: B, basal; C, central y A, apical. Los núcleos se tiñeron con DAPI o expresaron el marcador nuclear NLS-mTurquoise2. Se capturaron imágenes de 17 raíces independientes inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604. Número de células analizadas: etapa I, n = 19; etapa II, n = 9; etapa III, n = 12; y etapa IV, n = 22. Versión en español de Figura 4 en Monroy-Morales y cols., 2022.

7.6 La citocinesis en las células subepidermales (S-E) adyacentes al sitio de infección con rizobia

Como ya se mencionó, una de las preguntas clave que dio origen a este proyecto es ¿el HI penetra la célula S-E adyacente antes o después de que ésta ha concluido la división celular? La estrategia de análisis fue rastrear la expresión y citolocalización del marcador de citocinesis YFP-*PvKNOLLE*.

En el análisis de las células S-E adyacentes al sitio de infección epidermal se encontró que YFP-*PvKNOLLE* es indetectable en las células S-E que subyacen al pelo radical enroscado que presenta una microcolonia (etapa I, [Figura 23A](#)). En la etapa II, YFP-*PvKNOLLE* se visualiza delineando una PC naciente (8 μm de largo) en una de las células S-E adyacentes al sitio de infección ([Figura 23B](#)), lo que indica que la célula está en telofase temprana (van Oostende-Triplet y cols., 2017). La [figura 23C](#) ilustra un sitio de infección en etapa III, en el que se observa que el ápice de la ramificación del HI (marcado con asterisco) está próximo a la base del pelo radical y, potencialmente, en preparación para penetrar la célula S-E en citocinesis. El largo de la PC, marcada con YFP-*PvKNOLLE*, es de 27 μm y corresponde al de una célula en citocinesis tardía (van Oostende-Triplet y cols., 2017). El recuadro en la [figura 23C](#), sugiere que el punto de penetración del HI a la célula S-E estará cercano al sitio de fusión de la PC con la membrana plasmática parental. En la etapa IV, el HI ha salido del pelo radical y penetrado la célula S-E adyacente al sitio de infección ([Figura 23D](#)). En esta célula, la señal YFP-*PvKNOLLE* demarca una PC en proceso de concluir la citocinesis. En etapas posteriores, el HI invade varias células S-E post-citocinéticas, adyacentes al sitio de infección ([Figura 23E](#)).

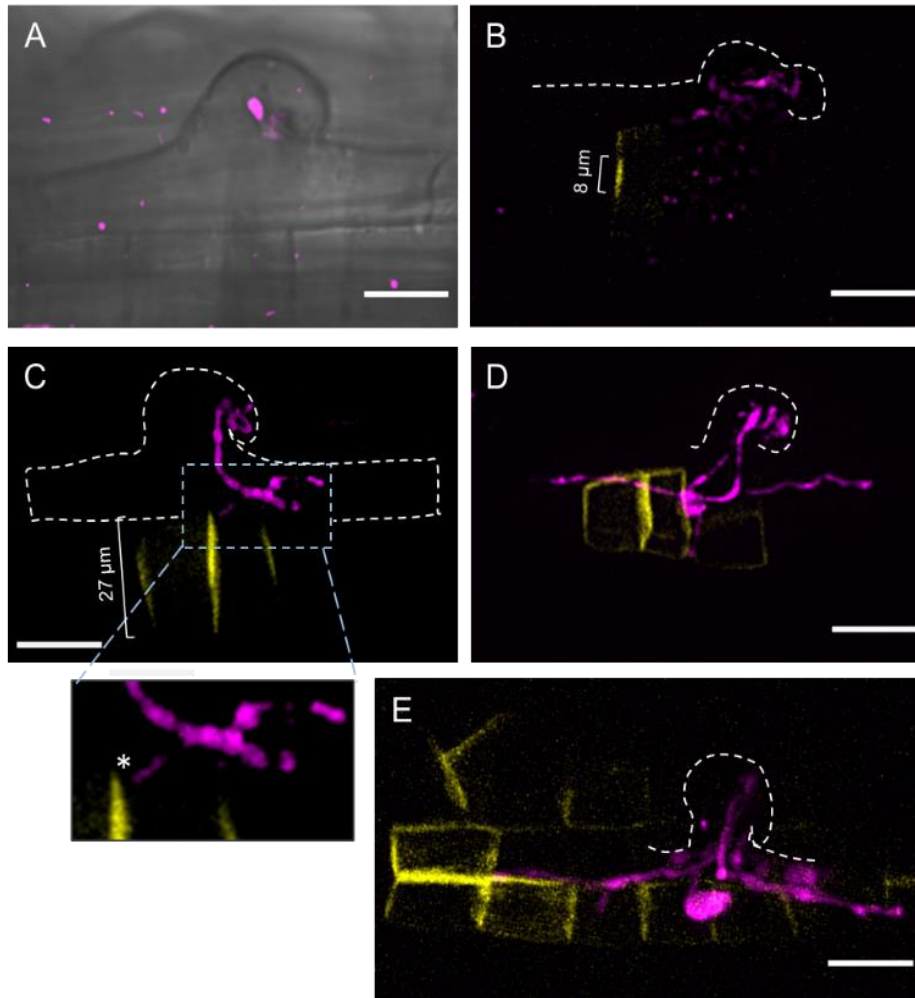


Figura 23. Visualización del marcador YFP-*PvKNOLLE* asociado a la placa celular en las células subepidermales (S-E) adyacentes al sitio de infección en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604. **A-E)** Imágenes representativas del proceso de infección en raíces transgénicas que portan el cassette *promPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*, cosechadas 4 días después de la inoculación con rizobia (dpi). Se muestra el empalme ("merge", en inglés) de imágenes de fluorescencia (rizobia en pseudocolor magenta y YFP-*PvKNOLLE* en amarillo) (A-E). **A)** Etapa I, se observa microcolonia de rizobia en pelo radical enroscado. No se detecta señal de YFP-*PvKNOLLE* en las células S-E adyacentes a la infección, un indicativo de que las células aún no han iniciado la citocinesis. Para visualizar el contorno del pelo radical enroscado, el empalme de imágenes incluye imagen en contraste de interferencia diferencial (DIC). **B)** Etapa II, pelo radical que contiene un HI en proceso de elongación. La señal de YFP-*PvKNOLLE* perfila una placa celular naciente, de 8 μm , lo que sugiere que la célula S-E se encuentra en telofase temprana. **C)** Etapa III, el hilo de infección ha alcanzado la base del pelo radical y, potencialmente, se encuentra en preparación para penetrar la célula S-E adyacente en citocinesis. La placa celular está en proceso de expansión hacia a la periferia de la célula S-E, y tiene una longitud de 27 μm . En recuadro, el ápice del hilo de infección,

marcado con asterisco está próximo al sitio donde tendrá lugar la fusión de la placa celular con la membrana plasmática parental. **D)** Etapa IV, el hilo de infección ha salido de la base del pelo radical y ha penetrado la célula S-E que está en proceso de concluir la citocinesis, es decir, la PC está en proceso de fusión con la membrana plasmática parental. **E)** En etapas posteriores, el hilo de infección invade varias células post-citocinéticas adyacentes al sitio de infección epidérmica. Barra de escala = 20 μm . Figura 5 en Monroy-Morales y cols., 2022.

7.7 Modelo de la dinámica entre el avance del hilo de infección y la división de las células subepidérmicas adyacentes al sitio de infección

En la [figura 24](#) se recapitulan los resultados obtenidos en este trabajo y se plantea un modelo de la dinámica entre la progresión del hilo de infección y la reactivación del ciclo celular en la célula S-E a ser infectada.

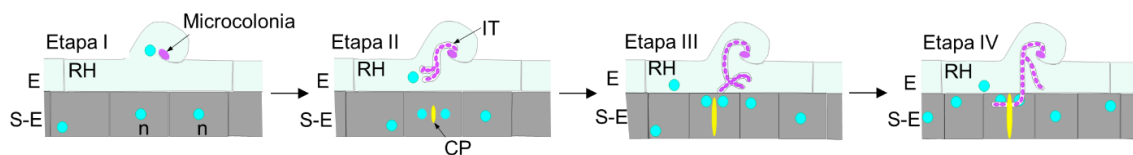


Figura 24. Modelo de la dinámica entre la progresión del hilo de infección (HI) y la reactivación del ciclo celular. La progresión del hilo de infección se dividió en etapas (I, II, III y IV). Etapa I, durante la formación de la microcolonia (magenta) en el pliegue del ápice radical (RH) enroscado, el núcleo (punto azul) tiene una posición cercana a la microcolonia, mientras que en la capa S-E, adyacente al sitio de infección, el núcleo muestra posición central y no se distingue citocinesis. Etapa II, el HI (magenta, IT) se ha formado y ramificado en el pelo radical y se observa una placa celular (CP, en color amarillo) en el centro de la célula de la capa S-E. Etapa III, el ápice del HI alcanza la base del pelo radical y la capa de la S-E muestra una célula en división, la CP presenta un proceso de expansión final, sugiriendo una citocinesis tardía. Etapa IV, el HI ha penetrado la célula S-E en división, la CP se ha expandido completamente indicando un estatus post-citocinético. Versión modificada de Monroy-Morales y cols., 2022.

8. DISCUSIÓN

La simbiosis leguminosa-rizobia desencadena la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces. Este proceso simbiótico inicia con la activación y coordinación de dos procesos distintos, que se desarrollan de manera coordinada y están interconectados: 1) la infección epidermal, vía la formación de un hilo de infección (HI) en el entorno transcelular de un pelo radical, y 2) la división celular en el córtex para formar el primordio de nódulo. Ambos procesos han sido descritos desde el punto de vista genético y fenotípico, sin embargo, poco ha sido reportado respecto a la dinámica entre ambos eventos.

Este proyecto es una contribución a la descripción de algunos aspectos de la dinámica entre la citocinesis en el sitio de infección en raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* (Monroy-Morales y cols., 2022). Para lo cual, se diseñó una estrategia de microscopía confocal *in vivo* en raíces transgénicas con expresión del marcador molecular YFP-*PvKNOLLE* para visualizar células en las que la PC estaba en proceso de formación, es decir, en citocinesis. Conforme avanzó el proyecto se incluyó el uso del marcador molecular de núcleo, NLS-Turquoise, y la tinción con DAPI, así como la detección de la autofluorescencia de pared celular. Este análisis fue realizado en raíces cosechadas a los 4 dpi.

Una de las ventajas de estudiar el inicio de la nodulación en *P. vulgaris* es que la reactivación de la división celular tiene lugar en la capa subepidermal (S-E) o capa cortical más externa (C1) en la zona de diferenciación de la raíz. Lo que implica que el avance del HI hacia las células del primordio en formación involucra el paso del HI a células en proceso de división. Mientras que, en otros modelos de nodulación, como *L. japonicus* y *M. truncatula*, el HI sale del pelo radical y cruza células de capas corticales más internas (C2/C3 o C4/C5, respectivamente; Hayashi y cols., 2000; Xiao y cols., 2014) hasta alcanzar las células en proliferación, destinadas a formar el primordio.

Sin embargo, es importante precisar que el modelo de infección epidermal en *P. vulgaris* presenta varios retos a superar al abordar un análisis por microscopía *in vivo* de las capas subepidermales de la raíz. Por un lado, el grosor y la opacidad de la raíz de *P. vulgaris* implican una dificultad. A diferencia de las raíces de *A. thaliana*

que presentan una monocapa de células corticales, las raíces de *P. vulgaris* tienen una arquitectura compleja, con un córtex constituido por 4-5 capas celulares, por lo tanto, son raíces mucho más gruesas (~1.5 mm). Esto dificulta la obtención de imágenes o cortes ópticos de las capas celulares profundas de estas raíces. Otro desafío a superar es el ancho y largo de los pelos radicales de *P. vulgaris* que responden a la presencia de rizobia y son susceptibles a iniciar el proceso de infección. En comparación con los pelos radicales de *M. truncatula* (Figura 25A) y *L. japonicus* blancos de la infección, que son largos (>60 μm , Shaw y cols., 2000; Fournier y cols., 2008) y esbeltos ($12.2 \pm 1.7 \mu\text{m}$ de diámetro, Shaw y cols., 2000), la formación de la microcolonia y avance del HI son fáciles de rastrear por microscopía. Mientras que el diámetro y largo de los pelos radicales de *P. vulgaris* que perciben las rizobia es de aproximadamente 16.70 μm y 37.5 μm respectivamente (Monroy-Morales, datos no publicados), lo que propicia que el pelo radical enroscado, con formación de una microcolonia o un HI, suela estar "recostado" sobre la superficie de la raíz, como se ilustra en la figura 25B y se reporta en la literatura (Estrada-Navarrete y cols., 2016; Carrasco-Castilla y cols., 2018).

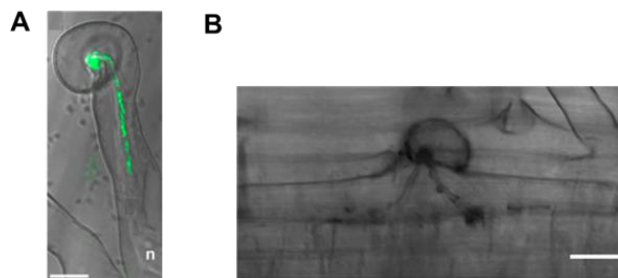


Figura 25. Imágenes en campo claro representativas de pelos radicales de *Medicago truncatula* (A) y *Phaseolus vulgaris* (B) que portan un hilo de infección. Barras: 10 μm (A) y 20 μm (B). A) Imagen tomada de Fournier y cols., 2008; B) Imagen tomada por Monroy-Morales, datos no publicados.

En este escenario, la identificación de una microcolonia formada en un pelo radical enroscado, o bien un HI en formación, no suele representar un gran reto, lo difícil es determinar con precisión el largo del HI en elongación hacia la base del pelo radical. Ante este obstáculo, en este trabajo se optó por clasificar la progresión del

proceso de infección epidermal en cuatro etapas (Figura 18), según presentara una microcolonia (etapa I), un HI en formación o en elongación hacia la base del pelo radical (etapa II), un HI que ha llegado a la base del pelo radical, pero ninguna de las ramas del HI ha salido de esta célula (etapa III); y etapa IV, cuando el ápice de una rama de HI ha salido del pelo radical y ha penetrado la célula S-E adyacente. A tener en cuenta que la continua formación de nuevos pelos radicales en la raíz conlleva a tener eventos de infección en las diferentes etapas de la progresión de la infección. En este sentido, las imágenes de eventos de infección en las diferentes etapas de progresión del HI (Figura 19), capturadas tanto en raíces tipo silvestre como transgénicas inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604 (4 dpi), muestran una similitud tanto en el progreso del proceso de infección, como en el número eventos de infección. De acuerdo a Dávila-Delgado y cols. (2020), en raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli* CE3-DsRed pMP604, la presencia de 1-5 pelos radicales con microcolonias en formación se detecta a tiempos tan cortos como 36 hpi. Mientras que en las raíces a las 72 hpi, los eventos de infección son muy abundantes (aproximadamente 300), en diferentes etapas de la progresión de la infección, y se observan eventos de división celular en la capa S-E en el sitio de infección (ver Figura 10).

Para explorar las características de las células S-E en el sitio de infección, se tomó ventaja de la autofluorescencia de las paredes celulares y visualizar el contorno de las células, de acuerdo al método reportado en el trabajo de Nadzieja y cols., (2019). En las imágenes correspondientes a la etapa I, llamó la atención que las células S-E subyacentes al pelo radical en proceso de infección presentaban una tendencia a tener, una menor longitud que las células corticales de raíces no inoculadas, lo que correlaciona con las etapas de la progresión de la infección. En las III y IV, la longitud de las S-E llega a ser 75% menor. La presencia de células con un largo menor (células más pequeñas que las células corticales) está confinada a las células S-E que subyacen al pelo radical en proceso de infección (Figura 20). Esta tendencia correlaciona con el desplazamiento del núcleo hacia una posición en el centro de las células S-E, lo que sugiere que en la etapa I, se genera la señalización que

conduce a la reactivación del ciclo celular en estas células (Figura 22). La detección de células más pequeñas (respecto a las células aledañas) es un criterio visual ampliamente utilizado al describir la reactivación de la división celular al inicio de la nodulación y de la formación de primordios de raíces laterales (Dubrovsky y cols., 2001; Xiao y cols., 2014; Fernandez y cols., 2015; Franssen y cols., 2015). En este contexto, es de resaltar que la identificación de la célula parental diferenciada que al dividirse dio lugar a células más pequeñas no es una tarea simple. En esa dirección, el modelo de referencia es la formación de un primordio de raíz lateral (LRP, por sus siglas en inglés) en *Arabidopsis*, cuyo origen es la división de un subgrupo de células del periciclo, denominadas células XPP (siglas en inglés de “xylem pole pericycle”) o fundadoras. Estas células se caracterizan por ser competentes para su división, la cual es asimétrica y de tipo anticlinal (Malamy y Benfey, 1997; Dubrovsky y cols., 2001; Motte y cols., 2019; Schütz y cols., 2021). La división asimétrica de dos células fundadoras genera 2 células pequeñas internas, flanqueadas por dos células grandes externas, siendo éstas el blanco de otra ronda de división. Con este escenario en mente, sería interesante investigar si en raíces de *P. vulgaris* inoculadas con rizobia, las células S-E que subyacen el pelo radical, en proceso de infección, son blanco de una división asimétrica inicial.

Un aspecto que resaltó al comparar los programas genéticos involucrados en la reactivación de la división celular al inicio de la nodulación y en la formación de un LRP, es que ambos programas comparten genes de metabolismo, transporte y señalización de auxinas (IAAs, ARFs, YUCCAs, STYLISH, entre otros) y factores de transcripción PLETHORA (*PLT3*, *PLT5*, *PLT7*), *LBD16*, entre otros (Mathesius, 2008; Smet, 2008; Schiessl y cols., 2019; Soyano y cols., 2019, 2021). En la raíz de *Arabidopsis*, la activación de la división celular de las células de periciclo fundadoras está regulada por el módulo genético de señalización dependiente de auxina SLR/IAA14-ARF7-ARF19 (siglas en inglés de “SOLITARY-ROOT/INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 14”, “AUXIN RESPONSE FACTORs 7 y 19”) y los factores de transcripción *LBD16*/*ASL18* y *LBD29*/*ASL16* (siglas en inglés “LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE”), *GATA23* y

PLETHORA (PLT3, PLT5 y PLT7), entre otros (Goh y cols., 2012; Motte y cols., 2019; Schütz y cols., 2021).

Una posible explicación a la presencia de células S-E de longitud menor en el sitio de infección con rizobia que las células S-E equivalentes en raíces no inoculadas, pudiera estar relacionada con cambios morfológicos en la vacuola. En las células del córtex de la raíz, la vacuola suele ocupar el 90% del volumen celular, por lo que el citoplasma está comprimido hacia la periferia de la célula y afecta la localización de los organelos, *p.e.* el núcleo (Esau y Gill, 1991; Kutsuna y Hasezawa, 2002; Seguí-Simarro y Staehelin, 2006; Takatsuka y cols., 2023). El tamaño, morfología y el número de vacuolas presentes en la célula están regulados por eventos de fusión homotípica, fragmentación, contracción e invaginaciones y cuya dinámica involucra al citoesqueleto. De acuerdo a Takatsuka y cols. (2023), en las células vegetales que se encuentran en la interfase G1/S del ciclo celular, el sistema vacuolar está fragmentado, y entrecruzado por estructuras conocidas como hebras transvacuolares (TVS, por sus siglas en inglés), que se extienden desde el núcleo hasta la periferia celular. Durante la mitosis, los compartimentos vacuolares se reorganizan en una estructura tubular, que al final de la mitosis derivan en una vacuola. En células meristemáticas de la raíz de *Arabidopsis*, el volumen vacuolar presenta una reducción de aproximadamente el 80% durante la citocinesis en comparación con las células en prometafase (Seguí-Simarro y Staehelin, 2006). Por lo que el estatus de la vacuola es crucial en la división celular, y potencialmente, afecta el volumen celular de la célula en división (Kutsuna y Hasezawa, 2002; Seguí-Simarro y Staehelin, 2006; Takatsuka y cols., 2023). Por lo que, a futuro, sería interesante explorar la morfología vacuolar en las células S-E adyacentes al sitio de infección con rizobia.

Otro marcador molecular que proporcionó evidencia adicional sobre la reactivación del ciclo celular en las células S-E en el sitio de infección epidermal fue la proteína de importación nuclear NLS-mTurquoise2. Este marcador permitió la ubicación del núcleo hacia el centro de las células S-E que subyacen al pelo radical en proceso de infección. Este análisis reveló una correlación entre la posición del núcleo y las etapas de la progresión del HI (Figura 22). En la etapa I, en el 95% de las S-E en el

sitio de infección, el núcleo está en el centro de la célula. De acuerdo a Van Brussel y cols., (1992), la reactivación del ciclo celular durante la infección suele estar acompañada por la migración del núcleo desde de la periferia celular hacia una posición central. Por lo que la posición del núcleo en las células S-E durante la etapa I de la infección es indicativo de que en estas células se ha reactivado el ciclo celular. Ciertamente, esta hipótesis debe ser sustentada por la visualización de marcadores de las fases G1, S, G2 y M, y eventualmente determinar el lapso en el que transcurre el ciclo celular al inicio de la nodulación en *P. vulgaris*. Como valor de referencia, el ciclo celular en la zona de proliferación del RAM tarda aproximadamente 17 hrs, mientras que en la zona de transición puede demandar 30 hrs (Hayashi y cols., 2013; Echevarra y cols., 2021) y puede ser variable según la capa celular en división (Pasternak y cols., 2021).

Otra importante contribución de este trabajo de tesis es la visualización de la PC como referente del estatus citocinético de las células S-E en el sitio de infección con rizobia en raíces de *P. vulgaris*, una aproximación pionera en el análisis de la división celular al inicio de la nodulación. El propósito era documentar la correlación entre citocinesis y la progresión del HI, una ardua tarea que logró tener muy buenos resultados. Uno de los marcadores *bona fide* para rastrear este proceso es la sintaxina específica de citocinesis vegetal KNOLLE (Lauber y cols., 1997; Touihri y cols., 2011; Steiner y cols., 2016). Al analizar el sitio de infección epidermal en raíces transgénicas de *P. vulgaris* que expresan la quimera YFP-*PvKNOLLE* se observó que el inicio de la formación de la PC en la célula S-E adyacente tenía lugar cuando el HI estaba en una fase avanzada de la etapa II, es decir, el HI estaba en elongación hacia la base del pelo radical (Figura 23). En la etapa III, previa al arribo del ápice del HI a la proximidad de la membrana basal del pelo radical, en preparación para la invasión de la célula S-E subyacente, en ésta se visualiza una PC, marcada con YFP-*PvKNOLLE*, en expansión hacia la periferia de la célula. En la etapa IV, que corresponde a la fase de penetración del HI a la célula S-E vecina en la que la señal de YFP-*PvKNOLLE* difunde de la PC hacia la membrana plasmática parental, lo que sugiere que la célula S-E está en citocinesis tardía o, eventualmente, en post-

citocinesis (Stierhof y El Kasmi, 2010). Sin embargo, para reforzar esta conclusión, se debe utilizar un marcador específico de fusión de la PC a la membrana plasmática parental, por ejemplo, TAN1 y POK1 (siglas en inglés de “Tangled 1” y “Phragmoplast Orienting Kinesin 1”, respectivamente; Smertenko y cols., 2017). La observación de la pérdida en la continuidad de la autofluorescencia, interrumpida por la fluorescencia de las rizobia, contenidas en el HI, fue el criterio para definir el sitio de penetración del HI a la S-E adyacente (Figura 23). En su conjunto, el análisis de estos escenarios indica que el HI penetra la célula S-E cuando ésta ha concluido la citocinesis, lo que implica un fino mecanismo de coordinación entre la progresión del HI y la citocinesis. Como referencia, en la línea celular BY2 y en las células en proliferación presentes en el RAM de Arabidopsis, la formación de la PC tiene una duración de 30-50 min, aproximadamente (Zhang y cols., 2011; van Oostende-Triplet y cols., 2017). De donde surgen las interrogantes: el avance del HI marca la pauta para la duración de la etapa citocinética en la célula S-E a invadir o viceversa; la coordinación entre estos procesos es una característica de la nodulación en *P. vulgaris*, o enmarca un nuevo paradigma en el estudio de la nodulación.

En resumen, el objetivo de este trabajo, que originalmente estaba orientado al análisis de la citocinesis en las células del sitio de infección, se extendió a un análisis de la longitud de las células y la posición del núcleo lo que contribuyó a ampliar el horizonte de nuestro conocimiento sobre la coordinación entre la infección epidermal y la división celular al inicio de la nodulación en la leguminosa modelo *P. vulgaris*. La integración de los resultados obtenidos permitió proponer un modelo de la dinámica entre el avance del HI y la división celular en el sitio de infección epidermal (Figura 24). En el que se plantea que la reactivación del ciclo celular en las células de la S-E subyacentes al sitio de infección epidermal tiene lugar desde la etapa I o formación de la microcolonia lo que en *M. truncatula* requiere de un periodo de aproximadamente 10-20 hrs (Fournier y cols., 2015). En este modelo, el HI se elonga a una velocidad de 4-5 $\mu\text{m/hr}$ (Fournier y cols., 2015).

9. CONCLUSIONES

Este trabajo es una contribución al conocimiento sobre la dinámica entre el HI y la división celular en el modelo de nodulación en *P. vulgaris*. La pregunta a responder era ¿existe una relación dinámica entre el avance del hilo de infección hacia la célula S-E adyacente y el status citocinético de esta célula? Fuimos pioneros al plantearnos y responder a tal pregunta, de así ambiciosa y de frontera. Los resultados obtenidos demuestran que en la infección epidermal de raíces de *P. vulgaris* hay una correlación dinámica entre el cruce del HI hacia la capa subepidermal y el status de citocinesis terminal de la célula S-E a ser invadida por el HI que sale del pelo radical. La estrategia aplicada fue la visualización de la formación de la placa celular (PC) en las células S-E adyacentes al sitio de infección. La PC es un excelente indicador de citocinesis en células vegetales. La visualización de YFP-PvKNOLLE, un marcador molecular esencial en la formación de la PC, aunado a un análisis descriptivo puntual y detallado de imágenes de las diferentes etapas de infección epidermal capturadas *in vivo*, permitió demostrar el HI penetra la célula S-E que está por concluir o ha concluido citocinesis, y sustenta que la hipótesis planteada es correcta, y abre la posibilidad de explorar qué mecanismos celulares y moleculares coordinan ambos eventos. Un tema que sería interesante de abordar a futuro.

Por otro lado, en un ejercicio que recapitula las aportaciones de este trabajo, es importante resaltar que el propósito original de este proyecto era establecer una ventana de tiempo entre el inicio de la infección y el cruce o salida del HI del pelo radical e invasión de la célula S-E adyacente y definir si ésta se encontraba en etapa pre-citocinética, en citocinesis terminal o post-citocinética. Definir una ventana de tiempo en un proceso tan largo como lo es la infección epidermal requiere de una estrategia de análisis por microscopía confocal *in vivo* con captura de imágenes durante 24-96 h, lo que resulta en experimento inviable por el momento. Quizás en un futuro y ampliando la gama de marcadores moleculares podríamos definir tal ventana de tiempo.

No obstante, se consideró que la pregunta inicial podía ser abordada con una estrategia que toma ventaja del conocimiento del proceso de infección en el pelo radical. Se sabe que la infección epidermal es un proceso continuo, es decir, en las raíces inoculadas la infección no se establece de manera sincronizada por lo que se observan eventos de infección en diferentes etapas. Dado que es difícil determinar el tiempo cero (T_0) en el proceso de infección pelo radical, se optó por clasificar el proceso de infección en las cuatro etapas (I-IV) descritas como un criterio "equivalente" a una ventana de tiempo. Por otro lado, las imágenes capturadas brindaron la oportunidad de obtener información sobre la longitud celular y el desplazamiento del núcleo o estructura nuclear hacia el centro de la célula S-E adyacente al sitio de infección. El análisis de estos datos aportó evidencia que sugiere que la reactivación del ciclo celular en la célula S-E tiene lugar cuando rizobia forma una microcolonia en el pelo radical enroscado, etapa que precede la formación de un HI. En el grupo de trabajo se está diseñando la estrategia experimental para documentar esta propuesta.

Como conclusión de este trabajo se propone un modelo de la dinámica entre el avance del HI y la división celular ([figura 24](#)) en raíces de *P. vulgaris* que postula que el ciclo celular de la célula S-E se reactiva paralelo a la formación de la microcolonia y concluye cuando el HI invade esta célula cuando se encuentra en etapa terminal de la citocinesis.

10. PERSPECTIVAS

- Establecer la línea de tiempo entre el diálogo molecular, el inicio de la infección epidermal, el avance del HI, la división de las S-E y la penetración del HI a la célula S-E adyacente en *P. vulgaris*.
- Desarrollar herramientas moleculares que permitan visualizar las fases del ciclo celular, G1, S, G2 y M en las células S-E adyacentes al sitio de infección epidermal, durante las etapas I-IV.
- Explorar las conclusiones de este proyecto en otras leguminosas que desarrollan nódulos determinados como *L. japonicus*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, O. M., Riva, O., & Peltzer, E. (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13548–13553. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405321101>
- Anderson, C. T., & Kieber, J. J. (2020). Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 39–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-081519-035846>
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Arrighi, J. F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., De Carvalho-Niebel, F., Journet, E. P., Ghérardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Dénarié, J., Rougé, P., & Gough, C. (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology*, *142*(1), 265–279. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084657>
- Arrighi, J. F., Godfroy, O., De Billy, F., Saurat, O., Jauneau, A., & Gough, C. (2008). The RPG gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(28), 9817–9822. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710273105>
- Ayala-Guzmán E. (2016). Análisis espacio-temporal de la actividad del promotor del gen PvKNOLLE en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* durante la nodulación. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Barnes, W. J., & Anderson, C. T. (2018). Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. *Molecular Plant*, *11*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.011>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints.

Methods in Molecular Biology, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-888-2_2

- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P. S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., & Papa, R. (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.1108973109>
- Boivin, S., & Lepetit, M. (2020). Partner preference in the legume-rhizobia symbiosis and impact on legume inoculation strategies. *Advances in Botanical Research*, 94, 323–348. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.016>
- Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2006). Biological N inputs. In *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415955-6.00015-3>
- Bucarey-Ruiz, F.C.A. (2021). Caracterización de la actividad espacio-temporal de promotor sintético prom35S-MSA en raíces transgénicas *Phaseolus vulgaris* inoculados con rizobia e identificación de genes de *P. vulgaris* cuyos promotores presenten motivos MSA. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K. S., Wen, J., Oldroyd, G. E. D., Downie, J. A., & Murray, J. D. (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(12), 4680–4701. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133496>
- Brewin, N. J. (2004). Plant cell wall remodelling in the rhizobium-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(4), 293–316. <https://doi.org/10.1080/07352680490480734>
- Brueggeman, J. M., Windham, I. A., & Nebenführ, A. (2022). Nuclear movement in growing *Arabidopsis* root hairs involves both actin filaments and microtubules. *Journal of Experimental Botany*, 73(16), 5388–5399. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac207>
- Cai, Z., Wang, Y., Zhu, L., Tian, Y., Chen, L., Sun, Z., Ullah, I., & Li, X. (2017). GmTIR1/GmAFB3-based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation. *New Phytologist*, 215(2), 672–686.

<https://doi.org/10.1111/nph.14632>

- Cárdenas, L., Alemán, E., Nava, N., Santana, O., Sánchez, F., & Quinto, C. (2006). Early responses to Nod factors and mycorrhizal colonization in a non-nodulating *Phaseolus vulgaris* mutant. *Planta*, 223(4), 746–754. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0132-9>
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J. J., Spaink, H. P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J., & Thomas-Oates, J. E. (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Molecular Biology*, 29(3), 453–464. <https://doi.org/10.1007/BF00020977>
- Cárdenas, L., Holdaway-clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., Hepler, P. K., Physiology, S. P., Jun, N., Cardenas, L., Holdaway-clarke, T. L., Sanchez, F., Quinto, C., Feij, J. A., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2000). *Ion Changes in Legume Root Hairs Responding to Nod Factors Linked references are available on JSTOR for this article : Ion Changes in Legume Root Hairs Responding to Nod Factors* '. 123(2), 443–451.
- Carrasco-Castilla, J., Ortega-Ortega, Y., Jáuregui-Zúñiga, D., Juárez-Verdayes, M. A., Arthikala, M.-K., Monroy-Morales, E., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., & Quinto, C. (2018). Down-regulation of a *Phaseolus vulgaris* annexin impairs rhizobial infection and nodulation. *Environmental and Experimental Botany*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.016>
- CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (2020). Mercado del frijol, situación y prospectiva. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/53Mercado%20del%20frijol.pdf>
- Cerri, M. R., Frances, L., Kelner, A., Fournier, J., Middleton, P. H., Auriac, M. C., Mysore, K. S., Wen, J., Erard, M., Barker, D. G., Oldroyd, G. E., & de Carvalho-Niebel, F. (2016). The symbiosis-related ERN transcription factors act in concert to coordinate rhizobial host root infection. *Plant Physiology*, 171(2), 1037–1054. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00230>
- Chakraborty, S., Valdés-López, O., Stonoha-Arther, C., & Ané, J. M. (2022). Transcription Factors Controlling the Rhizobium-Legume Symbiosis: Integrating Infection, Organogenesis and the Abiotic Environment. *Plant & Cell Physiology*,

- 63(10), 1326–1343. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac063>
- Chetri, S. P. K., Rahman, Z., Thomas, L., Lal, R., Gour, T., Agarwal, L. K., Vashishtha, A., Kumar, S., Kumar, G., Kumar, R., & Sharma, K. (2022). Paradigms of actinorhizal symbiosis under the regime of global climatic changes: New insights and perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 62(7), 764–778. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200043>
- Civelekoglu-Scholey, G., & Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: A historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. *Interface Focus*, 4(3). <https://doi.org/10.1098/rsfs.2013.0073>
- Clavijo, F., Diedhiou, I., Vaissayre, V., Brottier, L., Acolatse, J., Moukouanga, D., Crabos, A., Auguy, F., Franche, C., Gherbi, H., Champion, A., Hocher, V., Barker, D., Bogusz, D., Tisa, L. S., & Svistoonoff, S. (2015). The Casuarina NIN gene is transcriptionally activated throughout Frankia root infection as well as in response to bacterial diffusible signals. *New Phytologist*, 208(3), 887–903. <https://doi.org/10.1111/nph.13506>
- Clúa, J., Rivero, C. H., Roda, C., Giorgis, C., Donna, S., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2022). Transcriptomic analysis of Mesoamerican and Andean *Phaseolus vulgaris* accessions revealed mRNAs and lncRNAs associated with strain selectivity during symbiosis. *Scientific Reports*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06566-0>
- Dávila-Delgado, R., Bañuelos-Vazquez, L. A., Monroy-Morales, E., & Sánchez-López, R. (2020). *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604: a useful biological tool to study initial infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation. *Planta*, 252(4), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03479-y>
- Dubrovsky, J. G., Rost, T. L., Colón-Carmona, A., & Doerner, P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 214(1), 30–36. <https://doi.org/10.1007/s004250100598>
- Echevarra, C., Gutierrez, C., & Desvoyes, B. (2021). Tools for Assessing Cell-Cycle Progression in Plants. *Plant and Cell Physiology*, 62(8), 1231–1238. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab066>
- El Kasmi, F., Krause, C., Hiller, U., Stierhof, Y. D., Mayer, U., Conner, L., Kong, L.,

- Reichardt, I., Sanderfoot, A. A., & Jürgens, G. (2013). SNARE complexes of different composition jointly mediate membrane fusion in Arabidopsis cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 24(10), 1593–1601. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-02-0074>
- Emons, A. M. C., & Ketelaar, T. (2009). Root hairs. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*.
- Esau, K., & Gill H, R. (1991). *Distribution of Vacuoles and Some Other Organelles in Dividing Cells*. 152(4), 397–407.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. P., & Emons, A. M. C. (2003). Nod factor-induced root hair curling: Continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology*, 132(4), 1982–1988. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021634>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., & Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes. *Nature Protocols*, 2(7), 1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Estrada-Navarrete, G., Cruz-Mireles, N., Lascano, R., Alvarado-Affantranger, X., Hernández-Barrera, A., Barraza, A., Olivares, J. E., Arthikala, M. K., Cárdenas, L., Quinto, C., & Sanchez, F. (2016). An autophagy-related kinase is essential for the symbiotic relationship between phaseolus vulgaris and both rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 28(9), 2326–2341. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.01012>
- Facette, M. R., Rasmussen, C. G., & Van Norman, J. M. (2019). A plane choice: coordinating timing and orientation of cell division during plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.09.001>
- Fauvert, M., Verstraeten, N., Dombrecht, B., Venmans, R., Beullens, S., Heusdens, C., & Michiels, J. (2009). Rhizobium etli HrpW is a pectin-degrading enzyme and differs from phytopathogenic homologues in enzymically crucial tryptophan and glycine residues. *Microbiology*, 155(9), 3045–3054.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.027599-0>

- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Fernandez, A., Drozdzecki, A., Hoogewijs, K., Vassileva, V., Madder, A., Beeckman, T., & Hilson, P. (2015). The GLV6/RGF8/CLEL2 peptide regulates early pericycle divisions during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, *66*(17), 5245–5256. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv329>
- Fisher, A. P., & Sozzani, R. (2016). Uncovering the networks involved in stem cell maintenance and asymmetric cell division in the Arabidopsis root. *Current Opinion in Plant Biology*, *29*, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.11.002>
- Fournier, J., Teillet, A., Chabaud, M., Ivanov, S., Genre, A., Limpens, E., Carvalho-Niebel, F. De, & Barker, D. G. (2015). Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiology*, *167*(4), 1233–1242. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253302>
- Fournier, J., Timmers, A. C. J., Sieberer, B. J., Jauneau, A., Chabaud, M., & Barker, D. G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology*, *148*(4), 1985–1995. <https://doi.org/10.1104/pp.108.125674>
- Francis, D. (2007). The plant cell cycle - 15 Years on. *New Phytologist*, *174*(2), 261–278. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x>
- Franssen, H. J., Xiao, T. T., Kulikova, O., Wan, X., Bisseling, T., Scheres, B., & Heidstra, R. (2015). Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. *Development (Cambridge)*, *142*(17), 2941–2950. <https://doi.org/10.1242/dev.120774>
- Frioni, L., Minasian, H., & Volfovicz, R. (1999). Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *Forest Ecology and Management*, *115*(1), 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(98\)00432-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(98)00432-0)
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing

- Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/mnbr.68.2.280-300.2004>
- Gao, Z., Chen, Z., Cui, Y., Ke, M., Xu, H., Xu, Q., Chen, J., Li, Y., Huang, L., Zhao, H., Huang, D., Mai, S., Xu, T., Liu, X., Li, S., Guan, Y., Yang, W., Friml, J., Petrášek, J., ... Chen, X. (2021). GmPIN-dependent polar auxin transport is involved in soybean nodule development. *The Plant Cell*, 33(9), 2981–3003. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab183>
- Gauthier-Coles, C., White, R. G., & Mathesius, U. (2019). Nodulating legumes are distinguished by a sensitivity to cytokinin in the root cortex leading to pseudonodule development. *Frontiers in Plant Science*, 9(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01901>
- Gavrin, A., Chiasson, D., Ovchinnikova, E., Kaiser, B. N., Bisseling, T., & Fedorova, E. E. (2016). VAMP721a and VAMP721d are important for pectin dynamics and release of bacteria in soybean nodules. *New Phytologist*, 210(3), 1011–1021. <https://doi.org/10.1111/nph.13837>
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5), 883–893. <https://doi.org/10.1242/dev.071928>
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., & Frugier, F. (2006). The Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti. *Plant Cell*, 18(10), 2680–2693. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778>
- Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., & Schiefelbein, J. (2014). Root Hairs. *The Arabidopsis Book*, 12(12), e0172. <https://doi.org/10.1199/tab.0172>
- Gu, F., & Nielsen, E. (2013). Targeting and regulation of cell wall synthesis during tip growth in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(9), 835–846. <https://doi.org/10.1111/jipb.12077>
- Guinel, F. C. (2009a). Getting around the legume nodule: I. The structure of the peripheral zone in four nodule types. *Botany*, 87(12), 1117–1138.

<https://doi.org/10.1139/B09-074>

- Guinel, F. C. (2009b). Getting around the legume nodule: II. Molecular biology of its peripheral zone and approaches to study its vasculature. *Botany*, 87(12), 1139–1166. <https://doi.org/10.1139/B09-075>
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jurgens, G., & Ito, M. (2011). Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(2), 706–717. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180836>
- Han, X., Huang, L. J., Feng, D., Jiang, W., Miu, W., & Li, N. (2019). Plasmodesmata-related structural and functional proteins: The long sought-after secrets of a cytoplasmic channel in plant cell walls. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122946>
- Harrison, M. J., & Ivanov, S. (2017). Exocytosis for endosymbiosis: membrane trafficking pathways for development of symbiotic membrane compartments. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.019>
- Hayashi, K., Hasegawa, J., & Matsunaga, S. (2013). The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: Endoreduplication precedes rapid cell expansion. *Scientific Reports*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep02723>
- Hayashi, M., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., & Kawaguchi, M. (2000). Nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Research*, 113(4), 489–495. <https://doi.org/10.1007/pl00013959>
- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M. S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T. L., & Szczyglowski, K. (2014). *Lotus japonicus* cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell*, 26(2), 678–694. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119362>
- Ho-Plágaro, T., & García-Garrido, J. M. (2022). Molecular Regulation of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23115960>
- Hong, Z., & Verma, D. P. S. (2007). Molecular analysis of the cell plate forming

- machinery. *Plant Cell Monographs*, 9(July 2007), 303–320.
https://doi.org/10.1007/7089_2007_133
- Hossain, M. S., Liao, J., James, E. K., Sato, S., Tabata, S., Jurkiewicz, A., Madsen, L. H., Stougaard, J., Ross, L., & Szczyglowski, K. (2012). Lotus japonicus ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiology*, 160(2), 917–928.
<https://doi.org/10.1104/pp.112.202572>
- Ibáñez, F., Wall, L., & Fabra, A. (2017). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: Intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1905–1918. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw387>
- INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (2021). El cultivo del presente y futuro para frijol México. https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_librotecnico/12319_5085_El_cultivo_del_frijol_presente_y_futuro_para_M%C3%A9xico.pdf
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J. H., & Watanabe, A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell*, 13(8), 1891–1905. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.8.1891>
- Ito, Masaki, Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., & Watanabe, A. (1998). A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell*, 10(3), 331–341. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.3.331>
- Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: Conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006). SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631–643. <https://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jawaid, M. Z., Sinclair, R., Bulone, V., Cox, D. L., & Drakakaki, G. (2022). A biophysical model for plant cell plate maturation based on the contribution of a spreading force. *Plant Physiology*, 188(2), 795–806. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab552>
- Jin-Peng, G., Suyu, J., Yangyang, S., Ping, X., Junjie, W., Wenjie, L., Cheng-Wu, L., & Murray, J. D. (2022). Intracellular infection by symbiotic bacteria requires the

- mitotic kinase AURORA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(43), 1–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2202606119>
- Jones, K. M., Sharopova, N., Lohar, D. P., Zhang, J. Q., VandenBosch, K. A., & Walker, G. C. (2008). Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 704–709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709338105>
- Jürgens, G., Park, M., Richter, S., Touihri, S., Krause, C., Kasmi, F. El, & Mayer, U. (2015). Plant cytokinesis: A tale of membrane traffic and fusion. *Biochemical Society Transactions*, 43(July), 73–78. <https://doi.org/10.1042/BST20140246>
- Kawaharada, Y., Nielsen, M. W., Kelly, S., James, E. K., Andersen, K. R., Rasmussen, S. R., Füchtbauer, W., Madsen, L. H., Heckmann, A. B., Radutoiu, S., & Stougaard, J. (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14534>
- Ketelaar, T., Faivre-Moskalenko, C., Esseling, J. J., De Ruijter, N. C. A., Grierson, C. S., Dogterom, M., & Emons, A. M. C. (2002). Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: An actin-regulated process of tip growth. *Plant Cell*, 14(11), 2941–2955. <https://doi.org/10.1105/tpc.005892>
- King, G. M., & Weber, C. F. (2007). Distribution, diversity and ecology of aerobic CO-oxidizing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 5(2), 107–118. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1595>
- Kiss, E., Oláh, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A. B., Borbola, A., Lózsa, A., Kontár, K., Middleton, P., Downie, J. A., Oldroyd, G. E. D., & Endre, G. (2009). LIN, a novel type of U-Box/WD40 Protein, controls early infection by rhizobia in legumes. *Plant Physiology*, 151(3), 1239–1249. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143933>
- Kohlen, W., Ng, J. L. P., Deinum, E. E., & Mathesius, U. (2018). Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: Indeterminate and determinate nodules. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 229–244.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erx308>

- Kubenova, L., Ticha, M., Samaj, J., & Ovecka, M. (2022). ROOT HAIR DEFECTIVE 2 vesicular delivery to the apical plasma membrane domain during Arabidopsis root hair development. *Plant Physiology*, *188*(3), 1563–1585. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab595>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, *3*, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, *445*(7128), 652–655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>
- Kutsuna, N., & Hasezawa, S. (2002). Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology*, *43*(9), 965–973. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf138>
- Lace, B., Su, C., Perez, D. I., Rodriguez-Franco, M., Vernié, T., Batzenschlager, M., Egli, S., Liu, C.-W., & Ott, T. (2022). RPG acts as a central determinant for infectosome formation and cellular polarization during intracellular rhizobial infections. *BioRxiv*, 2022.06.03.494689. <http://biorxiv.org/content/early/2022/06/13/2022.06.03.494689.abstract>
- Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M. R., Ariel, F., Jardinaud, M. F., Gamas, P., De Carvalho-Niebel, F., & Niebel, A. (2014). Two CCAAT-box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant Journal*, *79*(5), 757–768. <https://doi.org/10.1111/tpj.12587>
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M. F., Mun, J. H., Larrainzar, E., Cook, D. R., Gamas, P., & Niebel, A. (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *Journal of Experimental Botany*, *65*(2), 481–494. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert392>

- Lardi, M., de Campos, S. B., Purtschert, G., Eberl, L., & Pessi, G. (2017). Competition experiments for legume infection identify *Burkholderia phymatum* as a highly competitive β -rhizobium. *Frontiers in Microbiology*, *8*(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01527>
- Lauber, M. H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., & Jürgens, G. (1997). The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *Journal of Cell Biology*, *139*(6), 1485–1493. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.6.1485>
- Lebedeva, M., Azarakhsh, M., Sadikova, D., & Lutova, L. (2021). At the root of nodule organogenesis: Conserved regulatory pathways recruited by rhizobia. *Plants*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122654>
- Li, M., Zhu, Y., Li, S., Zhang, W., Yin, C., & Lin, Y. (2022). Regulation of Phytohormones on the Growth and Development of Plant Root Hair. *Frontiers in Plant Science*, *13*(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865302>
- Li, X., Liu, M., Cai, M., Chiasson, D., Groth, M., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Parniske, M., Allan Downie, J., & Xie, F. (2023). RPG interacts with E3-ligase CERBERUS to mediate rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics*, *19*(2), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010621>
- Liang, P., Schmitz, C., Lace, B., Ditengou, F. A., Su, C., Schulze, E., Knerr, J., Grosse, R., Keller, J., Libourel, C., Delaux, P. M., & Ott, T. (2021). Formin-mediated bridging of cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*. *Current Biology*, *31*(12), 2712–2719.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.002>
- Limpens, E., & Bisseling, T. (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(4), 343–350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00068-2)
- Lin, F., Krishnamoorthy, P., Schubert, V., Hause, G., Heilmann, M., & Heilmann, I. (2019). A dual role for cell plate-associated PI4K β in endocytosis and phragmoplast dynamics during plant somatic cytokinesis. *The EMBO Journal*, *38*(4), 1–26. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100303>
- Lin, J., Frank, M., & Reid, D. (2020). No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Communications*,

- 1(5), 100104. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>
- Liu, C. W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., Liu, M., Xie, F., Endre, G., de Carvalho-Niebel, F., Oldroyd, G. E. D., Udvardi, M. K., Fournier, J., & Murray, J. D. (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10029-y>
- Liu, M., Kameoka, H., Oda, A., Maeda, T., Goto, T., Yano, K., Soyano, T., & Kawaguchi, M. (2023). The effects of ERN1 on gene expression during early rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Frontiers in Plant Science*, 13(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.995589>
- Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., & Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Łotocka, B., Kopcińska, J., & Skalniak, M. (2012). Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis*, 58(1–3), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s13199-013-0225-3>
- Lukowitz, W., Mayer, U., & Jürgens, G. (1996). Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell*, 84(1), 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80993-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80993-9)
- Ma, Y., & Chen, R. (2021). Nitrogen and Phosphorus Signaling and Transport During Legume–Rhizobium Symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 12(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683601>
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2004). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Chemtracts*, 17(9), 508–514.
- Maekawa-Yoshikawa, M., & Murooka, Y. (2009). Root hair deformation of symbiosis-

- deficient mutants of *Lotus japonicus* by application of nod factor from *Mesorhizobium loti*. *Microbes and Environments*, 24(2), 128–134. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09103>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Maillet, F., Fournier, J., Mendis, H. C., Tadege, M., Wen, J., Ratet, P., Mysore, K. S., Gough, C., & Jones, K. M. (2020). Sinorhizobium meliloti succinylated high-molecular-weight succinoglycan and the *Medicago truncatula* LysM receptor-like kinase MtLYK10 participate independently in symbiotic infection. *Plant Journal*, 102(2), 311–326. <https://doi.org/10.1111/tpj.14625>
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>
- Mathesius, U. (2008). Goldacre paper: Auxin: At the root of nodule development? *Functional Plant Biology*, 35(8), 651–668. <https://doi.org/10.1071/FP08177>
- Mayer, U., Torres Ruiz, R. A., Berleth, T., Misera, S., & Jurgens, G. (1991). *Arabidopsis embryo*. 402–407.
- McGuinness, P. N., Reid, J. B., & Foo, E. (2020). Brassinosteroids play multiple roles in nodulation of pea via interactions with ethylene and auxin. *Planta*, 252(4), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03478-z>
- Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant Journal*, 41(4), 546–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>
- Miart, F., Desprez, T., Biot, E., Morin, H., Belcram, K., Höfte, H., Gonneau, M., & Vernhettes, S. (2014). Spatio-temporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 77(1), 71–84. <https://doi.org/10.1111/tpj.12362>
- Miri, M., Janakirama, P., Huebert, T., Ross, L., McDowell, T., Orosz, K., Markmann,

- K., & Szczyglowski, K. (2019). Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytologist*, 222(3), 1523–1537. <https://doi.org/10.1111/nph.15683>
- Miyahara, A., Richens, J., Starker, C., Morieri, G., Smith, L., Long, S., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. D. (2010). Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component during Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(12), 1553–1562. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0144>
- Mnasri, B., Badri, Y., Saïdi, S., de Lajudie, P., & Mhamdi, R. (2009). Symbiotic diversity of *Ensifer meliloti* strains recovered from various legume species in Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(8), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.07.007>
- Molendijk, A. J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C. S. V., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., & Palme, K. (2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO Journal*, 20(11), 2779–2788. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2779>
- Monahan-Giovanelli, H., Pinedo, C. A., & Gage, D. J. (2006). Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 140(2), 661–670. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072876>
- Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-Debuen, A., & Sánchez-López, R. (2022). Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>
- Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., & Sánchez-López, R. (2021). MAQUINARIA DE CITOCINESIS EN PLANTAS: ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS. 40(4), 153–166.
- Montiel, Jesús, Arthikala, M. K., & Quinto, C. (2013). *Phaseolus vulgaris* RbohB functions in lateral root development. *Plant Signaling and Behavior*, 8(1), 144–146. <https://doi.org/10.4161/psb.22694>

- Montiel, Jesus, Reid, D., Gronbaek, T. H., Benfeldt, C. M., James, E. K., Ott, T., Ditengou, F. A., Nadzieja, M., Kelly, S., & Stougaard, J. (2021). Distinct signaling routes mediate intercellular and intracellular rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, *185*(3), 1131–1147. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA049>
- Mortier, V., Wasson, A., Jaworek, P., De Keyser, A., Decroos, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Mathesius, U., & Goormachtig, S. (2014). Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, *202*(2), 582–593. <https://doi.org/10.1111/nph.12681>
- Motte, H., Vanneste, S., & Beeckman, T. (2019). Molecular and Environmental Regulation of Root Development. *Annual Review of Plant Biology*, *70*, 465–488. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100423>
- Muñoz, J., Coronado, C., Pérez-Hormaeche, J., Kondorosy, A., Ratet, P., & Palomares, A. (1998). *MsPG3*, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa – *Rhizobium meliloti* interaction. *95*(August), 9687–9692.
- Murray, J. D. (2011). Invasion by invitation: Rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(6), 631–639. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0181>
- Murray, J. D., Karas, B. J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., & Szczyglowski, K. (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science*, *315*(5808), 101–104. <https://doi.org/10.1126/science.1132514>
- Murray, J. D., Muni, R. R. D., Torres-Jerez, I., Tang, Y., Allen, S., Andriankaja, M., Li, G., Laxmi, A., Cheng, X., Wen, J., Vaughan, D., Schultze, M., Sun, J., Charpentier, M., Oldroyd, G., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K. S., Chen, R., & Udvardi, M. K. (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 Journal*, *65*(2), 244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04415.x>
- Nadzieja, M., Kelly, S., Stougaard, J., & Reid, D. (2018). Epidermal auxin

- biosynthesis facilitates rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Journal*, 95(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/tpj.13934>
- Nadzieja, M., Stougaard, J., & Reid, D. (2019). A Toolkit for High Resolution Imaging of Cell Division and Phytohormone Signaling in Legume Roots and Root Nodules. *Frontiers in Plant Science*, 10(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01000>
- Napoli, C. A., & Hubbell, D. H. (1975). *Rhizobium-Induced Infection Threads*. 30(6), 1003–1009.
- Ng, J. L. P., & Mathesius, U. (2018). Acropetal auxin transport inhibition is involved in indeterminate but not determinate nodule formation. *Frontiers in Plant Science*, 9(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00169>
- Novák, D., Kuchařová, A., Oveřcka, M., Komis, G., & Šamaj, J. (2016). Developmental nuclear localization and quantification of GFP-Tagged EB1c in arabidopsis root using Light-Sheet Microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 6(JAN2016), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01187>
- O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., McClean, P. E., Li, J., Dai, X., Zhao, P. X., Hernandez, G., & Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Pacios-Bras, C., Schlaman, H. R. M., Boot, K., Admiraal, P., Langerak, J. M., Stougaard, J., & Spaink, H. P. (2003). Auxin distribution in *Lotus japonicus* during root nodule development. *Plant Molecular Biology*, 52(6), 1169–1180. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000004308.78057.f5>
- Park, E., Díaz-Moreno, S. M., Davis, D. J., Wilkop, T. E., Bulone, V., & Drakakaki, G. (2014). Endosidin 7 specifically arrests late cytokinesis and inhibits callose

- biosynthesis, revealing distinct trafficking events during cell plate maturation. *Plant Physiology*, 165(3), 1019–1034. <https://doi.org/10.1104/pp.114.241497>
- Pasternak, T., Kircher, S., & Palme, K. (2021). Estimation of differential cell cycle kinetics in higher plant root meristem with cellular fate and positional resolution. *BioRxiv*, February. <https://doi.org/10.1101/2021.01.01.425043>
- Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S., & Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of Legume Root Nodules. *International Review of Cytology*, 234, 201–262. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)34005-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)34005-2)
- Peleg-Grossman, S., Volpin, H., & Levine, A. (2007). Root hair curling and Rhizobium infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1637–1649. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm013>
- Peralta, H., Aguilar, A., Díaz, R., Mora, Y., Martínez-Batallar, G., Salazar, E., Vargas-Lagunas, C., Martínez, E., Encarnación, S., Girard, L., & Mora, J. (2016). Genomic studies of nitrogen-fixing rhizobial strains from *Phaseolus vulgaris* seeds and nodules. *BMC Genomics*, 17(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3053-z>
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., & Bennett, M. J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>
- Perrine-Walker, F. M., Kouchi, H., & Ridge, R. W. (2014). Endoplasmic reticulum-targeted GFP reveals ER remodeling in Mesorhizobium-treated *Lotus japonicus* root hairs during root hair curling and infection thread formation. *Protoplasma*, 251(4), 817–826. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0584-x>
- Perrine-Walker, F. M., Lartaud, M., Kouchi, H., & Ridge, R. W. (2014). Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the Mesorhizobium-Lotus symbiosis. *Protoplasma*, 251(5), 1099–1111. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0618-z>
- Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection

- during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>
- Qiu, L., Lin, J. S., Xu, J., Sato, S., Parniske, M., Wang, T. L., Downie, J. A., & Xie, F. (2015). SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genetics*, 11(10), 1–27.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005623>
- Quilbé, J., Montiel, J., Arrighi, J. F., & Stougaard, J. (2022). Molecular Mechanisms of Intercellular Rhizobial Infection: Novel Findings of an Ancient Process. *Frontiers in Plant Science*, 13(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.922982>
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585–592. <https://doi.org/10.1038/nature02039>
- Rae, A. E., Rolland, V., White, R. G., & Mathesius, U. (2021). New methods for confocal imaging of infection threads in crop and model legumes. *Plant Methods*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00725-6>
- Rasmussen, C. G., & Bellinger, M. (2018). An overview of plant division-plane orientation. *New Phytologist*, 219(2), 505–512.
<https://doi.org/10.1111/nph.15183>
- Rathbun, E. A., Naldrett, M. J., & Brewin, N. J. (2002). Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of Rhizobium-induced infection threads in pea root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(4), 350–359.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.4.350>
- Reichardt, I., Stierhof, Y. D., Mayer, U., Richter, S., Schwarz, H., Schumacher, K., & Jürgens, G. (2007). Plant Cytokinesis Requires De Novo Secretory Trafficking but Not Endocytosis. *Current Biology*, 17(23), 2047–2053.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.040>
- Reid, D., Nadzieja, M., Novák, O., Heckmann, A. B., Sandal, N., & Stougaard, J. (2017). Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiology*, 175(1), 361–375.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00832>

- Rendón-Anaya, M., Montero-Vargas, J. M., Saburido-Álvarez, S., Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Ordaz-Ortiz, J. J., Aguilar, O. M., Vianello-Brondani, R. P., Santalla, M., Delaye, L., Gabaldón, T., Gepts, P., Winkler, R., Guigó, R., Delgado-Salinas, A., & Herrera-Estrella, A. (2017). Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species. *Genome Biology*, *18*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1190-6>
- Rightmyer, A. P., & Long, S. R. (2011). Pseudonodule formation by wild-type and symbiotic mutant *Medicago truncatula* in response to auxin transport inhibitors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(11), 1372–1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-11-0103>
- Rípodas, C., Castaingts, M., Clúa, J., Villafañe, J., Blanco, F. A., & Zanetti, M. E. (2019). The PvNF-YA1 and PvNF-YB7 subunits of the heterotrimeric nf-y transcription factor influence strain preference in the *Phaseolus vulgaris*–*rhizobium etli* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, *10*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00221>
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., & Mateos, P. F. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(19), 7064–7069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802547105>
- Rodríguez-Llorente, I. D., Pérez-Hormaeche, J., El Mounadi, K. El, Dary, M., Caviedes, M. A., Cosson, V., Kondorosi, A., Ratet, P., & Palomares, A. J. (2004). From pollen tubes to infection threads: Recruitment of *Medicago* floral pectic genes for symbiosis. *Plant Journal*, *39*(4), 587–598. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02155.x>
- Rosquete, M. R., Davis, D. J., & Drakakaki, G. (2018). The plant trans-golgi network: Not just a matter of distinction. *Plant Physiology*, *176*(1), 187–198. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01239>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic

- Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Sablowski, R., & Gutierrez, C. (2022). Cycling in a crowd: Coordination of plant cell division, growth, and cell fate. *Plant Cell*, 34(1), 193–208. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab222>
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2021). <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/estima-agricultura-crecimiento-de-11-4-de-la-produccion-de-frijol-en-2021-mantiene-tendencia-al-alza#:~:text=mil%20101%20pesos.-,En%20el%20campo%20mexicano%20se%20cosecha%204.0%20por%20ciento%20de,producci%C3%B3n%20result%C3%B3%20la%20dependencia%20federal>
- Salazar-Henao, J. E., Vélez-Bermúdez, I. C., & Schmidt, W. (2016). The regulation and plasticity of root hair patterning and morphogenesis. *Development (Cambridge)*, 143(11), 1848–1858. <https://doi.org/10.1242/dev.132845>
- Sañko-Sawczenko, I., Dmitruk, D., Łotocka, B., Róžańska, E., & Czarnocka, W. (2019). Expression analysis of PIN genes in root tips and nodules of lotus japonicus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020235>
- Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., Thomas, A., Luptak, J., Ramakrishnan, K., Carpenter, M. D., Mysore, K. S., Wen, J., Ahnert, S., Grieneisen, V. A., & Oldroyd, G. E. D. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Current Biology*, 29(21), 3657–3668.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.005>
- Schütz, L. M., Louveaux, M., Vilches Barro, A., Bouziri, S., Cerrone, L., Wolny, A., Kreshuk, A., Hamprecht, F. A., & Maizel, A. (2021). Integration of Cell Growth and Asymmetric Division during Lateral Root Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 62(8), 1269–1279. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab038>
- Seguí-Simarro, J. M., Austin, J. R., White, E. A., & Staehelin, L. A. (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell*, 16(4), 836–856. <https://doi.org/10.1105/tpc.017749>

- Seguí-Simarro, J. M., & Staehelin, L. A. (2006). Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: A quantitative and spatial analysis. *Planta*, 223(2), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0082-2>
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>
- Shaw, S. L., Dumais, J., & Long, S. R. (2000). Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 124(3), 959–969. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.959>
- Shi, Y., Luo, C., Xiang, Y., & Qian, D. (2023). *SNAREs work together to regulate Arabidopsis cell plate formation*. February, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120841>
- Shibata, M., & Sugimoto, K. (2019). A gene regulatory network for root hair development. *Journal of Plant Research*, 132(3), 301–309. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01100-2>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sieberer, B., & Emons, A. M. C. (2000). Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma*, 214(1–2), 118–127. <https://doi.org/10.1007/BF02524268>
- Sieberer, B. J., Timmers, A. C. J., & Emons, A. M. C. (2005). Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair reorientation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(11), 1195–1204. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1195>
- Sieberer, B. J., Timmers, A. C. J., Lhuissier, F. G. P., & Emons, A. M. C. (2002). Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiology*, 130(2), 977–988. <https://doi.org/10.1104/pp.004267>

- Sinclair, R., Hsu, G., Davis, D., Chang, M., Rosquete, M., Iwasa, J. H., & Drakakaki, G. (2022). Plant cytokinesis and the construction of new cell wall. *FEBS Letters*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14426>
- Singh, G., Pereira, D., Baudrey, S., Hoffmann, E., Ryckelynck, M., Asnacios, A., & Chabouté, M. E. (2021). Real-time tracking of root hair nucleus morphodynamics using a microfluidic approach. *Plant Journal*, 108(2), 303–313. <https://doi.org/10.1111/tpj.15511>
- Singh, J., Varshney, V., & Mishra, V. (2023). AUR1 and its pals: orchestration of intracellular rhizobia infection in legume for nitrogen fixation. *Plant Cell Reports*, 42(3), 649–653. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-02979-x>
- Sinorhizobium, D., & Gage, D. J. (2002). *2002 Analysis of Infection Thread Development Using Gfp- and DsRed-Expressing Sinorhizobium meliloti.pdf*. 184(24), 7042–7046. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.7042>
- Smertenko, A. (2018). Phragmoplast expansion: the four-stroke engine that powers plant cytokinesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 46, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.07.011>
- Smertenko, A., Assaad, F., Baluška, F., Bezanilla, M., Buschmann, H., Drakakaki, G., Hauser, M. T., Janson, M., Mineyuki, Y., Moore, I., Müller, S., Murata, T., Otegui, M. S., Panteris, E., Rasmussen, C., Schmit, A. C., Šamaj, J., Samuels, L., Staehelin, L. A., ... Žárský, V. (2017). Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends in Cell Biology*, 27(12), 885–894. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.008>
- Smertenko, A., Hewitt, S. L., Jacques, C. N., Kacprzyk, R., Liu, Y., Marcec, M. J., Moyo, L., Ogden, A., Oung, H. M., Schmidt, S., & Serrano-Romero, E. A. (2018). Phragmoplast microtubule dynamics - A game of zones. *Journal of Cell Science*, 131(2), 1–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.203331>
- Smet, I. De. (2008). *Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root*. *Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root*. May 2014. <https://doi.org/10.1126/science.1160158>
- Soyano, T., Liu, M., Kawaguchi, M., & Hayashi, M. (2021). Leguminous nodule

- symbiosis involves recruitment of factors contributing to lateral root development. *Current Opinion in Plant Biology*, 59, 102000. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.102000>
- Soyano, T., Shimoda, Y., Kawaguchi, M., & Hayashi, M. (2019). A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus. *Science*, 366(6468), 1021–1023. <https://doi.org/10.1126/science.aax2153>
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation: Tansley review. *New Phytologist*, 174(1), 11–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x>
- Stanislas, T., & Jaillais, Y. (2019). Plant Cell Biology: How to Give Root Hairs Enough ROPs? *Current Biology*, 29(11), R405–R407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.023>
- Stéger, A., & Palmgren, M. (2022). Root hair growth from the pH point of view. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.949672>
- Steiner, A., Müller, L., Rybak, K., Vodermaier, V., Facher, E., Thellmann, M., Ravikumar, R., Wanner, G., Hauser, M. T., & Assaad, F. F. (2016). The Membrane-Associated Sec1/Munc18 KEULE is Required for Phragmoplast Microtubule Reorganization during Cytokinesis in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 9(4), 528–540. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.005>
- Stierhof, Y. D., & El Kasmi, F. (2010). Strategies to improve the antigenicity, ultrastructure preservation and visibility of trafficking compartments in Arabidopsis tissue. *European Journal of Cell Biology*, 89(2–3), 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.12.003>
- Su, C., Klein, M. L., Hernández-Reyes, C., Batzenschlager, M., Ditengou, F. A., Lace, B., Keller, J., Delaux, P. M., & Ott, T. (2020). The medicago truncatula DREPP protein triggers microtubule fragmentation in membrane nanodomains during symbiotic infections. *Plant Cell*, 32(5), 1689–1702. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00777>
- Su, C., Zhang, G., Rodriguez-Franco, M., Hinnenberg, R., Wietschorke, J., Liang, P., Yang, W., Uhler, L., Li, X., & Ott, T. (2023). Transcellular progression of infection threads in Medicago truncatula roots is associated with locally confined

- cell wall modifications. *Current Biology*, 33(3), 533-542.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.051>
- Subramani, M., Urrea, C. A., Habib, R., Bhide, K., Thimmapuram, J., & Kalavacharla, V. (2023). Comparative Transcriptome Analysis of Tolerant and Sensitive Genotypes of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Response to Terminal Drought Stress. *Plants*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/plants12010210>
- Suzaki, T., Ito, M., & Kawaguchi, M. (2013). Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00042>
- Suzaki, T., Ito, M., Yoro, E., Sato, S., Hirakawa, H., Takeda, N., & Kawaguchi, M. (2014). Endoreduplication-mediated initiation of symbiotic organ development in *Lotus japonicus*. *Development (Cambridge)*, 141(12), 2441–2445. <https://doi.org/10.1242/dev.107946>
- Suzaki, T., Yano, K., Ito, M., Umehara, Y., Suganuma, N., & Kawaguchi, M. (2012). Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development (Cambridge)*, 139(21), 3997–4006. <https://doi.org/10.1242/dev.084079>
- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M. (2015). Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 316). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Takatsuka, H., Higaki, T., & Ito, M. (2023). At the Nexus between Cytoskeleton and Vacuole: How Plant Cytoskeletons Govern the Dynamics of Large Vacuoles. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24044143>
- Takatsuka, H., & Ito, M. (2020). Cytoskeletal Control of Planar Polarity in Root Hair Development. *Frontiers in Plant Science*, 11(September), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.580935>
- Tate, R., Patriarca, E. J., Riccio, A., Defez, R., & Iaccarino, M. (1994). Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. In *Molecular Plant-Microbe Interactions*

- (Vol. 7, Issue 5, pp. 582–589). <https://doi.org/10.1094/MPMI-7-0582>
- Timmers, A. C. J., Auriac, M. C., & Truchet, G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*, *126*(16), 3617–3628. <https://doi.org/10.1242/dev.126.16.3617>
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Albrechtsen, A. S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., & Stougaard, J. (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*, *315*(5808), 104–107. <https://doi.org/10.1126/science.1132397>
- Tong, W., Li, X., Wang, E., Cao, Y., Chen, W., Tao, S., & Wei, G. (2020). Genomic insight into the origins and evolution of symbiosis genes in Phaseolus vulgaris microsymbionts. *BMC Genomics*, *21*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6578-0>
- Touihri, S., Knöll, C., Stierhof, Y. D., Müller, I., Mayer, U., & Jürgens, G. (2011). Functional anatomy of the Arabidopsis cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE. *Plant Journal*, *68*(5), 755–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04736.x>
- Tsyganova, A. V., Brewin, N. J., & Tsyganov, V. E. (2021). Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads. *Cells*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051050>
- Tsyganova, A. V., Seliverstova, E. V., Brewin, N. J., & Tsyganov, V. E. (2019). Comparative analysis of remodelling of the plant–microbe interface in Pisum sativum and Medicago truncatula symbiotic nodules. *Protoplasma*, *256*(4), 983–996. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01355-5>
- Van Brussel, A. A. N., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P. C., Spaink, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J., & Kijne, J. W. (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of rhizobium. *Science*, *257*(5066), 70–72. <https://doi.org/10.1126/science.257.5066.70>
- van Oostende-Triplet, C., Guillet, D., Triplet, T., Pandzic, E., Wiseman, P. W., & Geitmann, A. (2017). Vesicle dynamics during plant cell cytokinesis reveals

- distinct developmental phases. *Plant Physiology*, 174(3), 1544–1558.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.00343>
- Van Spronsen, P. C., Grønlund, M., Bras, C. P., Spaink, H. P., & Kijne, J. W. (2001). Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(7), 839–847.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.7.839>
- Van Zeijl, A., Op Den Camp, R. H. M., Deinum, E. E., Charnikhova, T., Franssen, H., Op Den Camp, H. J. M., Bouwmeester, H., Kohlen, W., Bisseling, T., & Geurts, R. (2015). Rhizobium Lipo-chitooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in Medicago truncatula Roots. *Molecular Plant*, 8(8), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.010>
- Vavrdová, T., Šamaj, J., & Komis, G. (2019). Phosphorylation of plant microtubule-associated proteins during cell division. *Frontiers in Plant Science*, 10(March). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00238>
- Velandia, K., Reid, J. B., & Foo, E. (2022). Right time, right place: The dynamic role of hormones in rhizobial infection and nodulation of legumes. *Plant Communications*, 3(5), 100327. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100327>
- Vernié, T., Kim, J., Frances, L., Ding, Y., Sun, J., Guan, D., Niebel, A., Gifford, M. L., de Carvalho-Niebel, F., & Oldroyd, G. E. D. (2015). The NIN transcription factor coordinates diverse nodulation programs in different tissues of the medicago truncatula root. *Plant Cell*, 27(12), 3410–3424. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00461>
- Vissenberg, K., Claeijs, N., Balcerowicz, D., & Schoenaers, S. (2020). Hormonal regulation of root hair growth and responses to the environment in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2412–2427. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA048>
- Waizenegger, I., Lukowitz, W., Assaad, F., Schwarz, H., Jürgens, G., & Mayer, U. (2000). The Arabidopsis KNOLLE and KEULE genes interact to promote vesicle fusion during cytokinesis. *Current Biology*, 10(21), 1371–1374. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00775-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00775-2)
- Wang, C., Zhu, M., Duan, L., Yu, H., Chang, X., Li, L., Kang, H., Feng, Y., Zhu, H.,

- Hong, Z., & Zhang, Z. (2015). Lotus japonicus clathrin heavy chain1 is associated with rho-like GTPase ROP6 and involved in nodule formation. *Plant Physiology*, 167(4), 1497–1510. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256107>
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334–342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>
- Wang, Z. (2021). Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/cells10123327>
- Xiao, T. T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E. E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., & Bisseling, T. (2014). Fate map of Medicago truncatula root nodules. *Development (Cambridge)*, 141(18), 3517–3528. <https://doi.org/10.1242/dev.110775>
- Xie, F., Murray, J. D., Kim, J., Heckmann, A. B., Edwards, A., Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 633–638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113992109>
- Yang, J. (2022). *Mechanisms underlying legume – rhizobium symbioses*. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume–rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244–267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Yano, K., Shibata, S., Chen, W. L., Sato, S., Kaneko, T., Jurkiewicz, A., Sandal, N., Banba, M., Imaizumi-Anraku, H., Kojima, T., Ohtomo, R., Szczyglowski, K., Stougaard, J., Tabata, S., Hayashi, M., Kouchi, H., & Umehara, Y. (2009). CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Journal*, 60(1), 168–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03943.x>

- Yokota, K., Fukai, E., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Rueda, P., Radutoiu, S., Held, M., Hossain, M. S., Szczyglowski, K., Morieri, G., Oldroyd, G. E. D., Downie, J. A., Nielsen, M. W., Rusek, A. M., Sato, S., Tabata, S., James, E. K., Oyaizu, H., Sandal, N., & Stougaard, J. (2009). Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of lotus japonicus roots by Mesorhizobium loti. *Plant Cell*, 21(1), 267–284. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063693>
- Zhang, L., Zhang, H., Liu, P., Hao, H., Jin, J. B., & Lin, J. (2011). Arabidopsis R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026129>
- Zhang, X., Han, L., Wang, Q., Zhang, C., Yu, Y., Tian, J., & Kong, Z. (2019). The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in Medicago truncatula. *New Phytologist*, 221(2), 1049–1059. <https://doi.org/10.1111/nph.15423>
- Zhang, X., Wang, Q., Wu, J., Qi, M., Zhang, C., Huang, Y., Wang, G., Wang, H., Tian, J., Yu, Y., Chen, D., Li, Y., Wang, D., Zhang, Y., Xue, Y., & Kong, Z. (2022). A legume kinesin controls vacuole morphogenesis for rhizobia endosymbiosis. *Nature Plants*, 8(11), 1275–1288. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01261-4>
- Zheng, Q., Takei-Hoshi, R., Okumura, H., Ito, M., Kawaguchi, K., Otagaki, S., Matsumoto, S., Luo, Z., Zhang, Q., & Shiratake, K. (2022). Genome editing of SIMYB3R3 , a cell cycle transcription factor gene of tomato, induces elongated fruit shape . *Journal of Experimental Botany*, 73(22), 7312–7325. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac352>
- Zhukov, V., Radutoiu, S., Madsen, L. H., Rychagova, T., Ovchinnikova, E., Borisov, A., Tikhonovich, I., & Stougaard, J. (2008). The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1600–1608. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1600>

12. ANEXO 1

Tabla 1. Características fenotípicas de mutantes en la formación del hilo de infección en *Medicago truncatula* y/o *Lotus japonicus*. HI – (no se forman hilos de infección); CCD – (no hay división de células corticales); HI – def (HI deficiente, que permanece en el pelo radical); pseudo-nódulos (nódulos pequeños, color blanco y no infectados con rizobia).

Gen	Nombre	Fenotipo mutante		Referencias
NFR5 NFR1	<u>n</u> od <u>f</u> actor <u>r</u> eceptors	HI -	CCD -	Radutoiu <i>et al.</i> , 2003
NIN	TF, <u>n</u> odule <u>i</u> nception	HI -	CCD -	Schauser <i>et al.</i> , 1999
SYMRK	<u>s</u> ymbiosis <u>r</u> eceptor-like <u>k</u> inase	HI -	CCD -	Stracke <i>et al.</i> , 2002
DMI3	CCaMK, <u>d</u> oesn't <u>m</u> ake <u>i</u> nfections.	HI -	CCD -	Wais <i>et al.</i> , 2000 Gleason <i>et al.</i> , 2006
NSP1 NSP2	TF, <u>n</u> odulation <u>s</u> ignaling <u>p</u> athway	HI -	CCD -	Oldroyd and Long, 2003
ERN1	TF, <u>E</u> RF required for <u>n</u> odulation	HI -	CCD -	Kawaharada <i>et al.</i> , 2017
NF-YA1 NF-YB1	TF, <u>n</u> uclear transcription <u>f</u> actor <u>Y</u> subunit	HI - def	pseudo-nódulos	Laporte <i>et al.</i> , 2014 Soyano <i>et al.</i> , 2013
CYCLOPS	TF, CCaMK-regulated DNA-binding transcriptional activator	HI - def	pseudo-nódulos	Yano <i>et al.</i> , 2008
ARPC1	<u>a</u> ctin- <u>r</u> elated <u>p</u> rotein <u>c</u> omponent1	HI - def	pseudo-nódulos	Hossain <i>et al.</i> , 2012
NPL	<u>n</u> odulation <u>p</u> ectate <u>l</u> yase	HI - def	pseudo-nódulos	Xie <i>et al.</i> , 2012

Tabla 2. Maquinaria molecular involucrada en la formación de la placa celular (PC) en células vegetales.

Proteínas	Mutantes	Función	Etapas en la que participan	Referencias
CLC2 AP1μ2 ECA1	<i>ap1m2-1</i>	Regular la formación de vesículas cubiertas por clatrina (CCV)	Biogénesis y maduración de la PC	Van Damme et al., 2011 Teh et al., 2013 Song et al., 2012
KNOLLE VAMP721/722 SYP71	<i>knolle</i> <i>vamp721/vamp722</i> <i>syp71</i>	Promover la fusión de vesículas en la placa celular (PC)	Biogénesis de la PC	Lauber et al. 1997 Park et al., 2018 Zhang et al., 2011 El Kasmi et al., 2013
KEULE	<i>keule</i>			Assaad et al., 1996
TRAPP II (Trs120, Trs130) EXO70A1, EXO84b	<i>trs120-4</i> <i>Trs130/club</i> <i>exo70A1,</i> <i>exo84b</i>	Regular el tráfico de salida del TGN	Biogénesis de la PC Maduración de la PC	Rybak et al., 2014 Kalde et al., 2019 Jaber et al., 2010 Fendrych et al., 2010
RABA2/3, RABA1c, RABA1d, RABA1e ROP4	<i>Rab-A2a</i>	Regular la formación de vesículas	Biogénesis de la PC	Chow et al., 2008 Davis et al., 2015 Molendijk et al., 2001
GNOM BIG1-4	<i>emb30/gnom</i> <i>big1-4</i>	Promover la formación de vesículas Reguladores del tráfico post-Golgi	Posición de la PC Biogénesis de la PC	Chow et al., 2008 Dhonukshe et al., 2006 Richter et al., 2014
Fragmoplastinas: DRP1A, DRP1E DRP2A, DRP2B	<i>drp1a, drp1e</i> <i>drp2a, drp2b</i>	Mediar la formación de CCV y remodelamiento de vesículas de la PC	Maduración de la PC	Kang et al., 2003
SH3P2	<i>sh3p2</i>	Reclutar a DRP1A a la PC y promover la tubulación de membranas de la PC	Maduración de la PC	Ahn et al., 2007
TPLATE	<i>tplate</i>	Eventos de tráfico vesicular requeridos para el anclaje de la PC	Fusión de la PC con la membrana parental	Van Damme et al., 2011
Calosa sintasa: CalS10/GSL8	<i>gsl8/massue</i>	Participan en la deposición de calosa en la PC	Biogénesis de la PC	Thiele et al., 2009
CESA1 KORRIGAN	<i>cesa1^{rsw1-20}</i> <i>kor1-2</i>	Participan en la deposición de celulosa en la PC	Biogénesis y maduración de la PC	Miart et al., 2014 Zuo et al., 2000

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados en este estudio.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
PvKNOLLE-Fw	5'-CCTTCACCAGCTACGTGGATTAAAG-3'
PvKNOLLE-Rv	5'-GAAGAGGCCCATGTTCAGTGTCC-3'
pPvKNOLLE UP	5'-CACCGGTTAAGTCTCAGGCTCTTTTAAACAATG-3'
pPvKNOLLE LW	5'-TTTGGGAACCTTGGATTGATAATGG-3'
PvKNOLLE-ATG	5'- CACCAT GAACGATCTAATGACCAAGTCCTTC-3'
PvKNOLLE stop	5'-TCAAGAACTGCTTAAACTGGTGGC-3'
pPvKNL-FwEcoRI	5'-CACCG AATTC ACCGGTTAAGTCTCAGGCTC-3'
pPvKNL-RvNcoI	5'- CCATGG TTTGGGAACCTTGGATTGATAATG-3'
NLS-Turquoise UP	5'-ATGCCAAAGAAGAAGAGGAAGGTTGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'
Turquoise L	5'CTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC3'
XhoI-NLS-Turquoise Fw	5'-CACCTCGAGATGCCAAAGAAGAAGAGGAAGGTTGTGAGCAAGGGCGAG-3'
mCherry Lw	5'-GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG-3'

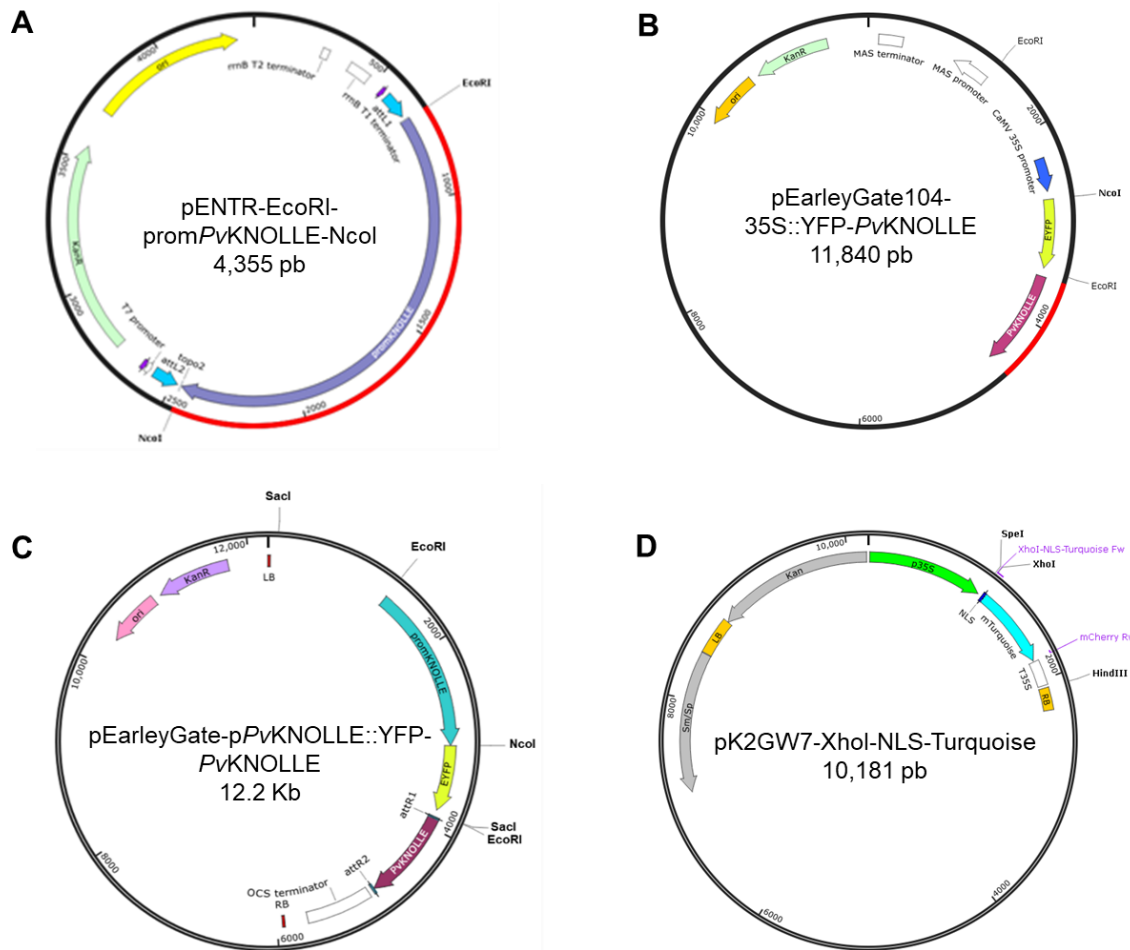


Figura Suplementaria S1. Esquemas *in silico* de los cassetes generados y utilizados en este estudio. Plásmidos **A)** pENTR-EcoRI-promPvKNOLLE-NcoI, **B)** pEarleyGate104-35S::YFP-PvKNOLLE, **C)** pEarleyGate-pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE y **D)** pK2GW7-XhoI-NLS-Turquoise.

13. ANEXO 2



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

Raúl Dávila-Delgado¹ · Luis Alfredo Bañuelos-Vazquez² · Elizabeth Monroy-Morales¹ · Rosana Sánchez-López¹

Received: 19 February 2020 / Accepted: 22 September 2020 / Published online: 29 September 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

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

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

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

Abbreviations

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

Communicated by Dorothea Bartels.

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

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

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

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

Introduction

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

molecular dialogue established when flavonoids secreted by the compatible legume root are specifically detected by the transcriptional activator NodD present in the membrane of the suitable rhizobia. NodD is a positive regulator of the bacterial *nodABC* genes, responsible for the synthesis and secretion of bacterial lipochitoooligosaccharides, known as Nod factors (Rossen et al. 1985; Schlaman et al. 1989). Perception of Nod factors by specific LysM receptor-like kinases induces an apical curvature in growing root hairs, where the bacteria get trapped in an infection chamber (IC) and form a microcolony. Subsequently, the rhizobia enter the root through an invagination induced in the root hair to form a tubular, transcellular structure, named infection thread (IT), which elongates along the root hair guiding the proliferating bacteria towards the cortical zone. Concomitantly, the cortical cells divide to form a nodule primordium. As the young nodule emerges, the bacteria are released from the IT into membrane-bound symbiosomes within host cells located in the central zone of the nodule, where bacteria differentiate into bacteroids capable of fixing nitrogen. A vascular system is distributed within the nodule inner cortex (Oldroyd and Downie 2008). In our model, *P. vulgaris* roots inoculated with *R. etli* or *R. tropici*, a nodule typically reaches its N₂-fixation maturity, with a mean diameter of 1.5–2.5 mm, approximately 18–21 days after inoculation (dpi) (Sánchez-López et al. 2011).

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

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

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

Materials and methods

Plant materials, inoculation and growth conditions

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv “Negro Jamapa”) seeds were obtained from local farmers, Morelos, Mexico. Seeds were germinated and seedlings planted in pots with autoclaved vermiculite, grown in a chamber at 27 ± 1 °C under 16 h of photoperiod and watered with Fähræus solution (Fähræus 1957) twice a week, as described (Estrada-Navarrete et al. 2007). *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3-pMP604, as well as, their fluorescent version, were grown in PY medium supplemented with 7 mM CaCl₂, 20 µg ml⁻¹ nalidixic acid, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 5 µg ml⁻¹ tetracycline, the latter only in the case of *R. etli* CE3 pMP604. Growth curves were established in 96-well plates containing 180 µl of PY medium inoculated with either *R. etli* CE3 strain at an initial optical density of 0.025 at 600 nm and incubated at 30 °C with shaking in a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek, Winooski, VT, USA). When indicated, seedlings were inoculated with *R. etli* CE3, *R. etli* CE3 pMP604 or their fluorescent version grown at log phase, washed with 10 mM MgSO₄ and diluted to give 0.05 optical density at 600 nm.

Analysis of infection threads, nodule number and nodule diameter

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

Acetylene reduction

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

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

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

Microscopy analysis

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

Statistical analysis

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

Results and discussion

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

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

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

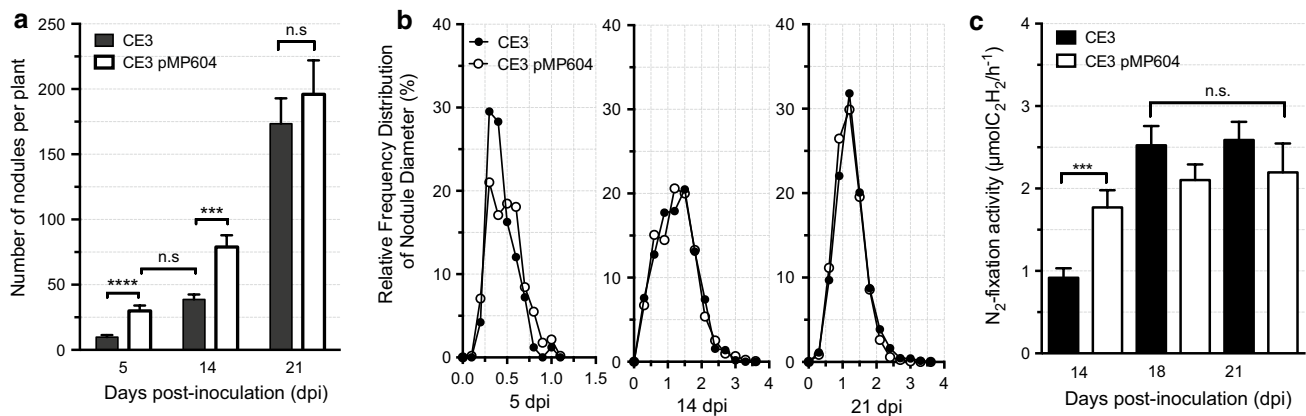


Fig. 1 Nodulation properties of *R. etli* CE3 and *R. etli* CE3 pMP604. **a** Determination of the number of nodules per plant. Nodulated roots were harvested at the indicated time points, then stained with methylene blue, cleared in sodium hypochlorite and digitized. Number of nodules per plant were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

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

Infection events

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

Live-imaging of infection threads

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

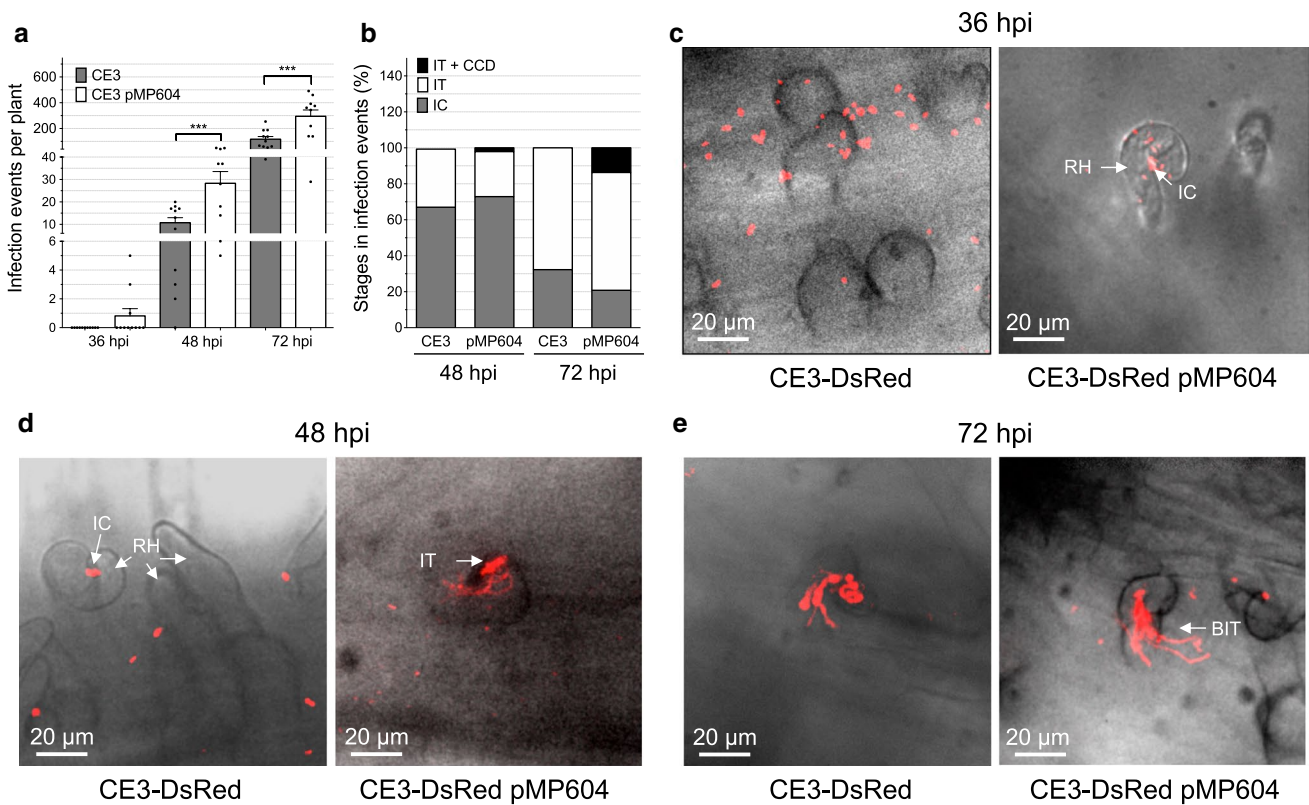


Fig. 2 Infection events in roots inoculated with *R. etli* CE3 or *R. etli* CE3 pMP604. **a** Mean of the number of infection events per plant determined in three independent experiments ($n=10$) performed at 36, 48 and 72 hpi. Error bars represent \pm SE. Statistical significance between values of *R.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

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

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

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

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

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

Compliance with ethical standards

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

References

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

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

- the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* 29(3):453–464. <https://doi.org/10.1007/bf00020977>
- Cárdenas L, Vidali L, Domínguez J, Pérez H, Sánchez F, Hepler PK, Quinto C (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol* 116(3):871–877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>
- Carrasco-Castilla J, Ortega-Ortega Y, Jauregui-Zuniga D, Juarez-Verdases MA, Arthikala MK, Monroy-Morales E, Nava N, Santana O, Sánchez-López R, Quinto C (2018) Down-regulation of a *Phaseolus vulgaris* annexin impairs rhizobial infection and nodulation. *Environ Exp Bot* 153:108–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.016>
- Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1(4):584–588. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(78\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0147-619x(78)90016-1)
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillen G, Diaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* 2(7):1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Fähraeus G (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16(2):374–381. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-2-374>
- Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ* 42(1):41–51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Formey D, Martín-Rodríguez JA, Leija A, Santana O, Quinto C, Cárdenas L, Hernandez G (2016) Regulation of small RNAs and corresponding targets in nod factor-induced *Phaseolus vulgaris* root hair cells. *Int J Mol Sci* 17(6):887–902. <https://doi.org/10.3390/ijms17060887>
- Hardy RW, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43:1185–1207. <https://doi.org/10.1104/pp.43.8.1185>
- Lambertsen L, Sternberg C, Molin S (2004) Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* 6(7):726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00605.x>
- Montiel J, Nava N, Cárdenas L, Sánchez-López R, Arthikala MK, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2012) A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by rhizobia. *Plant Cell Physiol* 53(10):1751–1767. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs120>
- Oldroyd GE, Downie JA (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59(1):519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Rossen L, Johnston AWB, Downie JA (1985) DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes nodAB and C required for root hair curling. *Nucleic Acids Res* 12(24):9497–9508. <https://doi.org/10.1093/nar/12.24.9497>
- Sánchez-López R, Jáuregui D, Nava N, Alvarado-Affantranger X, Montiel J, Santana O, Sánchez F, Quinto C (2011) Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ* 34(12):2109–2121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02408.x>
- Schlaman HRM, Spaink HP, Okker RJH, Lugtenberg BJJ (1989) Subcellular localization of the nodD gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 171(9):4686–4693. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4686-4693.1989>
- Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Tak T, GoosendeRoo L, Pees E, van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ (1989) Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-independent hybrid nodD product. *J Bacteriol* 171(7):4045–4053. <https://doi.org/10.1128/jb.171.7.4045-4053.1989>
- Sprent JI, James EK (2007) Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol* 144(2):575–581. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096156>
- Torres-Tejerizo G, Bañuelos LA, Cervantes L, Gaytán P, Pistorio M, Romero D (2015) Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia. *J Microbiol Methods* 117:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.005>
- Zepeda I, Sánchez-López R, Kunkel J, Bañuelos LA, Hernandez-Barbera A, Sanchez F, Quinto C, Cárdenas L (2014) Visualization of highly dynamic F-actin plus ends in growing *Phaseolus vulgaris* root hair cells and their responses to *Rhizobium etli* Nod factors. *Plant Cell Physiol* 55(3):580–592. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct202>

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

MAQUINARIA DE CITOCINESIS EN PLANTAS: ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS*

Elizabeth Monroy-Morales, Raúl Dávila-Delgado y Rosana Sánchez-López**

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México. **Autor de correspondencia, correo E: rosana.sanchez@mail.ibt.unam.mx

RESUMEN

La citocinesis es el proceso que concluye la división celular, y consiste en la distribución del citoplasma y organelos de la célula madre en las dos células hijas. En plantas, la citocinesis ocurre por la formación de una placa celular en el centro del fragmoplasto; este último es una estructura formada por microtúbulos y microfilamentos de actina que se alinea perpendicularmente al plano de la división y sirve como un andamio para el ensamblaje de la placa celular. Vesículas citocinéticas derivadas del aparato de Golgi migran al centro del plano de la división a través del fragmoplasto, donde se fusionan para dar origen a la placa celular, la cual crece hacia la periferia de la célula en división y, eventualmente, se fusiona con la membrana plasmática lateral de la célula parental, completando así la división celular. La citocinesis mediada por el fragmoplasto es un mecanismo específico de las células vegetales, aunque también ha sido reportado en algas carofitas (Charales, Coleochaetales y Zygnematales), uno de los grupos de parientes más cercanos a las actuales plantas terrestres. Sabemos que algunas características celulares y moleculares de la maquinaria citocinética en plantas terrestres tienen su origen en algas carofitas. En esta revisión discutimos: 1) características de la citocinesis somática en plantas, 2) componentes de la maquinaria molecular involucrada en la formación de la placa celular, y 3) evidencia de la citocinesis mediada por fragmoplasto en algas carofitas.

ABSTRACT

Cytokinesis is the process that completes cell division and comprises the distribution of the cytoplasm and organelles from the parental cell into two daughter cells. In plants, cytokinesis occurs by the formation of a cell plate in the center of the phragmoplast; the latter is a structure composed of microtubules and actin microfilaments which are perpendicularly aligned to the division plane and serves as a scaffold for cell plate assembly. Golgi apparatus-derived cytokinetic vesicles migrate through the phragmoplast to the middle of the division plane, where they fuse giving rise to the cell plate, which grows toward the periphery of the dividing cell and eventually fuses with the lateral plasma membrane of the parental cell, thus completing cell division. Phragmoplast-mediated cytokinesis is a mechanism specific of plant cells, although it has also been observed in charophyte algae (Charales, Coleochaetales and Zygnematales), a group related to modern land plants. It is known that some cellular and molecular characteristics of the cytokinetic machinery in land plants have their origin in charophyte algae. In this review, we discussed: 1) characteristics of somatic cytokinesis in plants, 2) components of the molecular machinery involved in cell plate formation and 3) evidence of phragmoplast-mediated cytokinesis in charophyte algae.

PALABRAS

CLAVE:

Citocinesis, división celular, fragmoplasto, placa celular, plantas terrestres, algas carofitas.

KEY WORDS:

Cytokinesis, cell division, phragmoplast, cell plate, land plants, charophyte algae.

INTRODUCCIÓN

Los organismos crecen gracias a que las células se dividen para generar más células. La célula que se divide se llama célula parental o célula madre y las nuevas células se conocen como células hijas. Para dividirse, una célula madre debe crecer, copiar su material genético (DNA) y dividirse físicamente en dos células hijas. Durante la división de células eucariotas, cada célula pasa por una serie de etapas definidas que constituyen el ciclo celular, el cual en células somáticas se divide en dos etapas: interfase y mitosis (Fig. 1A). Durante la interfase

(etapa de no división) la célula crece, duplica sus cromosomas y se prepara para la división celular. La interfase es la etapa más larga del ciclo celular y se divide en tres fases: fase G1 (crecimiento celular y duplicación de organelos), fase S (síntesis de DNA, para duplicar su material genético) y fase G2 (preparación para la división). Una vez que concluye la interfase, la célula entra en la etapa de mitosis (M) o de división celular, en la que se distinguen dos procesos: la división nuclear, que implica la separación del material genético y generación de dos núcleos idénticos (cariocinesis), y la citocinesis o repartición física del citoplasma y

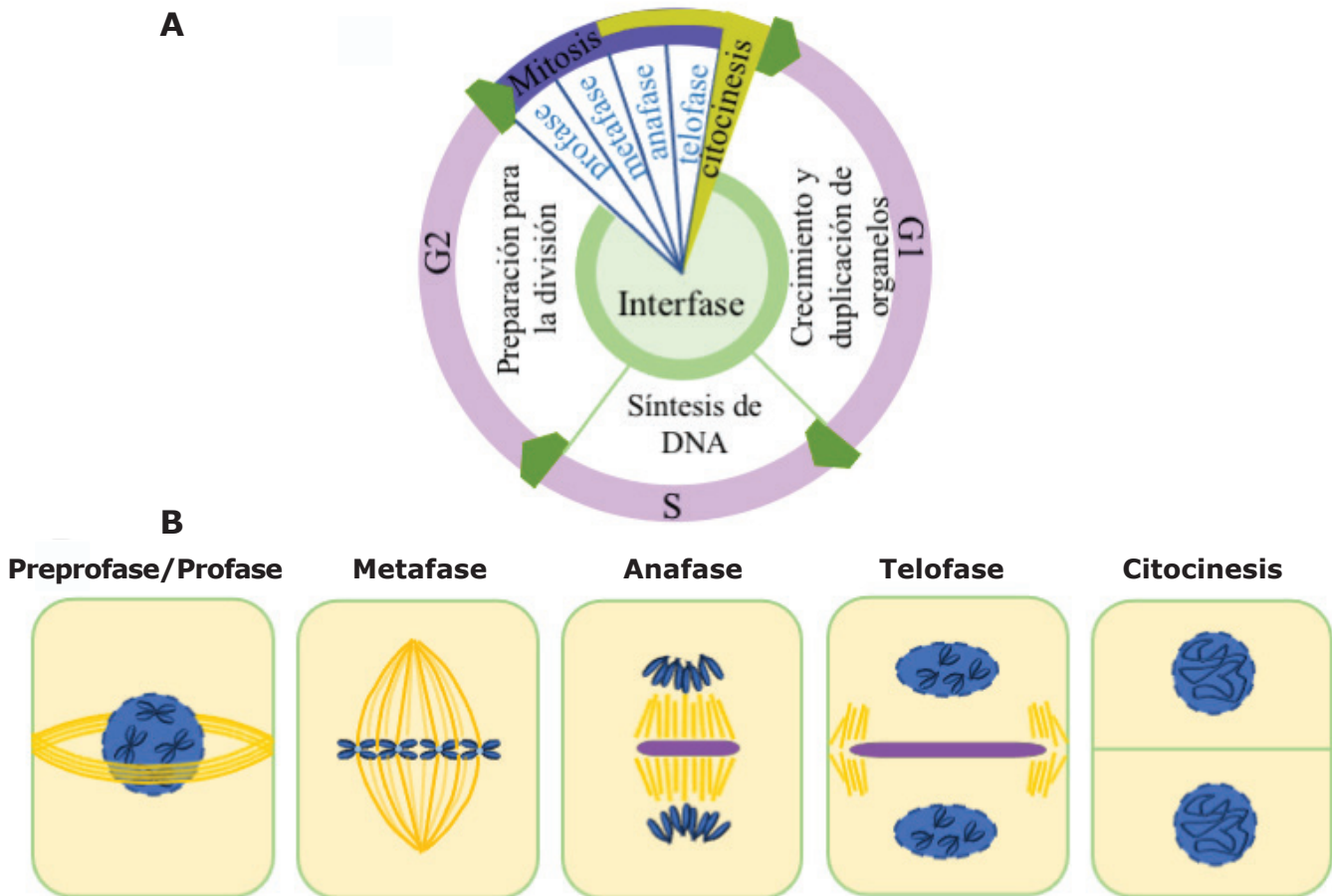


Figura 1. Ciclo celular y sus fases. A) El ciclo celular se divide en interfase y mitosis. Durante la interfase, la célula crece y replica sus cromosomas, esta etapa se divide en tres fases: G1, S y G2. La fase G1 comienza cuando se completa la mitosis y la citocinesis, es la fase en la que la célula crece. La fase S (síntesis de DNA) implica la replicación de los cromosomas, y es seguida por la fase G2, en la que la célula se prepara para dividirse. Una vez terminada la etapa de interfase, la célula entra en la etapa M (mitosis y citocinesis). La mitosis es el mecanismo por el cual se reparten los cromosomas para formar los dos núcleos de las células hijas y comprende cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. **B)** Esquema de la mitosis en una célula vegetal. En plantas, en la transición G2/M se forma la banda de preprofase antes de que las células concluyan la fase G2 y desaparece tan pronto como la envoltura nuclear se rompe y se forma el huso mitótico. En la profase, los cromosomas son claramente visibles y la membrana nuclear se desaparece, seguida de la metafase donde los cromosomas se mueven hacia el plano ecuatorial, se forma el huso mitótico y se reparten los componentes celulares. Durante la anafase, los cromosomas se mueven a los polos opuestos de la célula y en la telofase la envoltura nuclear se reorganiza alrededor de cada conjunto de cromosomas y se completa la mitosis. En las últimas fases (anafase/telofase) de la mitosis comienza la citocinesis. En células vegetales forma una nueva estructura membranosa conocida como placa celular (en morado), que dará lugar a la membrana plasmática y pared celular que divide el citoplasma en dos generando dos células hijas.

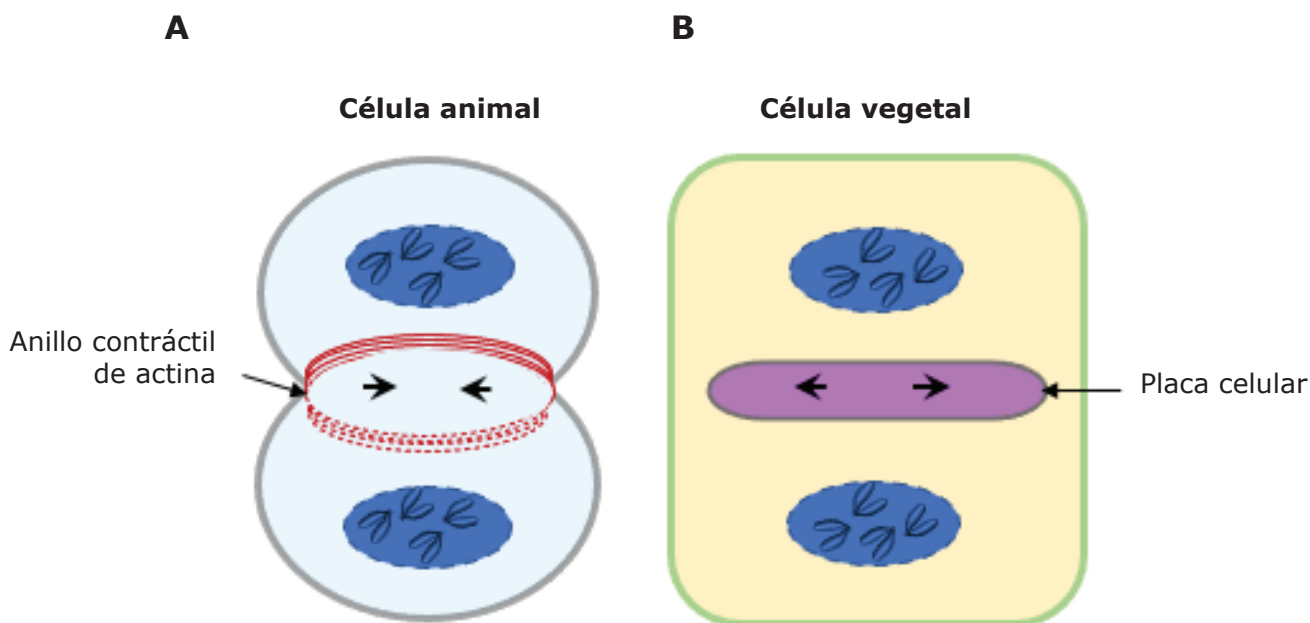


Figura 2. Citocinesis somática en células animales y vegetales. A) Una característica distintiva de la citocinesis en la célula animal es la formación de un surco de escisión o anillo contráctil de actina, cuyo diámetro se reduce conforme avanza la citocinesis, es decir, hay una contracción progresiva que se genera desde la periferia hacia el centro de la célula hasta producir la separación de las células hijas. Este mecanismo es conocido como citocinesis centrípeta. **B)** En células vegetales, la citocinesis implica la formación de un compartimento membranoso transitorio conocido como placa celular (PC), que se genera en el centro de la célula citocinética y se expande de forma radial hacia la periferia de la célula. Por lo que se dice que en células vegetales la citocinesis es centrífuga. Las cabezas flecha indican la dirección en la que progresa la citocinesis.

demás organelos de la célula madre para formar dos células hijas genéticamente idénticas. Si bien la mitosis es un proceso continuo, durante la división nuclear se distinguen cuatro fases sucesivas: profase, metafase, anafase y telofase (Fig. 1B). Es de mencionar que la anafase y telofase coinciden con el inicio o transición hacia la citocinesis (1).

La peculiaridad de la división de células somáticas vegetales es el ensamblaje *de novo* de tres estructuras transitorias únicas: la banda de preprofase o PPB (preprophase band, en inglés), el fragmoplasto (2,3) y la placa celular (PC).

1) Características de la citocinesis somática en plantas

Las células vegetales, tienen una pared celular rígida (compuesta por celulosa, hemicelulosa y pectina, iones y proteínas con diversas funciones) que rodea a la membrana plasmática. Esta estructura impide que la citocinesis ocurra como en células animales (Fig. 2A), en las que se forma un surco de escisión, llamado anillo contráctil de actina, que se contrae hacia adentro (citocinesis centrípeta) y separa la célula en dos (4). En las células vegetales, la citocinesis es centrífuga, es decir, inicia en

el punto central del plano de la división y progresa de forma radial hacia la membrana plasmática de la célula madre para dar lugar a dos células hijas (Fig. 2B). En la etapa previa a la división celular, durante la interfase, los MTs en la célula vegetal se caracterizan por presentar una distribución cortical, es decir, se localizan hacia la periferia de la célula (Fig. 3A). La etapa crucial que define el futuro plano de la división en células vegetales es el ensamblaje de la PPB en la zona de división cortical o CDZ (cortical division zone, en inglés) de la célula en preparación para la mitosis (pre-profase) (4, 5). La PPB es un anillo cortical, transitorio, que se forma en la etapa tardía de la fase G2 y desaparece al inicio de la mitosis (profase). Este anillo está constituido por microtúbulos (MTs) y filamentos de actina (microfilamentos o MFs) que se organizan en la zona contigua a la membrana plasmática en el plano ecuatorial, rodeando al núcleo (Fig. 3B).

En las etapas avanzadas de la mitosis tiene lugar la formación del fragmoplasto, una estructura subcelular dinámica temporal, tipo barril o cilindro sólido, que se forma en el centro de la célula en división, entre los dos núcleos hijos (6). El fragmoplasto consiste de dos conjuntos de MTs y MFs, ambos organizados de forma antiparalela;

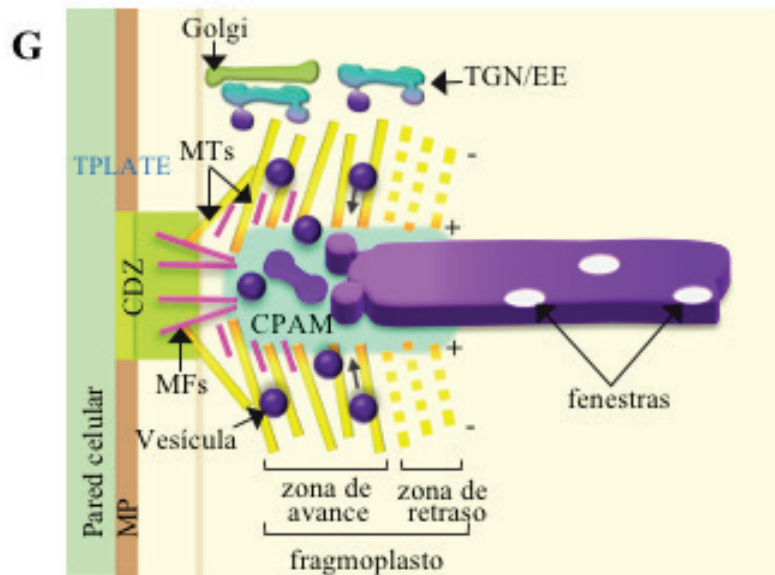
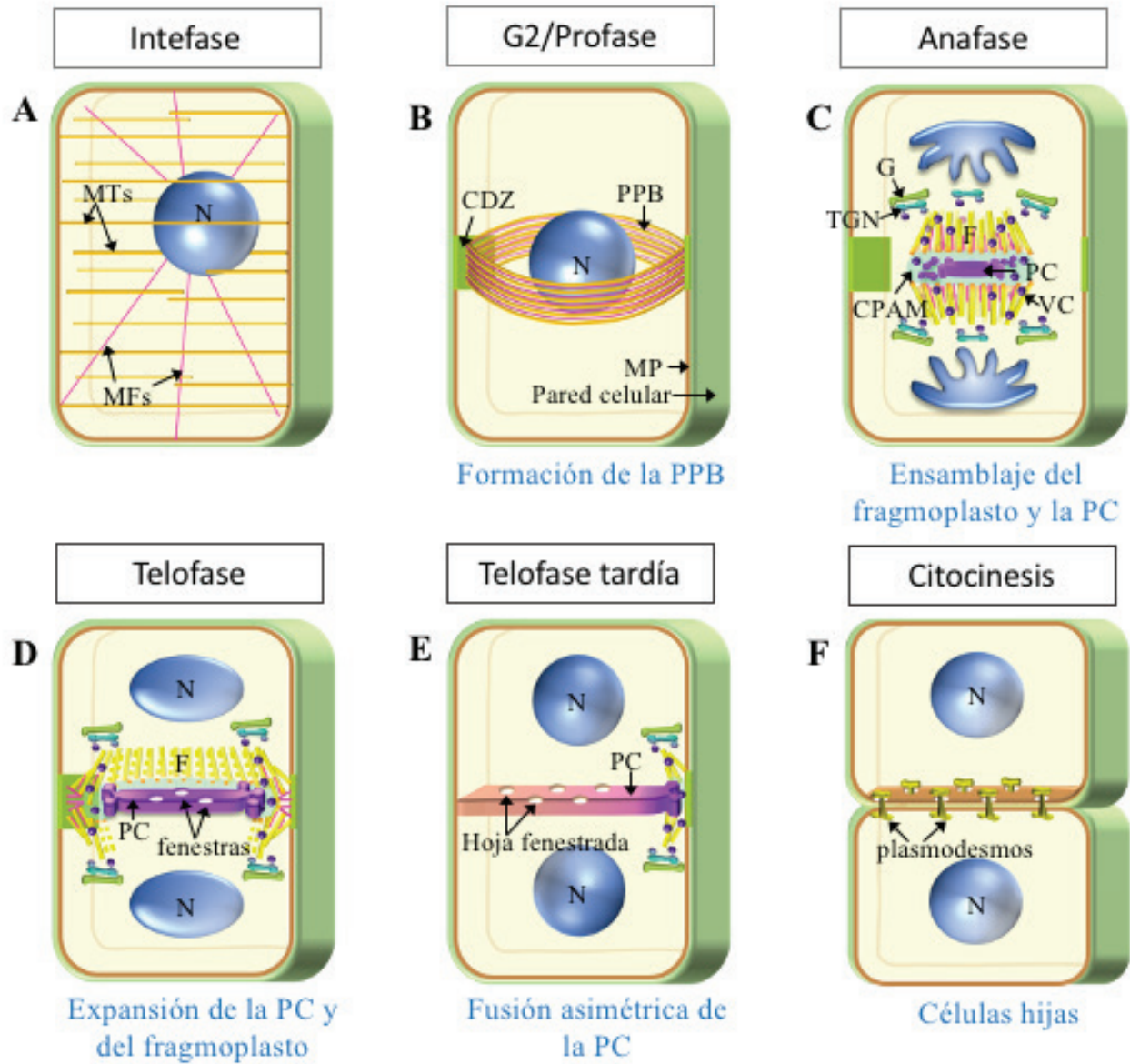


Figura 3. Citocinesis somática en plantas. A) Célula en interfase y su distribución de MTs y MFs. **B)** Formación de la PPB durante la fase G2, define la zona de división cortical (CDZ). La CDZ, área de la membrana plasmática, marca el sitio futuro de fusión de la PC. La PPB está constituida por MTs y MFs. **C-F)** Citocinesis; **C)** ensamblaje del fragmoplasto (F) y de la PC. La citocinesis somática comienza durante la anafase-telofase con la acumulación y fusión de vesículas en el centro (cpam) del plano de la división hasta generar una red túbulo-vesicular, la PC naciente. El fragmoplasto (tipo barril) es caracterizado por una distribución uniforme de los MTs en toda el área de la PC en formación. **D)** Expansión y maduración de la PC. La expansión centrífuga de la PC está coordinada con la despolimerización de MTs en la región central del fragmoplasto, generando un fragmoplasto en forma de anillo. **E)** La expansión de fragmoplasto es generalmente asimétrica y la PC se fusiona primero con un lado de la CDZ. La PC madura y se consolida en una hoja fenestrada, que eventualmente será una pared celular. **F)** Formación de dos células hijas. La PC se fusiona con la membrana plasmática parental y se transforma en la nueva pared celular vegetal, separando así las dos células hijas. Hebras de RE atraviesan la PC fenestrada dando origen a los plasmodesmos. **G)** Dinámica de los MTs durante la expansión de la PC. El fragmoplasto se expande centrífugamente por una continua polimerización y despolimerización de los MTs en las zonas de avance y de retraso, respectivamente. La región central de la PC entra en una etapa de maduración (con fenestras) que se evidencia por una disminución de vesículas asociadas a la PC. La PC se expande centrífugamente mediante la fusión de vesículas, derivadas de TGN, que llegan al borde de crecimiento de la PC hasta fusionarse con la MP. PPB, del inglés preprophase band; PC, placa celular; F, fragmoplasto; MTs, microtúbulos; MFs, microfilamentos de actina; cpam, del inglés "cell plate assembly matrix"; TGN/EE, del inglés "trans-Golgi network/early endosome"; MP, membrana plasmática.

durante la transición de anafase a telofase, los MTs y MFs, se ordenan perpendicularmente al plano de división (Fig. 3C), con sus extremos positivos en la zona central o media de esta estructura, sitio de ensamblaje y maduración de la PC. El arreglo de MTs sirve de guía para que las vesículas citocinéticas se dirijan a la zona media del fragmoplasto, donde sucesivamente se fusionan para formar la PC (Fig. 3D). La formación de esta red activa la despolimerización de los MTs y favorece que el fragmoplasto forme un anillo (7). La despolimerización y polimerización de los MTs en las zonas de retraso o proximal (lagging zone, en inglés) y de avance lateral o distal (leading zone, en inglés) respecto a la PC en crecimiento (Fig. 3G), y la constante fusión de vesículas citocinéticas con la membrana de la PC en crecimiento marcan la expansión centrífuga del anillo de fragmoplasto y la PC hacia la CDZ (Fig. 3D). Generalmente, la expansión del fragmoplasto es asimétrica y la PC se fusiona primero con un lado de la CDZ (Fig. 3E). El fragmoplasto se desensambla una vez que ambos lados de la PC se han fusionado con la membrana plasmática de la célula parental (Fig. 3F) (6).

Antes de describir las características de la PC, es de mencionar que en células vegetales, el aparato de Golgi es móvil y disperso y está conformado por grupos individuales de pequeñas pilas de cisternas que están disociadas del compartimento bifuncional TGN/EE (siglas en inglés de trans-Golgi network y early endosome) (8), en el cual convergen las vesículas de la ruta sintética o secretoria, provenientes de las cisternas de Golgi, y las vesículas de origen endocítico. Durante la mitosis y la citocinesis hay una redistribución de cisternas Golgi y TGN/EE en zonas específicas (Fig. 3C, D y G). En metafase, se acumulan en la zona ecuatorial

(futuro sitio de división) en forma de banda, definida como "cinturón de Golgi", mientras que, al inicio de la citocinesis, las cisternas Golgi y TGN/EE se distribuyen alrededor del fragmoplasto, y en la citocinesis tardía, cuando el fragmoplasto tiene forma de anillo, se acumulan cerca del borde de crecimiento de la PC, para el suministro continuo de vesículas citocinéticas (9).

La PC es una extensa estructura endomembranosa planar, transitoria, que se expande radialmente desde el centro de la zona de división hacia la periferia de la célula parental, de donde la membrana y el lumen de la PC derivarán en dos membranas plasmáticas paralelas, separadas por una pared celular planar que escinde a las células hijas. El sitio de ensamblaje de la PC, localizado en la zona media del fragmoplasto, es una región citoplasmática de aproximadamente 150 nm de grosor, denominada matriz de ensamblaje de la placa celular o CPAM (siglas en inglés de cell plate assembly matrix; ver Fig. 3C y G). CPAM es un andamiaje amorfo conformado por proteínas y vesículas, que provee el entorno en el que se generará y se expandirá la PC (6, 10). La biogénesis de este nuevo compartimento membranoso es un proceso dinámico que demanda una gran cantidad de material (proteínas y lípidos, principalmente) que es transportado por vesículas citocinéticas derivadas del TGN/EE (11), las cuales al fusionarse dan origen a una estructura túbulo-vesicular en forma de mancuerna, la PC naciente (Fig. 3C y G). Conforme se expande, la estructura túbulo-vesicular de la PC naciente deriva en una red tubular y, eventualmente, en una hoja fenestrada (Fig. 3D, E y G). La última etapa es la fusión de la PC con la membrana plasmática y pared celular en el sitio de la CDZ (Fig. 3E y G).

Se ha postulado que las fenestras (orificios u horadaciones; ver Figura 3D, E y G) de la PC se originan cuando algunos de los eventos de fusión de vesículas citocinéticas tienen lugar alrededor de las extensiones del retículo endoplásmico que atraviesan la zona CPAM durante la biogénesis de la PC y, probablemente, sean los precursores de los plasmodesmos (Fig. 3E y F) (12).

En el lumen de la PC en formación se depositan calosa, pectina, hemicelulosa y celulosa. La calosa es el polisacárido más abundante en la PC, pero su acumulación es transitoria y será reemplazada por celulosa cuando la PC madure. La pectina y hemicelulosa son sintetizadas en las cisternas del Golgi y transportadas en las vesículas citocinéticas (Fig. 4), mientras que la celulosa y calosa son sintetizadas en la cara luminal de la PC por acción de los complejos enzimáticos transmembranales celulosa sintasa y calosa sintasa, respectivamente (Fig. 5A), (10, 13). Progresivamente, estos polisacáridos van formando una densa capa fibrosa y planar que al concluir la citocinesis se modifica y constituye la pared celular que separa a las células hijas.

2) Componentes de la maquinaria molecular involucrada en la formación de la placa celular

La biogénesis y expansión de la PC es un proceso molecular complejo, cuyos participantes no han sido identificados en su totalidad. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre los mecanismos generales del tráfico vesicular y de fusión de membranas ha sido de gran utilidad para entender la función de algunas proteínas identificadas al caracterizar mutantes afectadas en alguna etapa de la formación de la PC. Estas mutantes suelen presentar un fenotipo distintivo de célula binucleada y una citocinesis mal orientada o aberrante, lo que indica que no se concretó la separación física de las dos células hijas. La caracterización de estas mutantes, complementada con estudios de bioquímica y genética reversa, han permitido la identificación de una batería de proteínas de tráfico vesicular y fusión de membranas lo cual no es de sorprender, ya que la biogénesis de la PC depende de estas funciones celulares. En la Tabla 1 se ilustra la gama de proteínas asociadas a la biogénesis y expansión de la PC.

Hay eventos de tráfico vesicular post-Golgi que son requeridos para la formación de la PC y que proporcionan las vesículas citocinéticas que se generan en el TGN/EE y se desplazan hacia el sitio de formación de la PC. Las vesículas citocinéticas son de tipo vesículas recubiertas de clatrina o CCV (siglas en inglés de clathrin-coated vesicle), ver

figura 4. Esto ha sido evidenciado por estudios de microscopía electrónica, inmunolocalización y microscopía *in vivo* en los que se analizó la distribución subcelular de vesículas que incorporan subunidades de cadena ligera y pesada de clatrina (10, 14) y de la subunidad μ (μ) del complejo AP1 (AP1 μ), entre otras de las proteínas accesorias en la formación de CCV (Fig. 4). La inhibición de AP1 μ 2 provoca defectos en la citocinesis y genera células binucleadas (15). Entre las proteínas accesorias tipo Epsin que participan en la biogénesis de la PC se encuentra ECA1 (siglas en inglés de epsin-like clathrin adaptor1; ver Fig. 4) (16).

Unas de las primeras mutantes citocinéticas con defectos en la formación de la PC en ser caracterizadas fueron KNOLLE y KEULE (17, 18). KNOLLE/SYP111 codifica para una sintaxina (Qa-SNARE), específica de la citocinesis somática en plantas y esencial para la fusión de membranas durante la formación de la PC (Fig. 4). En la mecánica de fusión de vesículas mediada por SNAREs, se requiere la interacción entre 3 o 4 proteínas SNAREs, KNOLLE está presente en la membrana de la vesícula citocinética (membrana donadora) y las otras proteínas SNARE se encuentran en la membrana de la PC o membrana aceptora (Fig. 4). La evidencia experimental indica que KNOLLE puede formar dos complejos fusogénicos (complejos SNARE) diferentes, uno con Qbc SNARE SNAP33 y R-SNARE VAMP721/722 (siglas en inglés de vesicle associated membrane protein) (Fig. 4), y el otro con Qb-SNARE NPSN11, Qc-SNARE SYP71 y VAMP721/722, en ambos complejos KNOLLE contribuye a la fusión de membranas en la citocinesis (19). Por otro lado, uno de los mecanismos de regulación de la actividad de KNOLLE está mediado por su interacción con KEULE, una proteína de la familia SM (Sec1p/Munc18), cuya función es inhibir la asociación de KNOLLE con otras proteínas. La formación del complejo SNARE se favorece por el acercamiento de las membranas por fusionarse gracias a la acción de proteínas o complejos con una función tipo enlazante (tether, en inglés). En la formación de la PC participan dos complejos: TRAPP II (siglas en inglés de Transport Protein Particle II), constituido por las subunidades de TRAPI (Bet3, Bet5, Trs20, Trs23, Trs31, Trs33, and Gsg1/Trs85), Trs120 y Trs130 (20). Se ha encontrado que hay mutaciones en Trs120 y Trs130 que causan defectos en la citocinesis (20-22).

El segundo complejo con esta función es el exocisto (23) que se compone de las subunidades SEC3, SEC5, SEC6, SEC8, SEC10, SEC15, EXO70 y EXO84. Es de resaltar que en plantas hay 23 copias de genes EXO70, siendo EXO70A1 la que se localiza en la PC, al igual que SEC6. Por otro lado,

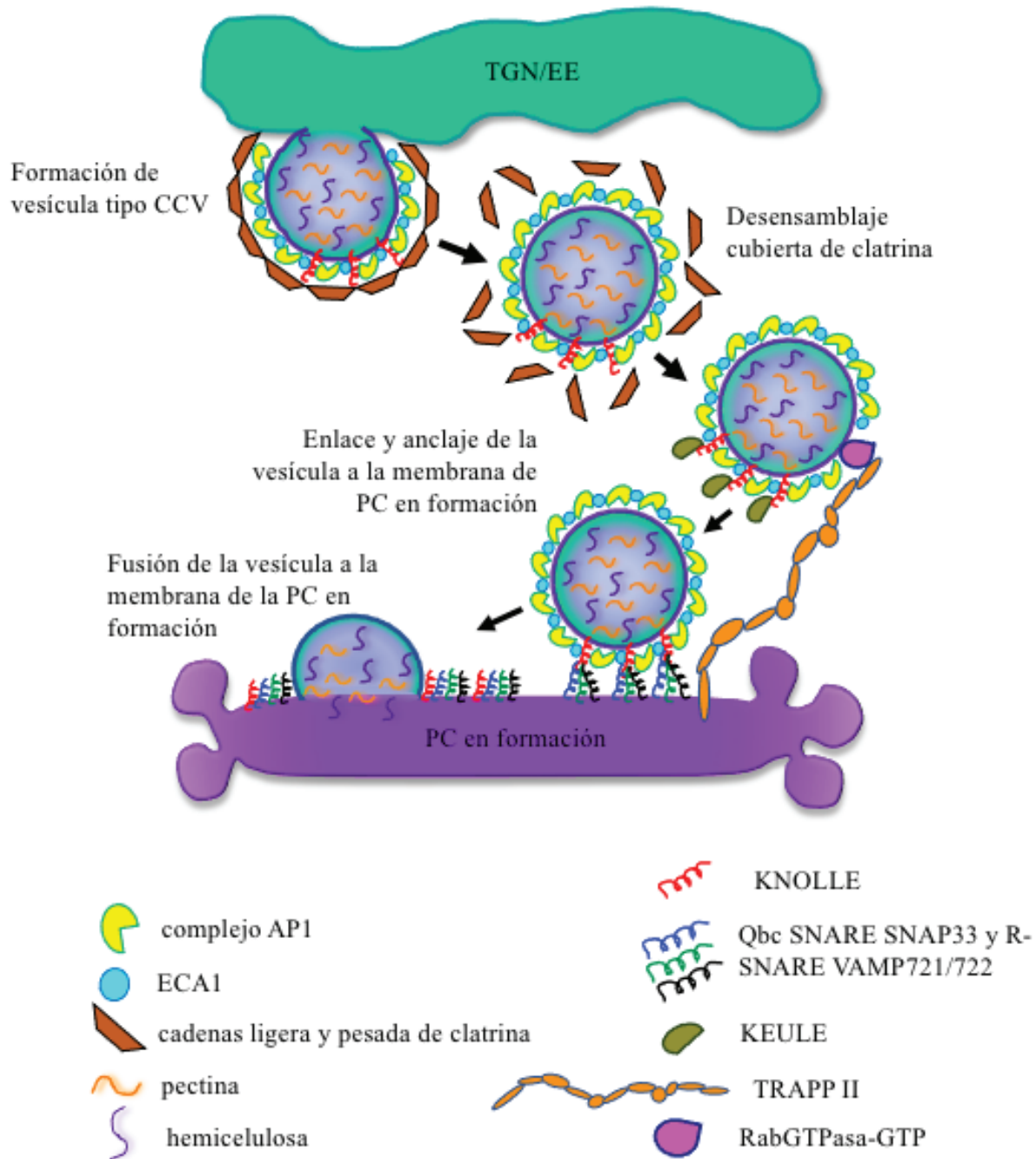


Figura 4. Esquema del tráfico vesicular desde el TGN hacia la placa celular (PC). La formación y expansión de la PC está mediada por vesículas de tipo vesículas recubiertas de clatrina o CCV (siglas en inglés de clathrin-coated vesicle) que se originan en TGN/EE y se desplazan hacia el sitio de ensamblaje de la PC. La fusión de estas vesículas citocinéticas aporta los componentes de la membrana de la PC y de la pared celular (polisacáridos pectina y hemicelulosa que se sintetizan en el aparato de Golgi). Las vesículas tipo CCV se componen de cadenas ligeras y pesadas de clatrina, proteínas adaptadoras (complejo AP1) y proteínas accesorias tipo Epsin, como ECA1. A la vesícula citocinética se incorpora KNOLLE, una proteína SNARE específica de la citocinesis vegetal y parte de la maquinaria de fusión de las membranas vesicular y PC. La fusión está mediada por el complejo SNARE conformado por KNOLLE y el trímero Qbc SNARE SNAP33 y R-SNARE VAMP721/722 presente en la membrana blanco o diana, en este caso de la PC. KEULE es una proteína citosólica que interactúa con KNOLLE para inhibir su interacción con otras proteínas SNARE, mientras que la interacción entre una RabGTPasa, asociada a la vesícula, y complejo enlazante TRAPP II, presente en la membrana de la PC, favorece el acercamiento de las membranas a fusionarse y la formación del complejo SNARE. El evento de fusión implica que la membrana vesicular pase a formar parte de la membrana de la PC y que las moléculas transportadas en la vesícula (p.e. hemicelulosa y pectina) sean depositadas en el lumen de la PC.

la ausencia de EXO70A1 o EXO84b causa defectos en el ensamblaje de la PC (20, 23). Ahora bien, la acción de los complejos TRAPPII y exocisto es secuencial, TRAPPII participa en la biogénesis de la PC (Fig. 4), mientras que el complejo exocisto está involucrado en la maduración de la PC (20).

Otros de los participantes esenciales para la formación y la fusión de vesículas son las GTPasas pequeñas, y los respectivos efectores, como las proteínas de activación llamadas GAP (siglas en inglés de GTPase-activating protein) y los factores de intercambio de GDP por GTP (GEF, por siglas en inglés de guanine nucleotide exchange factor), ver figura 5B (24). A la fecha, de las 57 RAB GTPasas expresadas en *Arabidopsis thaliana*, sólo RabA1,

A2 y A3 han sido reportadas con una función en el anclaje de vesículas a la membrana de la PC en formación (Fig. 4). Este anclaje es mediado por la interacción entre la Rab GTPasa, asociada a la membrana de la vesícula, y el complejo TRAPPII presente en la membrana aceptora (25, 26). Otra GTPasa asociada a la formación de la PC es ROP4 (27), perteneciente al grupo de GTPasas ROP (siglas en inglés de Rho of plants), específico de plantas. Respecto a las proteínas con actividad GEF, resalta el complejo TRAPII que, además de la función de enlazante de vesículas, contiene actividad de Rab GEF (28). En la Tabla 1 se citan algunas de las proteínas ARF-GEFs cuya función ha sido relacionada con la citocinesis en plantas se

TABLA 1
Maquinaria molecular involucrada en la formación de la PC en plantas

Proteínas	Mutantes	Función	Etapas en la que participan	Referencias
CLC2 AP1μ2 ECA1	<i>ap1m2-1</i>	Regular la formación de vesículas cubiertas por clatrina (CCV)	Biogénesis y maduración de la PC	36,15,16
KNOLLE VAMP721/722 SYP71	<i>knolle vamp721/vamp722 syp71</i>	Promover la fusión de vesículas en la PC	Biogénesis de la PC	18,19
KEULE	<i>keule</i>			17
TRAPPII (Trs120, Trs130)	<i>trs120-4 Trs130/club</i>	Regular el tráfico de salida del TGN	Biogénesis de la PC	20,21,23
EXO70A1, EXO84b	<i>exo70A1, exo84b</i>		Maduración de la PC	
RABA2/3, RABA1c, RABA1d, RABA1e ROP4	<i>Rab-A2a</i>	Regular la formación de vesículas	Biogénesis de la PC	25,26,27
GNOM	<i>emb30/gnom</i>	Promover la formación de vesículas	Posición de la PC	25,30,29
BIG1-4	<i>big1-4</i>	Reguladores del tráfico post-Golgi	Biogénesis de la PC	
Fragmoplastinas: DRP1A, DRP1E DRP2A, DRP2B	<i>drp1a, drp1e drp2a, drp2b</i>	Mediar la formación de CCV y remodelamiento de vesículas de la PC	Maduración de la PC	33,34
SH3P2	<i>sh3p2</i>	Reclutar a DRP1A a la PC y promover la tubulación de membranas de la PC	Maduración de la PC	35
TPLATE	<i>tplate</i>	Eventos de tráfico vesicular requeridos para el anclaje de la PC	Fusión de la PC con la membrana parental	36
Calosa sintasa: CaIS10/GSL8	<i>gsl8/massue/chor</i>	Participan en la deposición de calosa en la PC	Biogénesis de la PC	38
CESA1 KORRIGAN	<i>cesa1^{rsw1-20} kor1-2</i>	Participan en la deposición de celulosa en la PC	Biogénesis y maduración de la PC	39,40

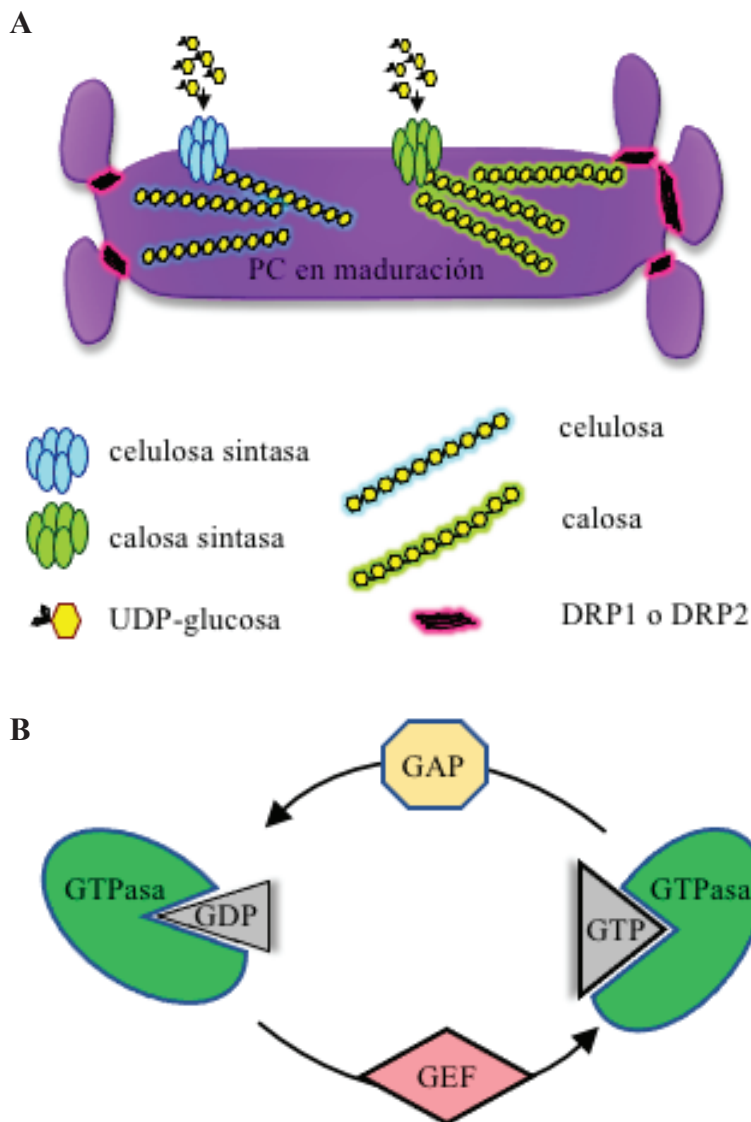


Figura 5. Maduración de la PC (A) y ciclo de activación/inactivación de las GTPasas (B). Un indicativo estructural de la maduración de la PC es la transición de una morfología de red tubular a una estructura planar. Esta remodelación morfológica involucra la escisión de fragmentos de membrana, y está mediada por la actividad constrictora de las proteínas DRP1 y DRP2, entre otras. Otra característica es la acumulación de los polisacáridos celulosa y calosa en el lumen de la PC. Durante la citocinesis, estos polisacáridos típicos de pared celular vegetal son sintetizados en la cara luminal de la PC por acción de los complejos enzimáticos transmembranales celulosa sintasa y calosa sintasa, respectivamente. Ambos complejos enzimáticos utilizan UDP-glucosa como sustrato, para sintetizar polímeros de glucosa unidos por enlaces β -1,3 (celulosa) o β -1,4 (calosa). **B** La participación de GTPasas pequeñas (Rab, Rho, entre otras) y la regulación de su ciclo de activación/inactivación son factores esenciales en el tráfico vesicular y la formación de la placa celular, entre otras. La función reguladora de GTPasas pequeñas oscila entre un estado inactivo (con unión a GDP), en general corresponde a una distribución citosólica, y un estado activo (con unión a GTP) en el que la enzima está asociada a una membrana, en este caso a la membrana de la vesícula. Para pasar de estado inactivo a uno activo, la GTPasa requiere la participación de una proteína efectora conocida como factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, por sus siglas en inglés) que reemplaza el GDP por GTP. Por otro lado, para una eficiente hidrólisis de GTP, las GTPasas necesitan de su activación al asociarse a proteínas GAP que "aceleren" su actividad.

encuentran BIG1-4, involucradas en redireccionar el tráfico de vesículas de la ruta de reciclaje endocítico hacia la ruta que conecta el TGN/EE con la PC en formación (29). GNOM (ARF-GEF) involucrada en el reciclaje polar de algunas proteínas (como PIN1) desde el compartimento endosomal a la membrana plasmática (25,30) juega un papel importante durante la citocinesis, en particular durante la división asimétrica del cigoto durante la embriogénesis, la cual se ve afectada en mutantes *gnom* (31).

Los cambios morfológicos que presenta la PC durante su maduración son el efecto de la actividad GTPasa de proteínas relacionadas a dinaminas o DRPs (siglas en inglés de dynamin-related protein) y proteínas efectoras. Las DRPs son proteínas grandes, que funcionan como remodeladoras de las membranas, por ejemplo, la fragmoplastina DRP1 y DRP2 modulan la constricción de fragmentos de

membrana para dar la forma tubular a la PC nascente, o la escisión de fragmentos de membrana en la transición de la forma tubular a una estructura planar en la PC madura (Fig. 5A) (32, 33). La doble mutante *drp1A drp1e* presenta un fenotipo muy drástico y suele ser letal en embriones de *Arabidopsis* (34). Entre las proteínas efectoras de DRP1 se encuentra la proteína SH3P2 (acrónimo de SH3 domain-containing protein 2, ver Tabla 1), con dominios BAR y SH3 en el extremo N- y C-terminal, respectivamente. SH3P2 recluta a DRP1 para promover que dos vesículas fusionadas se conviertan en una estructura tubular en la etapa inicial de la biogénesis de la PC (35).

Otro de los componentes específicos de la maquinaria citocinética en células vegetales es TPLATE, una proteína tipo adaptina, la cual al final de la citocinesis, se recluta al borde de la PC en expansión y a la CDZ, específicamente en el sitio

o posición que ocupó la PPB (Fig. 3G). Una vez que la membrana de la PC hace contacto con la membrana plasmática parental, TPLATE se dispersa (36). De hecho, una baja expresión de TPLATE causa defectos en el anclaje de la PC a la membrana plasmática parental (36). Es de mencionar que en la célula en interfase TPLATE se localiza en la membrana plasmática y se ha demostrado que TPLATE es una de las ocho subunidades que conforman el complejo endocítico de proteínas adaptadoras TPC (siglas en inglés de TPLATE complex) (37).

Igualmente, los complejos enzimáticos transmembranales celulosa sintasa (CESA, por sus siglas en inglés) y calosa sintasa (CalS, por sus siglas en inglés) son parte de la maquinaria de biogénesis y maduración de la PC, (Fig. 5A). La actividad enzimática de CalS es de tipo β -1,3-glucano sintasa (GSL, por siglas en inglés Glucan Synthase-Like). En *A. thaliana* hay 12 genes que codifican para calosa sintasa (*CalS1-12* o *GSL1-12*), de los cuales CalS10/GSL8 (también referido como MASSUE o CHORUS, ver Tabla 1) es esencial para el ensamblaje de la membrana de la PC y la deposición de calosa al lumen de ésta. Mutaciones en *GSL8* presentan un fenotipo de PC plana, con retraso en la deposición de calosa y citocinesis incompleta (38). Asimismo, la síntesis de celulosa juega un papel importante durante la formación de la PC; CESA1 se sintetiza y organiza en la etapa temprana o túbulo-vesicular del ensamblaje de la PC (Fig. 5A). Mutaciones en *CESA1*, al igual que en *KORRIGAN* (endo-1,4-beta-D-glucanasa de la ruta de biosíntesis de celulosa) originan placas celulares incompletas (39, 40).

3) La citocinesis en algas carofitas: origen de estructuras tipo fragmoplasto y placa celular

Si bien la citocinesis centrífuga mediada por fragmoplasto es un mecanismo característico de las plantas terrestres (o embriofitas), algunas estructuras tipo fragmoplasto y PC también han sido observadas en algunos taxones de algas carofitas (Fig. 6), un grupo de algas verdes unicelulares o pluricelulares que se encuentran en hábitats de agua dulce. Estas peculiaridades se suman a las características celulares, morfológicas y filogenéticas que indican que las plantas terrestres iniciaron su historia evolutiva a partir de las algas carofitas, hace 470-450 millones de años durante el periodo Ordovícico (41, 42).

Las algas carofitas constituyen el grupo monofilético Estreptofita (Streptophyta) (41, 43), por lo que este grupo de algas también son llamadas algas verdes estreptofitas y están agrupadas en seis clases: Mesostigmatophyceae (Mesostigma-

tales), Chlorokybophyceae (Chlorokybales), Klebsormidiophyceae (Klebsormidiales), Charophyceae (Charales), Coleochaetophyceae (Coleochaetales) y Zygnematophyceae (Zygnematales).

El estudio de la división celular en Charales, Coleochaetales y Zygnematales resaltó que forman fragmoplasto durante la citocinesis (44). De manera que, las embriofitas y estos tres taxones forman el clado conocido como "Phragmoplastophyta", por la presencia del fragmoplasto durante la citocinesis (45, 46). No obstante, si bien presentan formación de una estructura tipo fragmoplasto, la citocinesis en estas clases de algas carofitas es peculiar (Fig. 6).

Las primeras observaciones de la citocinesis en algas Charales (*Chara fibrosa*) fueron reportadas por Pickett-Heaps (1967) (47). La ultraestructura de *C. fibrosa* y *C. zeylanica* en división mostró la existencia de una organización de MTs típica de fragmoplasto y una estructura tipo PC (Fig. 6A). El fragmoplasto es persistente en el sentido que no se desensambla conforme tienen lugar los eventos de fusión vesicular, los cuales se presentan de forma simultánea en todo el plano de división hasta cubrir la superficie que separará a las células hijas (Fig. 6A y D). En este sentido, la biogénesis de la PC no es centrífuga ya que no inicia en el centro de la célula, ni se expande de manera radial hacia la periferia de la célula. Otro aspecto interesante es que se observó la formación de plasmodesmos durante la citocinesis (47-49).

Las algas carofitas del orden Coleochaetales, representadas por los géneros *Coleochaete* y *Chaetosphaeridium*, crecen como una monocapa adherida al sustrato. Son células con abundantes vacuolas localizadas en la base de la célula, lo que confiere una cierta polaridad celular (basal/apical) (Fig. 6B). El estudio de la división celular en *Coleochaete obicularis* y *C. scutata*, principalmente (50, 51), mostró que la división puede ser circunferencial (periclinal), o bien, radial (anticlinal). En ambos casos, la citocinesis es dependiente de fragmoplasto y se genera una PC (Fig. 6B). Cuando la división radial ocurre en células con una vacuola grande, la citocinesis es polarizada, es decir, el fragmoplasto no se ensambla en el centro del plano de la división, sino que tiene lugar en la periferia apical de la célula (Fig. 6B y D) y la expansión de la PC procede de esta zona hacia la zona basal, vacuolada (50-52). La membrana de la PC se fusiona con la membrana plasmática apical, aún antes de concluir la expansión y, posteriormente, se fusiona con la membrana plasmática basal (51, 53). La actividad citocinética polarizada en estas algas cobra relevancia desde el punto de vista evolutivo, ya que se consideraba que éste era un

CITOCINESIS EN ALGAS CAROFITAS

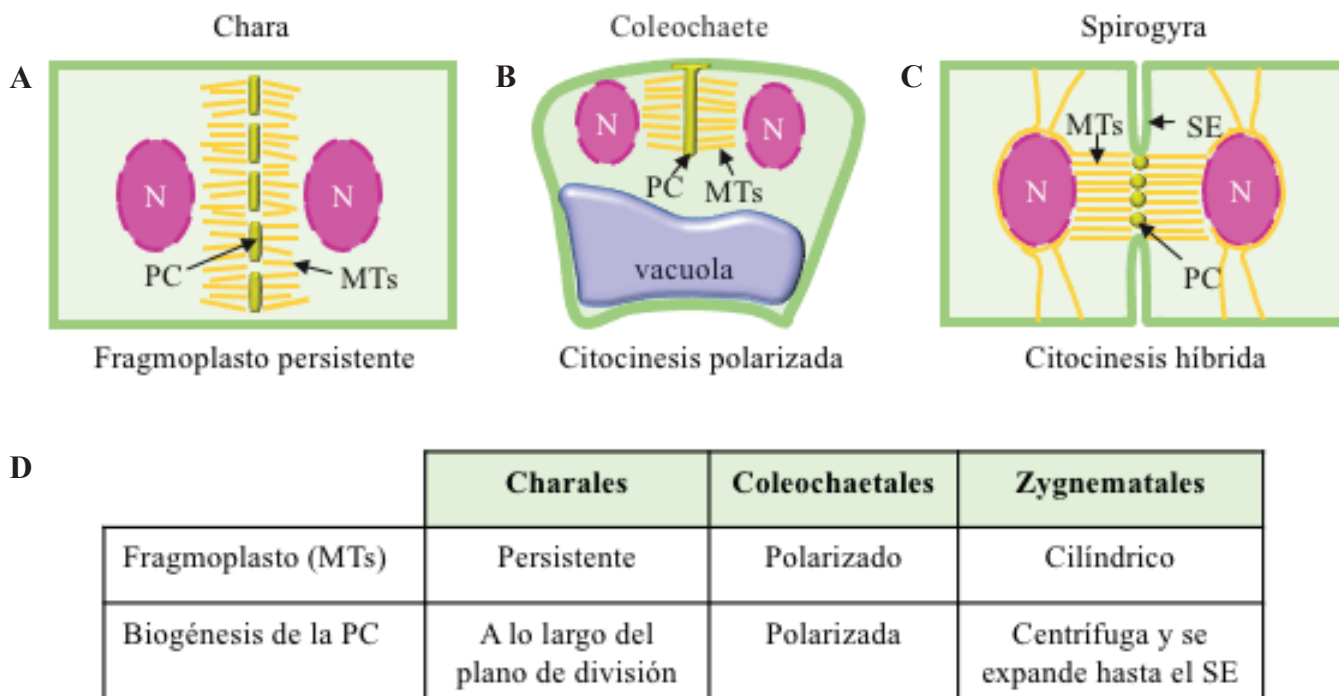


Figura 6. Citocinesis mediada por fragmoplasto en algas carofitas. A) Charales (género *Chara*), se caracterizan por tener una citocinesis que difiere a la de las plantas ya que el ensamblaje de la placa celular (PC) no ocurre de forma centrífuga, sino que tiene lugar de manera simultánea en diferentes zonas del plano de la división y el fragmoplasto persiste durante la formación de la PC; **B)** Coleochaetales (género *Coleochaete*), algas que pueden presentar una vacuola grande en la base de la célula. Cuando la división es radial o anticlinal, la vacuola provoca que el fragmoplasto se forme en una posición polar (apical periférica) del plano de la división, induciendo el ensamblaje y fusión de la PC a la membrana plasmática apical y después la PC se expande hasta llegar a la membrana plasmática basal. **C)** Citocinesis híbrida, se presenta en Zygnematales (género *Spirogyra*) e involucra dos mecanismos: un surco de escisión (SE) y una PC. El SE centrípeto da inicio a la citocinesis pero su crecimiento se detiene cuando hace contacto con los MTs del fragmoplasto cilíndrico, previamente ensamblado. Las vesículas alineadas en el centro del fragmoplasto cilíndrico se fusionan para formar la PC y culminar la citocinesis. **D)** Características de la citocinesis mediada por fragmoplasto en algas carofitas.

mecanismo exclusivo de la citocinesis en las células altamente vacuoladas, una característica estudiada en la planta modelo *A. thaliana* (54).

Finalmente, en el orden Zygnematales, Fowke y Pickett-Heaps (1969) (55) fueron los primeros en observar la citocinesis en el género *Spirogyra*, evidenciando la presencia de una estructura tipo-fragmoplasto cilíndrico, que algunos autores definen como un fragmoplasto rudimentario o en miniatura, que se forma durante la telofase (Fig. 6C) (55-57). Otra observación, muy interesante, fue que *Spirogyra* exhibe una citocinesis híbrida, en la que dos mecanismos citocinéticos están presentes: la formación de un surco de escisión (o septo) y la generación de una PC, ambas necesarias para la citocinesis (Fig. 6C y D). La formación del surco de escisión inicia durante la anafase y se extiende centrípetamente. En la


telofase, el crecimiento del surco de escisión se detiene cuando entra en contacto con el ensamblaje de MTs que conforman el fragmoplasto cilíndrico. Al concluir esta etapa, tiene lugar la biogénesis de la PC en el punto central del fragmoplasto y su expansión hasta concluir la citocinesis (55-57). El mecanismo de citocinesis híbrida también está presente en las algas carofitas de los géneros *Mougeotia* y *Zygnema*, ambos pertenecientes al orden Zygnematales (58, 59).

Algunos autores han sugerido que la estructura tipo-fragmoplasto rudimentario o en miniatura es el origen del fragmoplasto y representa un ejemplo de evolución *in statu nascendi* del fragmoplasto, una etapa intermedia en la evolución del fragmoplasto característico de las plantas (45, 55, 56).

Sin duda, las herramientas disponibles hoy en día serán la base para discernir los mecanismos mole-

culares de la mitosis y citocinesis en algas carofitas y reforzar la noción del origen del fragmoplasto y la PC. Un exhaustivo análisis molecular y celular comparativo de las maquinarias citocinéticas en algas carofitas *versus* las de las células vegetales será la próxima gran contribución al conocimiento de la historia evolutiva de las actuales plantas terrestres.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por proyecto DGAPA-UNAM IN206118 otorgado a RSL y el otorgamiento de becas CONACyT a RDD (288601) y EMM (595064). 

REFERENCIAS

- Guertin DA, Trautmann S, McCollum D (2002) Cytokinesis in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:155-178.
- Verma DP (2001) Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu Rev Plant Biol* 52:751-784.
- de Keijzer J, Mulder BM, Janson ME (2014) Microtubule networks for plant cell division. *Syst Synth Biol* 8:187-194.
- Jürgens G (2005) Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 56:281-299.
- Van Damme D, Vanstraelen M, Geelen D (2007) Cortical division zone establishment in plant cells. *Trends Plant Sci* 12:458-464.
- Smertenko A, Hewitt SL, Jacques CN, Kacprzyk R, Liu Y, Marcec MJ, Moyo L, Ogden A, Oung HM, Schmidt S, Serrano-Romero EA (2018) Phragmoplast microtubule dynamics—a game of zones. *J Cell Sci* 131:1-11.
- Smertenko A (2018) Phragmoplast expansion: the four-stroke engine that powers plant cytokinesis. *Curr Opin Plant Biol* 46:130-137.
- LaMontagne ED, Heese A (2017) Trans-Golgi network/early endosome: a central sorting station for cargo proteins in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 40:114-121.
- Nebenführ A, Frohlich JA, Staehelin LA (2000) Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol* 124:135-151.
- Seguí-Simarro JM, Austin JR, White EA, Staehelin LA (2004) Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* 16:836-856.
- Rosquete MR, Davis DJ, Drakakaki G (2018) The plant trans-golgi network: not just a matter of distinction. *Plant Physiol* 176:187-198.
- Nicolas WJ, Grison MS, Trépout S, Gaston A, Fouché M, Cordelières FP, Oparka K, Tilsner J, Brocard L, Bayer EM (2017) Architecture and permeability of post cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves. *Nat Plants* 3:1-11.
- Park E, Díaz-Moreno SM, Davis DJ, Wilkop TE, Bulone V, Drakakaki G (2014) Endosidin 7 specifically arrests late cytokinesis and inhibits callose biosynthesis, revealing distinct trafficking events during cell plate maturation. *Plant Physiol* 165:1019-1034.
- Van Damme D, Gadeyne A, Vanstraelen M, Inzéa D, Van Montagua M, De Jaegera G, Russinova E, Geelen D (2011) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 615-620.
- Teh OK, Shimono Y, Shirakawa M, Fukao Y, Tamura K, Shimada T, Hara Nishimura I (2013) The AP-1 μ adaptin is required for KNOLLE localization at the cell plate to mediate cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 54:838-47.
- Song K, Jang M, Kim SY, Lee G, Lee JG, Kim DH, Lee Y, Cho W, Hwang I (2012) An A/ENTH domain-containing protein functions as an adaptor for clathrin-coated vesicles on the growing cell plate in *Arabidopsis* root cells. *Plant Physiol* 159:1013-1025.
- Assaad FF, Mayer U, Wanner G, Jürgens G (1996) The KEULE gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 253:267-77.
- Lauber MH, Waizenegger I, Steinmann T, Schwarz H, Mayer U, Hwang I, Lukowitz W, Jurgens G (1997) The *Arabidopsis* KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J Cell Biol* 139:1485-1493.
- El Kasmi F, Krause C, Hiller U, Stierhof YD, Mayer U, Conner L, Kong L, Reichardt I, Sanderfoot AA, Jürgens G (2013) SNARE complexes of different composition jointly

- mediate membrane fusion in *Arabidopsis* cytokinesis. *Mol Biol Cell* 24:1593- 601.
20. Rybak K, Steiner A, Synek L, Klaeger S, Kulich I, Facher E, Wanner G, Kuster B, Zarsky V, Persson S, Assaad FF (2014) Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPPII and exocyst tethering complexes. *Dev Cell* 29:607- 20.
 21. Jaber E, Thiele K, Kindzierski V, Loderer C, Rybak K, Jürgens G, Mayer U, Söllner R, Wanner G, Assaad FF (2010) A putative TRAPPII tethering factor is required for cell plate assembly during cytokinesis in *Arabidopsis*. *New Phytol* 187:751-763.
 22. Thellmann M, Rybak K, Thiele K, Wanner G, Assaad FF (2010) Tethering factors required for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 154:720-732.
 23. Fendrych M, Synek L, Pecenkova T, Toupalova H, Cole R, Drdova E, Nebesárová J, Sedinová M, Hála M, Fowler JE, Zársky V (2010) The *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell* 22:3053-65.
 24. Minamino N, Ueda T (2019) RAB GTPases and their effectors in plant endosomal transport. *Curr Opin Plant Biol* 52:61-68.
 25. Chow CM, Neto H, Foucart C, Moore I (2008) Rab-A2 and Rab-A3 GTPases define a trans-Golgi endosomal membrane domain in *Arabidopsis* that contributes substantially to the cell plate. *Plant Cell* 20:101-123.
 26. Davis DJ, McDowell SC, Park E, Hicks G, Wilkop TE, Drakakaki G (2015) The RAB GTPase RABA1e localizes to the cell plate and shows distinct subcellular behavior from RABA2a under Endosidin 7 treatment. *Plant Signal Behav* 11:1-4.
 27. Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CSV, Friml J, Braun M, Gilroy S, Palme K (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* 20:2779-2788.
 28. Jaber E, Thiele K, Kindzierski V, Loderer C, Rybak K, Jürgens G, Mayer U, Söllner R, Wanner G, Assaad FF (2010) A putative TRAPPII tethering factor is required for cell plate assembly during cytokinesis in *Arabidopsis*. *New Phytol* 187:751-763.
 29. Richter S, Kientz M, Brumm S, Nielsen ME, Park M, Gavidia R, Krause C, Voss U, Beckmann H, Mayer U, Stierhof YD, Jürgens G (2014) Delivery of endocytosed proteins to the cell-division plane requires change of pathway from recycling to secretion. *eLife* 3:1-4.
 30. Dhonukshe P, Baluška F, Schlicht M, Hlavacka A, Šamaj J, Friml J, Gadella TWJ (2006). Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev Cell* 10:137-150.
 31. Mayer U, Büttner G, Jürgens G (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 117:149- 162.
 32. Gu X, Verma DPS (1997) Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* 9:157-169.
 33. Fujimoto M, Arimura SI, Nakazono M, Tsutsumi N (2008) *Arabidopsis* dynamin related protein DRP2B is co-localized with DRP1A on the leading edge of the forming cell plate. *Plant Cell Rep* 27:1581-1586.
 34. Kang BH, Busse JS, Bednarek SY (2003) Members of the *Arabidopsis* dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* 15:899-913.
 35. Ahn G, Kim H, Kim DH, Hanh H, Yoon Y, Singaram I, et al (2017) SH3 domain containing protein 2 plays a crucial role at the step of membrane tubulation during cell plate formation. *Plant Cell* 29:1388-1405.
 36. Van Damme D, Gadeyne A, Vanstraelen M, Inzé D, Van Montagu MCE, De Jaeger G, Russinova E, Geelen D (2011) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:615-620.
 37. Gadeyne A, Sánchez-Rodríguez C, Vanneste S, et al (2014) The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell* 156:691-704.
 38. Thiele K, Wanner G, Kindzierski V, Jürgens G, Mayer U, Pachel F, Assaad FF (2009) The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 58:13-26.
 39. Miart F, Desprez T, Biot E, Morin H, Belcram K, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S (2014) Miart F, Desprez T, Biot E, et al. Spatio-temporal analysis of cellulose synthesis during cell plate formation in *Arabidopsis*. *Plant J* 77:71-84.
 40. Zuo J, Niu QW, Nishizawa N, Wu Y, Kost B, Chua NH (2000) KORRIGAN, an *Arabidopsis* endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis. *Plant Cell* 12:1137-1152.
 - Becker B, Marin B (2009) Streptophyte algae and the

- origin of embryophytes. *Ann Bot* 103:999-1004.
42. Szövényi P, Waller M, Kirbis A (2019) Evolution of the plant body plan. *Curr Top Dev Biol* 131:1-34.
 43. Timme RE, Bachvaroff TR, Delwiche CF (2012) Broad phylogenomic sampling and the sister lineage of land plants. *PLoS One* 7:1-12.
 44. López-Bautista JM, Waters DA, Chapman RL (2003) Phragmoplastin, green algae and the evolution of cytokinesis. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1715-1718.
 45. Buschmann H, Zachgo S (2016) The Evolution of Cell Division: From Streptophyte Algae to Land Plants. *Trends Plant Sci* 21:872-883.
 46. Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, Van Der Straeten D, Gould SB, Rensing SA (2018) The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell* 174:448-464.
 47. Pickett-Heaps J (1967) Ultrastructure and Differentiation in *Chara* sp. II. Mitosis. *Aust J Biol Sci* 20:883.
 48. Cook ME, Graham LE, Botha CEJ, Lavin CA (1997) Comparative ultrastructure of plasmodesmata of Chara and selected bryophytes: Toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata. *Am J Bot* 84:1169-1178.
 49. Cook ME, Graham LE, Lavin CA (1998) Cytokinesis and nodal anatomy in the charophycean green alga *Chara zeylanica*. *Protoplasma* 203:65-74.
 50. Marchant HJ, Pickett-Heaps JD (1973) Mitosis and cytokinesis in *Coleochaete scutata*. *J Phycol* 9:461-471.
 51. Cook ME (2004) Cytokinesis in *Coleochaete orbicularis* (charophyceae): An ancestral mechanism inherited by plants. *Am J Bot* 91:313-320.
 52. Brown RC, Lemmon BE, Graham LE (1994) Morphogenetic plastid migration and microtubule arrays in mitosis and cytokinesis in the green alga *Coleochaete orbicularis*. *Am J Bot* 81:127-133.
 53. Doty KF, Betzelberger AM, Kocot KM, Cook ME (2014) Immunofluorescence localization of the tubulin cytoskeleton during cell division and cell growth in members of the Coleochaetales (Streptophyta). *J Phycol* 50:624-639.
 54. Cutler SR, Ehrhardt DW (2002) Polarized cytokinesis in vacuolate cells of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2812-2817.
 55. Fowke LC, Pickett-Heaps JD (1969) Cell division in Spirogyra. II. Cytokinesis. *J Phycol* 281:279-281.
 56. Mcintosh K, Pickett-heaps JD, Gunningt BES (1995) Cytokinesis in Spirogyra: Integration of Cleavage and Cell-Plate Formation. *Int J Plant Sci* 156:1-8.
 57. Sawitzky H, Grolig F (1995) Phragmoplast of the Green Alga Spirogyra Is Functionally Distinct from the Higher Plant Phragmoplast. *J Cell Biol* 130:1359- 1371.
 58. Pickett-Heaps JD, Wetherbee R (1987) Spindle function in the green alga Mougeotia: Absence of anaphase A correlates with postmitotic nuclear migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 7:68-77.
 59. Bakker ME, Lokhorst GM (1987) Ultrastructure of mitosis and cytokinesis in *Zygnema* sp. (Zygnematales, Chlorophyta). *Protoplasma* 138:105-118.



Article

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

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

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

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

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



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

Academic Editor:
Ioannis-Dimosthenis Adamakis

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

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



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

1. Introduction

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

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

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

Certainly, nodulation is a complex process that recruits part of the lateral root formation and the plant hormone regulatory programs [8,12–18], as it was revealed by the identification of genes essential for the development of the IT and nodule primordium, as well as by the nodule organogenesis. For the characterization of a variety of legume mutants deficient in nodulation, the phenotypic analysis of gene-specific downregulation/overexpression and transcriptomic analysis have contributed significantly to our current understanding of the IT initiation and progression processes, alongside the cell cycle reactivation in cortical cells at the pole of infection [5,8,16,18–20]. The list of genes related to the IT formation process includes receptor-like kinases (NFR5/NFR1/NFP/LYK3 and SYMRK/DMI2/NORK; [21–25]), small GTPases (e.g., ROP3, ROP6, ROP10 and RabA2; [26–31]), endocytosis and exocytosis markers (e.g., CHC and VAMP721e [27,32]), cell wall enzymes (e.g., Pectate-Lyase [33]), cytoskeletal proteins (e.g., flotillin, components of SCAR/WAVE and SCARN [34–40]), E3 ubiquitin ligases (e.g., CERBERUS, SINA and PUB [41–43]), transcription factors (e.g., NSP1/NSP2, ERF, ERN1, CYCLOPS/IPD3, NF-Y family members and NIN, a key regulator of the nodulation process [6,44–51]). Interestingly, some of those transcription factors are part of a complex transcriptional network that regulates both epidermal and cortical infection, and promotes nodule organogenesis, i.e., NIN, NSP1 and NSP2, as well as AP2/ERF [32,40,49,52,53]. CCD at early stages of nodulation is controlled by genes related to the cell cycle regulatory machinery and those associated to hormone signaling programs [14,19,20,53–62]. The first insights into this direction were obtained from early experiments assessing the mitogenic effect of NF on uninoculated alfalfa roots. Inner CCDs were observed in treated roots, and in situ hybridization confirmed the induced expression of cyclin B (*cyc2*) and cyclin-dependent kinase 2 (*cdc2*) [63]. Similar results were observed by Roudier et al. [59], when characterizing the gene *Medsa;cycA2;2*. In the same line, CCD was induced when a pea root-cortex explant was treated with auxin and cytokinin [64]. Moreover, the auxin responsiveness in rhizobium-induced cell division was confirmed by tracing the activity of auxin-responsive promoters (using *GH3::GUS*, *DR5::GUS* or *DR5::GFP* reporters), which were detected at the first division event at the inner or the outer cortex of *P. sativum* or *L. japonicus* infected roots, respectively [58,65]. Further reports corroborated that auxin efflux and influx, auxin transport inhibitors, auxin response factors and microRNA160 play a central role in rhizobial infection, cell cycle control and differentiation of vascular tissue in the nodulation process [17,19,59,66]. The phenotypic characterization of the *L. japonicus* gain-of-function and loss-of-function mutants *snf2/lhk1* and *hit1* and *M. truncatula* CRE1-RNAi roots [60,62,67] paved the way for deciphering the functions of the cytokinin signaling pathway, which includes genes involved in the biosynthesis and degradation of cytokinin, the participation of responsive regulators and transcription (reviewed in [16]), as part of the network controlling nodulation.

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

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

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

2. Results

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

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

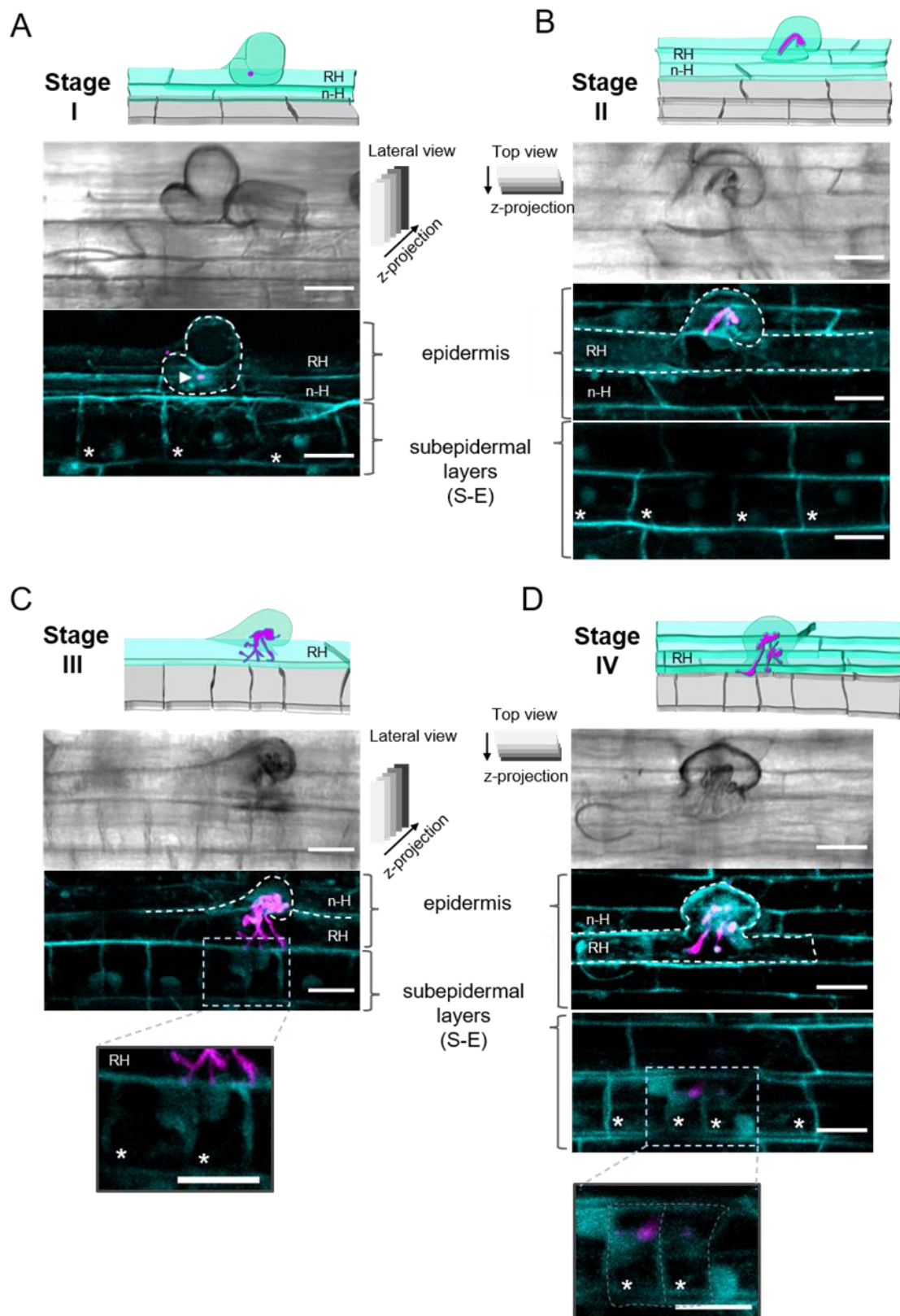


Figure 1. The four stages involved in rhizobia infection in *Phaseolus vulgaris* roots. Schematic representation and 2D projections of images from the epidermal infection sites (stages I to IV) in

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

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

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

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

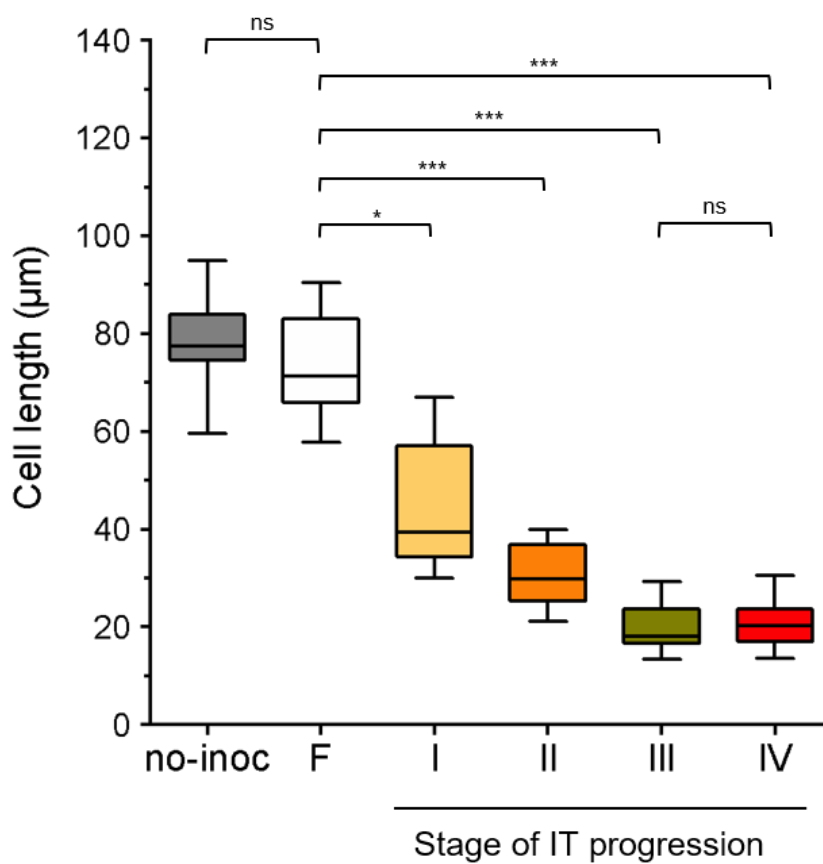


Figure 2. Length of subepidermal (S-E) cells in uninoculated and rhizobium-inoculated *P. vulgaris* roots at stages I–IV of IT progression in epidermal infection sites. Boxplot graph of cell length determined in series of independent 2D projections of S-E cells from the initial differentiation zone (susceptible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

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

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

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

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

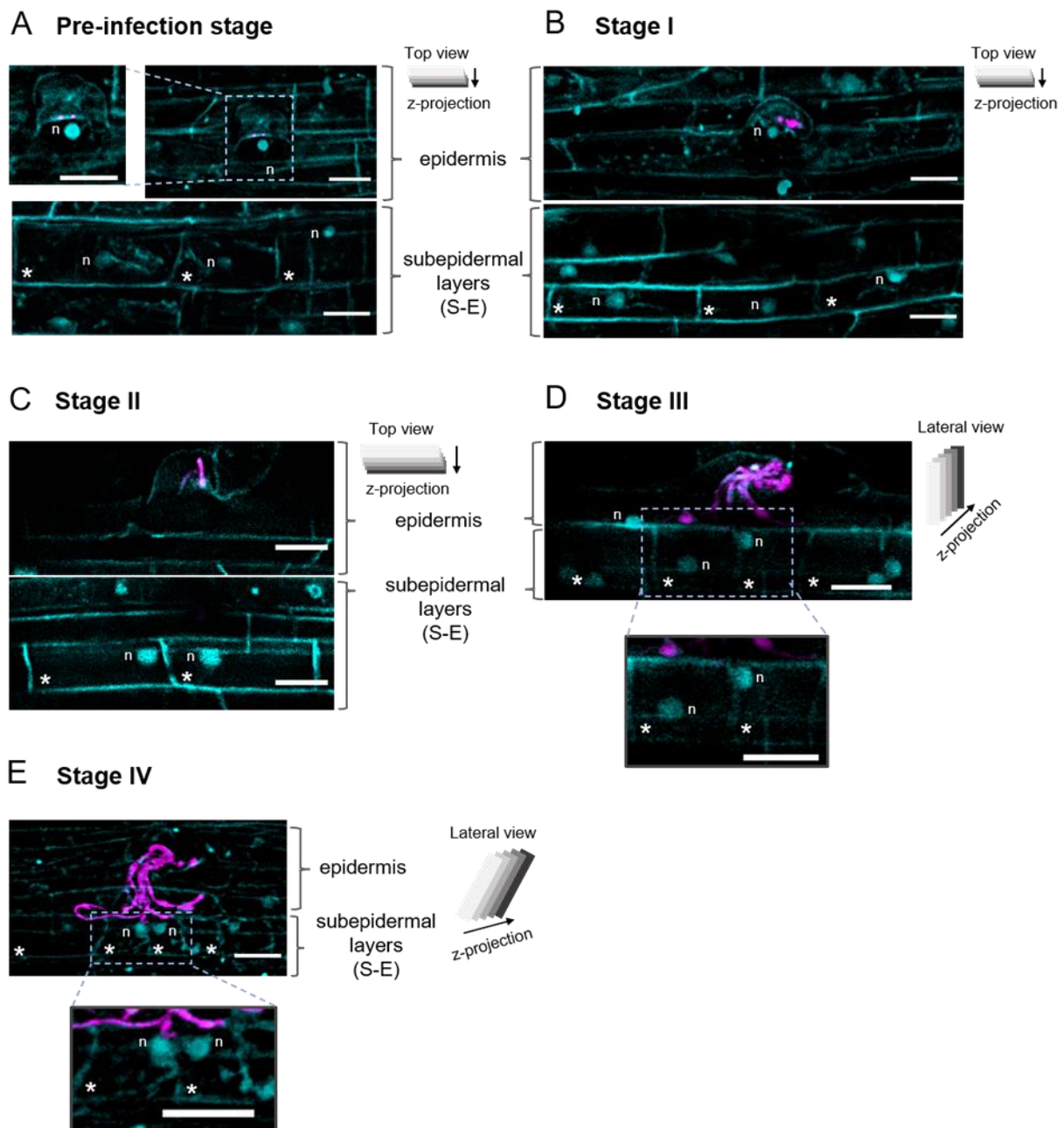


Figure 3. Visualization of the nucleus position in cells at epidermal infection site. The 2D projections of *Phaseolus vulgaris* roots expressing the nuclear marker NLS-mTurquoise2 or stained with DAPI (blue in both cases) and inoculated with *R. etli* CE3-DsRed pMP604 (4 dpi). Images are representative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

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

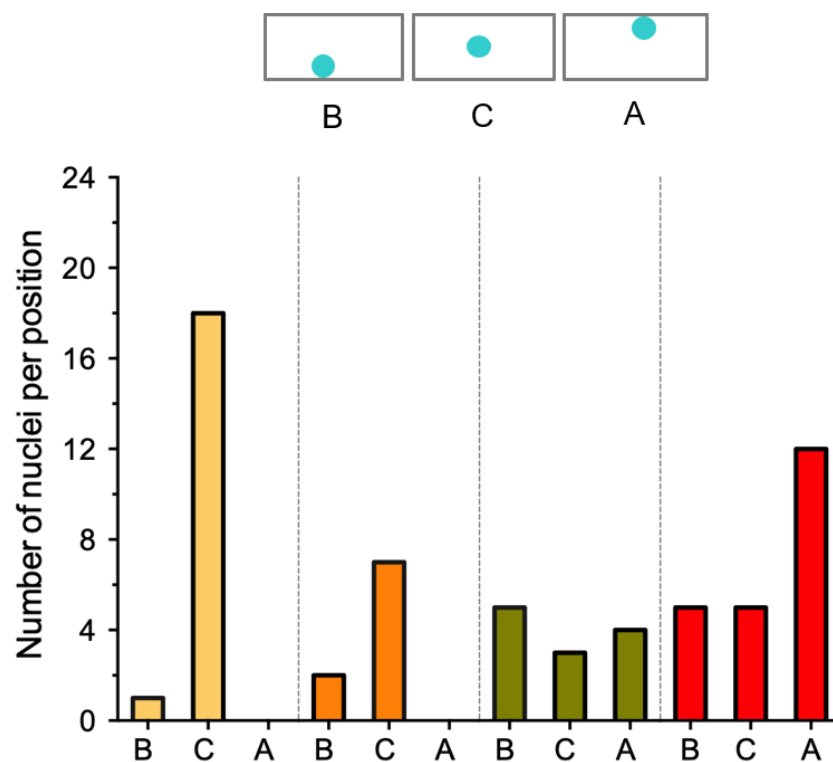


Figure 4. Distribution of the nuclei position in subepidermal (S-E) cells at stages I–IV of the IT progression. Graphic representation of the nuclei position in cells at each of the IT progression stages. Nuclei were either stained with DAPI or expressing NLS-mTurquoise2. Images were captured from 17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

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

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

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

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

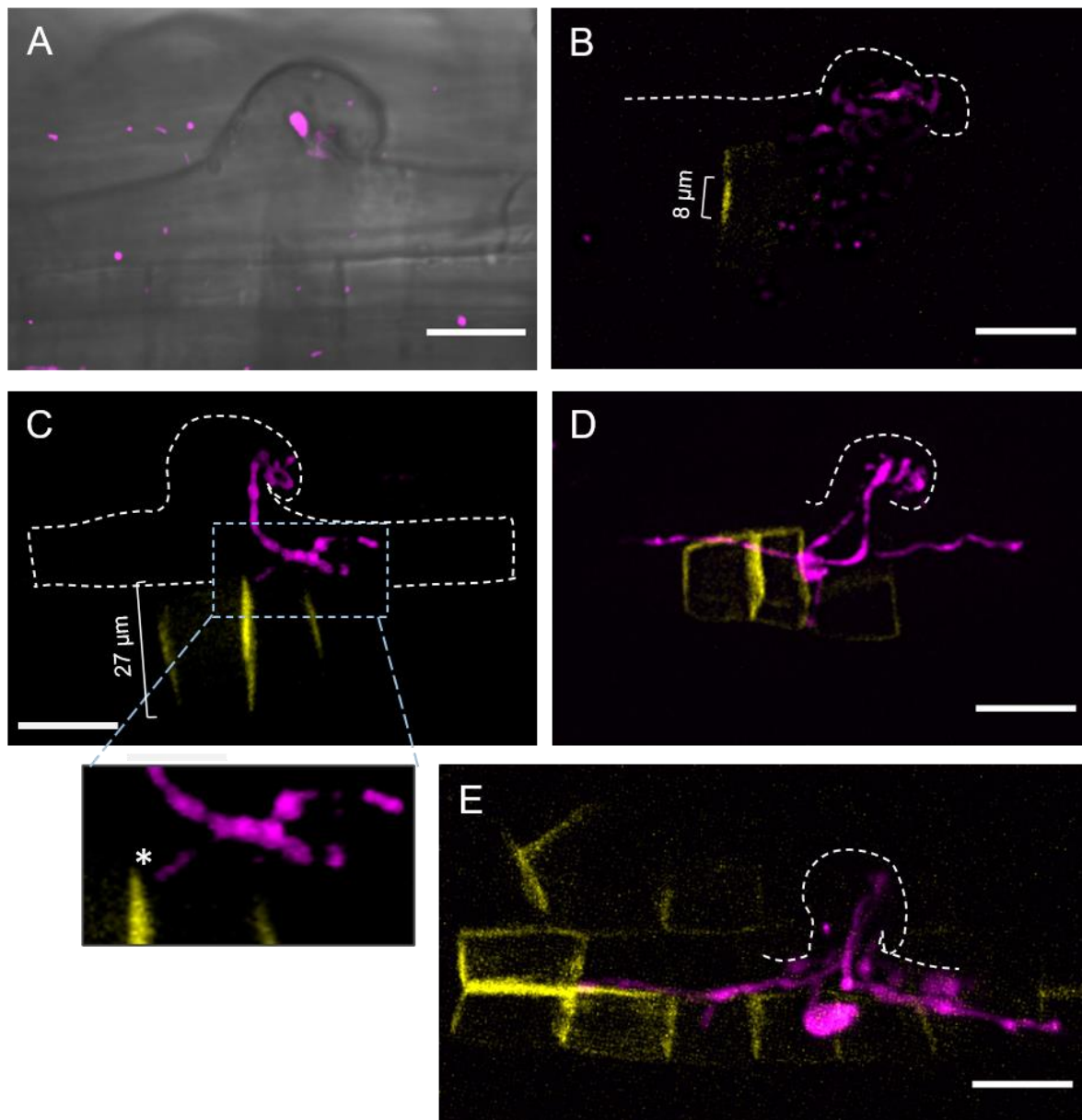


Figure 5. Visualization of the cell plate in subepidermal (S-E) cells underlying the epidermal infection at stages II and IV of the infection thread (IT) progression. The 2D projections of the epidermal infection site in *P. vulgaris* transgenic roots expressing YFP-*PvKNOLLE* and inoculated with *R.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

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

3. Discussion

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

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

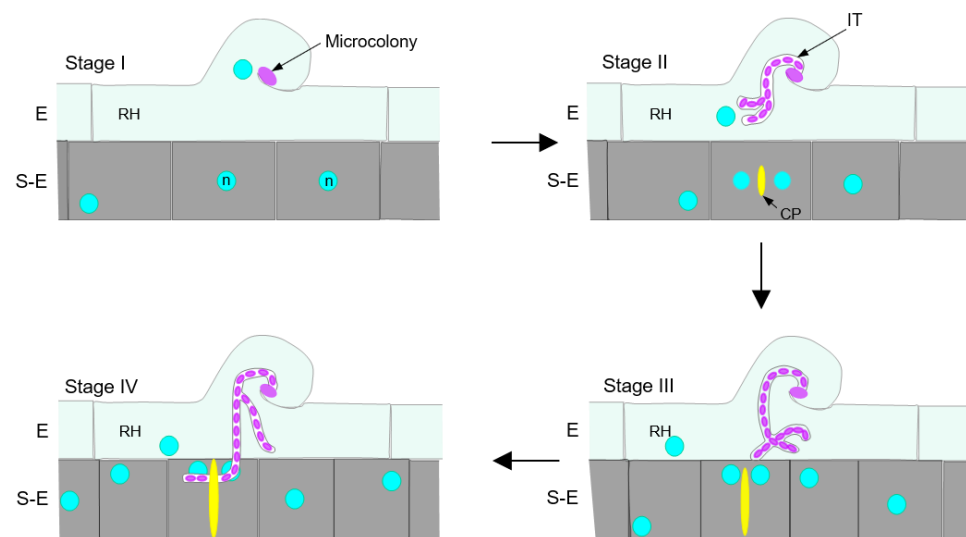


Figure 6. Schematic representation of the dynamics between the infection thread (IT) progression and the reactivation of the cell cycle. Infection thread (IT) progression was divided in stages I–IV, in which cells become successively shorter. Stage I: Rhizobia (magenta) is forming a microcolony, and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

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

a cytoplasmic bridge in the outermost cortical layers opposite to an epidermal infection site [4,85,86]. In highly vacuolated cells, such as root cortical cells and tobacco BY-2 cells, the cytoplasmic bridges or phragmosome are related to the cell division [87]. In this type of cell at the G1 phase, the vacuolar system is fragmented. At the G2 phase, the nucleus is displaced to the central region of the cell and a sheet of cytoplasm and arrays of microtubules are radiating from the nucleus to the cell periphery. Afterwards, a transvacuolar cytoplasmic disc gradually accumulates across the central region of the cell, forming a cytoplasmic bridge, where later the phragmoplast will form [87–89]. In the nodulation of *Medicago*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum* and *L. japonicus*, the cytoplasmic bridge, also designated as pre-infection thread, provides the path to cross the root cortex until reaching the forming nodule primordium [4,85,86]. Moreover, it has been postulated that formation of the pre-infection thread is involved in the weakening and deformation of the cell wall at the site where the IT will gain access to the neighboring cell [86]. No pre-infection threads have been observed in *P. vulgaris* roots, by means of histological examination [4]. Though it would be interesting to further address that issue by studying the vacuolar and microtubule dynamics in S-E cells upon inoculation with rhizobia, which is a matter of future research. However, we gained some insights into that direction by analyzing the cell length and nucleus distribution in *P. vulgaris* S-E cells underlying an epidermal infection. At stage I of infection, when a microcolony was observed in a curled root hair, these S-E cells were shorter than flanking cortical cells, and their nuclei were mostly at the center of the cell (Figures 2, 4 and 6). These parameters suggest the cell cycle was reactivated in those cells and potentially progressed to the G2 phase [90], though the appropriate analysis needs to be performed to better estimate the cell cycle reactivation dynamics and duration. It is noteworthy to mention that similar criteria were applied to distinguish dividing from undividing cells in *M. truncatula* roots overexpressing *enod40*, where an extensive inner cortical cell division was observed in the absence of rhizobia [76]. Moreover, the description of cortical cell division deficiency and the rhizobium-independent CCD phenotypes of a series of mutants in gene-silencing experiments often refers to the detection of a row of cortical cells shorter than in the control roots [19,60,67,91]. The same experimental strategy was used to demonstrate the mitogenic activity of purified Nod factors and the effect of plant hormones on CCD in nodulation [92–94]. In that regard, it would be interesting to have an estimation on the delay between the cell cycle reactivation and the conclusion of cytokinesis in those cortical cells participating in the nodulation process. Even though it certainly will be a difficult task in roots as thick as those in *P. vulgaris*, such an analysis would set the experimental conditions to address the molecular and cellular mechanisms underlying the cell cycle reactivation. As a reference, the duration of S/G2 and M phases within the root apical meristem and the transition zone in *Arabidopsis* roots was approximately 5 h, where mitosis had an estimated duration of 20–25 min [95].

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

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

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

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

4. Materials and Methods

4.1. Plants and Bacteria Growth Conditions

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

4.2. Plasmid Constructions

The sequence of *P. vulgaris* KNOLLE gene was identified in the Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/> (accessed on 30 June 2018), accession number Phvul.004G077900). For the analysis of *PvKNOLLE* promoter (*pPvKNOLLE*) activity, the sequence of a 1.76 kb fragment upstream from the start codon was amplified by PCR from genomic DNA using gene-specific primers. The PCR product was then cloned by recombination (Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix, Invitrogen, Waltham, MA, USA) into the plant vector pBGWFS7 to generate the *pPvKNOLLE::GFP-GUS* transcriptional fusion. To construct the expression cassette *pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*, the *PvKNOLLE* coding sequence (953 bp) was amplified in a RT-PCR reaction using total RNA from *P. vulgaris* root apex and the primers *PvKNOLLE-ATG* and *PvKNOLLE-stop*. The PCR product was then recombined into the plant vector pEarleyGate 104 to create the cassette *p35S::YFP-PvKNOLLE*. The last step consisted in the substitution of *p35S* sequence with the *pPvKNOLLE* fragment using *EcoRI* and *NcoI* and ligation strategy, leading to plasmid, *pEarleyGate104_pPvKNOLLE::YFP-PvKNOLLE*. To generate the expression cassette *p35S::NLS-mTurquoise2*, a chimeric cDNA coding for NLS-mTurquoise2 (751pb) was PCR amplified using the primer NLS-Turquoise UP, which comprises 24 nucleotides coding for the NLS sequence in frame with 18 nucleotides of the 5' end of the mTurquoise2 coding sequence, and the primer Turquoise LW. Plasmid *pmTurquoise2-ER* was used as template. NLS-mTurquoise2 cDNA was subcloned by recombination into the vector *pK2GW7* to generate the transcriptional fusion *p35S::NLS-mTurquoise2 (pK2GW7-NLS-mTurquoise2)*. All cloning steps were performed in *E. coli* DH5 α , confirmed by sequencing and electroporated into *A. rhizogenes* K599. The primer information is listed in Supplementary Table S1.

4.3. Fixation and DAPI Staining Conditions

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

4.4. Confocal Imaging

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

4.5. Image Processing and 3D Visualization

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

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

4.6. Statistical Analysis

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

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

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

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

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Elizabeth Monroy-Morales is a doctoral student from the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and this paper constitutes a partial fulfillment of her doctoral formation. We thank J. Arturo Pimentel Cabrera (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, Instituto de Biotecnología, UNAM) for technical assistance in confocal microscopy, as well as Eugenio López Bustos, Jorge Arturo Yañez Ponce de León and Ruben Paul Gaytan Colin (Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBt-UNAM). We also thank Shirley E. Ainsworth for library services (Unidad de Biblioteca, IBt-UNAM), and M.T.I. Juan Manuel Hurtado Ramírez, Ing. Roberto P. Rodríguez Bahena, M.E.M. David Santiago Castañeda Carreón, L.I. Jesús Omar Arriaga Pérez and M.C. Arturo Ocádiz Ramírez for computer services (Unidad de Cómputo, IBt-UNAM). mTurquoise2 plasmid was kindly provided by Takuya Nishigaki Shimizu (IBt-UNAM). We thank Alexandre Tromas for plasmid containing NLS3XmVenus (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM). We also thank Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas (Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, IBt-UNAM) for his technical advice in image processing. The participation of Jonathan Cuellar Vega (bachelor student) at the initial stage of this project is also gratefully acknowledged.

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

References

1. Patriarca, E.J.; Tatè, R.; Ferraioli, S.; Iaccarino, M. Organogenesis of Legume Root Nodules. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *234*, 201–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Guinel, F.C. Getting around the legume nodule: II. Molecular biology of its peripheral zone and approaches to study its vasculature. *Botany* **2009**, *87*, 1139–1166. [[CrossRef](#)]
3. Xiao, T.T.; Schilderink, S.; Moling, S.; Deinum, E.E.; Kondorosi, E.; Franssen, H.; Kulikova, O.; Niebel, A.; Bisseling, T. Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **2014**, *141*, 3517–3528. [[CrossRef](#)]
4. Van Spronsen, P.C.; Grønlund, M.; Bras, C.P.; Spaink, H.P.; Kijne, J.W. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 839–847. [[CrossRef](#)]
5. Ferguson, B.J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, M.G.; Lin, Y.H.; Reid, D.E.; Gresshoff, P.M. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant. Biol.* **2010**, *52*, 61–76. [[CrossRef](#)]
6. Oldroyd, G.E.D.; Downie, J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 519–546. [[CrossRef](#)]
7. Madsen, L.H.; Tirichine, L.; Jurkiewicz, A.; Sullivan, J.T.; Heckmann, A.B.; Bek, A.S.; Ronson, C.W.; James, E.K.; Stougaard, J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 1–12. [[CrossRef](#)]
8. Lebedeva, M.; Azarakhsh, M.; Sadikova, D.; Lutova, L. At the root of nodule organogenesis: Conserved regulatory pathways recruited by rhizobia. *Plants* **2021**, *10*, 2654. [[CrossRef](#)]
9. Murray, J.D. Invasion by invitation: Rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 631–639. [[CrossRef](#)]
10. Tsyganova, A.V.; Brewin, N.J.; Tsyganov, V.E. Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads. *Cells* **2021**, *10*, 1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. White, J.; Prell, J.; James, E.K.; Poole, P. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 604–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Suzaki, T.; Ito, M.; Kawaguchi, M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Franssen, H.J.; Xiao, T.T.; Kulikova, O.; Wan, X.; Bisseling, T.; Scheres, B.; Heidstra, R. Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. *Development* **2015**, *142*, 2941–2950. [[CrossRef](#)]
14. Guinel, F.C. Ethylene, a hormone at the center-stage of nodulation. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ng, J.L.P.; Hassan, S.; Truong, T.T.; Hocart, C.H.; Laffont, C.; Frugier, F.; Mathesius, U. Flavonoids and auxin transport inhibitors rescue symbiotic nodulation in the *Medicago truncatula* cytokinin perception mutant cre1. *Plant Cell.* **2015**, *27*, 2210–2226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gamas, P.; Brault, M.; Jardinaud, M.F.; Frugier, F. Cytokinins in Symbiotic Nodulation: When, Where, What For? *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 792–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kohlen, W.; Ng, J.L.P.; Deinum, E.E.; Mathesius, U. Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: Indeterminate and determinate nodules. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 229–244. [[CrossRef](#)]

18. Mergaert, P.; Kereszt, A.; Kondorosi, E. Gene Expression in Nitrogen-Fixing Symbiotic Nodule Cells in *Medicago truncatula* and Other Nodulating Plants. *Plant Cell*. **2020**, *32*, 42–68. [[CrossRef](#)]
19. Suzaki, T.; Yano, K.; Ito, M.; Umehara, Y.; Suganuma, N.; Kawaguchi, M. Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development* **2012**, *139*, 3997–4006. [[CrossRef](#)]
20. Tan, S.; Sanchez, M.; Laffont, C.; Boivin, S.; Signor, C.L.; Thompson, R.; Frugier, F.; Brault, M. A cytokinin signaling type-b response regulator transcription factor acting in early nodulation1. *Plant Physiol.* **2020**, *183*, 1319–1330. [[CrossRef](#)]
21. Catoira, R.; Galera, C.; de Billy, F.; Penmetsa, R.V.; Journet, E.P.; Maillet, F.; Rosenberg, C.; Cook, D.; Gough, C.; Dénarié, J. Four Genes of *Medicago truncatula* Controlling Components of a Nod Factor Transduction Pathway. *Plant Cell*. **2000**, *12*, 1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Endre, G.; Kereszt, A.; Kevei, Z.; Mihacea, S.; Kaló, P.; Kiss, G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **2002**, *417*, 962–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stracke, S.; Kistner, C.; Yoshida, S.; Mulder, L.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; Stougaard, J.; Szczyglowski, K.; et al. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **2002**, *417*, 959–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Madsen, E.B.; Felle, H.H.; Umehara, Y.; Grønlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Niels Sandal, N.; et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **2003**, *425*, 585–592. [[CrossRef](#)]
25. Sánchez-López, R.; Jáuregui, D.; Nava, N.; Alvarado-Affantranger, X.; Montiel, J.; Santana, O.; Sanchez, F.; Quinto, C. Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant Cell Environ.* **2011**, *34*, 2109–2121. [[CrossRef](#)]
26. Ke, D.; Fang, Q.; Chen, C.; Zhu, H.; Chen, T.; Chang, X.; Yuan, S.; Kang, H.; Ma, L.; Hong, Z.; et al. The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 131–143. [[CrossRef](#)]
27. Wang, C.; Zhu, M.; Duan, L.; Alvarado-Affantranger, X.; Montiel, J.; Santana, O.; Sanchez, F.; Quinto, C. *Lotus japonicus* clathrin heavy chain1 is associated with rho-like GTPase ROP6 and involved in nodule formation. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 1497–1510. [[CrossRef](#)]
28. Lei, M.J.; Wang, Q.; Li, X.; Chen, A.; Luo, L.; Xie, Y.; Li, G.; Luo, D.; Mysore, K.S.; Wen, J.; et al. The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation. *Plant Cell*. **2015**, *27*, 806–822. [[CrossRef](#)]
29. Blanco, F.A.; Meschini, E.P.; Zanetti, M.E.; Aguilar, O.M. A small GTPase of the rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-rhizobium symbiotic association. *Plant Cell*. **2009**, *21*, 2797–2810. [[CrossRef](#)]
30. Via, D.V.; Traubenik, S.; Rivero, C.; Aguilar, O.M.; Zanetti, M.E.; Blanco, F.A. The monomeric GTPase RabA2 is required for progression and maintenance of membrane integrity of infection threads during root nodule symbiosis. *Plant Mol. Biol.* **2017**, *93*, 549–562. [[CrossRef](#)]
31. García-Soto, I.; Boussageon, R.; Cruz-Farfán, Y.M.; Castro-Chilpa, J.D.; Hernández-Cerezo, L.X.; Bustos-Zagal, V.; Leija-Salas, A.; Hernández, G.; Torres, M.; Formey, D.; et al. The *Lotus japonicus* ROP3 Is Involved in the Establishment of the Nitrogen-Fixing Symbiosis but Not of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fournier, J.; Teillet, A.; Chabaud, M.; Ivanov, S.; Genre, A.; Limpens, E.; Carvalho-Niebel, F.; Barker, D.G. Remodeling of the infection chamber before infection thread formation reveals a two-step mechanism for rhizobial entry into the host legume root hair. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 1233–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Xie, F.; Murray, J.D.; Kim, J.; Jurkiewicz, A.; Rueda, P.; Radutoiu, S.; Held, M.; Hossain, M.S.; Szczyglowski, K.; Morieri, G.; et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 633–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yokota, K.; Fukai, E.; Madsen, L.H.; Jurkiewicz, A.; Rueda, P.; Radutoiu, S.; Held, M.; Hossain, M.S.; Szczyglowski, K.; Morieri, G.; et al. Rearrangement of actin cytoskeleton mediates invasion of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *Plant Cell*. **2009**, *21*, 267–284. [[CrossRef](#)]
35. Haney, C.H.; Long, S.R. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 478–483. [[CrossRef](#)]
36. Miyahara, A.; Richens, J.; Starker, C.; Morieri, G.; Smith, L.; Long, S.; Downie, J.A.; Oldroyd, G.E.D. Conservation in Function of a SCAR/WAVE Component during Infection Thread and Root Hair Growth in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2010**, *23*, 1553–1562. [[CrossRef](#)]
37. Hossain, M.S.; Liao, J.; James, E.K.; Sato, S.; Tabata, S.; Jurkiewicz, A.; Madsen, L.H.; Stougaard, S.; Ross, L.; Szczyglowski, K. *Lotus japonicus* ARPC1 is required for rhizobial infection. *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 917–928. [[CrossRef](#)]
38. Perrine-Walker, F.M.; Lartaud, M.; Kouchi, H.; Ridge, R.W. Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Protoplasma* **2014**, *251*, 1099–1111. [[CrossRef](#)]
39. Qiu, L.; Lin, J.S.; Xu, J.; Sato, S.; Parniske, M.; Wang, T.L.; Downie, J.A.; Xie, F. SCARN a Novel Class of SCAR Protein That Is Required for Root-Hair Infection during Legume Nodulation. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, 1–27. [[CrossRef](#)]
40. Liang, P.; Schmitz, C.; Lace, B.; Ditengou, F.A.; Su, C.; Schulze, E.; Knerr, J.; Grosse, R.; Keller, J.; Libourel, C.; et al. Formin-mediated bridging of cell wall, plasma membrane, and cytoskeleton in symbiotic infections of *Medicago truncatula*. *Curr. Biol.* **2021**, *31*, 2712–2719.e5. [[CrossRef](#)]

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

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

91. Tsyganov, V.E.; Voroshilova, V.A.; Priefer, U.B.; Borisov, A.Y.; Tikhonovich, I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the Rhizobium-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis. *Ann. Bot.* **2002**, *89*, 357–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bauer, P.; Ratet, P.; Crespi, M.D.; Schultze, M.; Kondorosi, A. Nod factors and cytokinins induce similar cortical cell division, amyloplast deposition and MsEnoD12A expression patterns in alfalfa roots. *Plant J.* **1996**, *10*, 91–105. [[CrossRef](#)]
93. Reid, D.; Nadzieja, M.; Novák, O.; Heckmann, A.B.; Sandal, N.; Stougaard, J. Cytokinin biosynthesis promotes cortical cell responses during nodule development. *Plant Physiol.* **2017**, *175*, 361–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Heckmann, A.B.; Sandal, N.; Bek, A.S.; Madsen, L.H.; Jurkiewicz, A.; Nielsen, M.W.; Tirichine, L.; Stougaard, J. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 1385–1395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Pasternak, T.; Kircher, S.; Palme, K. Estimation of differential cell cycle kinetics in higher plant root meristem with cellular fate and positional resolution. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
96. Fåhraeus, G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **1957**, *16*, 374–381. [[CrossRef](#)]
97. Peng, H.; Ruan, Z.; Long, F.; Simpson, J.H.; Myers, E.W. V3D enables real-time 3D visualization and quantitative analysis of large-scale biological image data sets. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 348–353. [[CrossRef](#)]