



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN**

**TEMA:**

**SOBREEXRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *PvCRK12*  
DURANTE LA SIMBIOSIS DE FRIJOL-RIZOBIO**

**MODALIDAD DE TITULACIÓN:**

**TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**ANTONINO MICHEL LECONA JIMÉNEZ**

**TUTOR:**

**DR. MANOJKUMAR ARTHIKALA**

**ASESOR:**

**DRA. KALPANA NANJAREDDY**





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.

## **Agradecimientos**

Debo empezar recalcando mi agradecimiento, respeto y admiración al Doctor Manojkumar Arthikala, quien además de ser mi tutor en el desarrollo de este trabajo de investigación, ha sido un mentor que me ha inspirado y motivado a crecer y desarrollarme como profesional y sobre todo como persona. Sin su conocimiento, respaldo y confianza nada de esto hubiera sido posible, gracias por ayudarme a cumplir uno de mis más grandes sueños y por brindarme su amistad. También agradezco a la Doctora Kalpana Nanjareddy por su apoyo y respaldo en cada momento que fue necesario, tanto a nivel profesional como a nivel personal, por brindarme su amistad y por brindarme su confianza. Agradezco profundamente a mi familia, mi padre Antonino, mi madre Sonia, a mi hermano Giordano, a mi compañera incondicional Karen, y a mis hijos León, Santino y Luciana por el apoyo y motivación constante, por la fuerza de seguir adelante y por compartir mis propios sueños. Agradezco a Edgar por la motivación constante y el apoyo confortable de su amistad. Quiero resaltar el agradecimiento profundo a mis compañeros de equipo de laboratorio, aprendí mucho de ustedes, hicieron de todo esto algo divertido, cómodo e inolvidable, gracias Carolina, Laura, Sofia, Brenda, Cassandra, Oswaldo, Natalie, Luis, Héctor y Daniela. Agradezco a DGAPA/PAPIIT (IN213221), UNAM, Dr. Manojkumar Arthikala por otorgarme las becas correspondientes. También agradecer a DGAPA/PAPIIT, UNAM IN216321, Dra. Kalpana Nanjareddy. CONACYT (CF-MI-20191017134234199/316538 to M.-K.A.) por financiar este proyecto. Todos y cada uno de ustedes forman parte de esto y sin ustedes nada sería posible, GRACIAS.

## **Dedicatoria**

*Para Antonino León, Luca Santino y Luciana Cataleya; porque han sido mi mayor motivo, mi ancla y mi más grande sueño.*

*Para mis padres, Antonino y Sonia, porque me dieron con mucho amor todo lo que necesitaba para ser lo que soy.*

*Para Karen, por apoyarme incondicionalmente a pesar de todo desde hace tantos años, por tanto, amor, cuidados y confianza, porque sin ti no hubiera sido posible.*

*Para mi hermano, Giordano.*

# Contenido

## Introducción

### 1.1 El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), características de la especie

#### 1.1.1 Domesticación y origen evolutivo

#### 1.1.2 Características genéticas y genómicas de *Phaseolus vulgaris*

#### 1.1.3 Importancia del cultivo

##### 1.1.3.1 Composición nutrimental

#### 1.1.4 Características del cultivo

#### 1.1.5 Variedades

### 1.2 Simbiosis

#### 1.2.1 La simbiosis como ventaja evolutiva

#### 1.2.2 Generalidades de la simbiosis *Rhizobium*-fabaceae

#### 1.2.3 Coevolución rizobio-leguminosa

#### 1.2.4 Origen de los genes nod

#### 1.2.5 ¿Qué es *Rhizobium*?

#### 1.2.6 Comunicación química durante el establecimiento de la simbiosis

#### 1.2.7 Descripción detallada de la simbiosis

### 1.3 Quinasas tipo receptor (RLKs)

#### 1.3.1 Anotación funcional de la familia de *CRK*

#### 1.3.2 Implicaciones de la familia génica durante la simbiosis *Phaseolus*-*Rhizobium*

## **1.4 Transformación genética de *P. vulgaris* (19)**

### **Objetivos**

#### **2.1 Objetivo General**

#### **2.2 Objetivos específicos**

### **Hipótesis**

### **Justificación (21)**

### **Antecedentes**

#### **5.1 Ruta de Señalización simbiótica**

#### **5.2 Genes expresados significativamente durante nodulación**

### **Métodos y materiales**

#### **6.1 Análisis del promotor de *PvCRK12***

#### **6.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para análisis de promotor, sobreexpresión (OX) y localización (LOC)**

#### **6.3 Aislamiento de ADN genómico de *P. vulgaris***

#### **6.4 Clonación de Fragmentos en vector pENTR/D-TOPO**

#### **6.5 Transformación a *E. coli* TOP10**

#### **6.6 Clonación de Fragmento en Vector Final pBGWFS7.0 para análisis de promotor**

#### **6.7 Clonación de Fragmento en Vector Final pH7WG2D.1 para análisis de sobreexpresión**

#### **6.8 Transformación de *A. rhizogenes* con el Vector Final**

#### **6.9 Generación de raíces transgénicas en semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa.**

#### **6. 10 Inoculación de plantas con *Rhizobium tropici* y análisis de expresión espacio-temporal**

## **6.11 Ensayo de Tinción GUS:X-gluc**

## **6.12 Análisis de Expresión y Patrones de Colonización**

### **Resultados**

#### **7.1 Análisis de la Expresión Espaciotemporal del Promotor y Localización subcelular de la Proteína CRK12**

#### **7.2 *CRK12* Altera la Morfología de las Raíces y los Pelos Radicales**

#### **7.3 *CRK12* Regula el Número de Nódulos y los puntos de infección en *P. vulgaris***

#### **7.4 La Sobreexpresión de *CRK12* Resulta en Hipernodulación en Raíces Transgénicas de *P. vulgaris***

#### **7.5 El estrés oxidativo se altera en raíces de *P. vulgaris* que expresan *CRK12***

### **Discusión**

### **Conclusión**

### **Anexos**

### **Productos**

# Introducción

## 1.1 El frijol, características de la especie

El término “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L.) es el nombre utilizado para hacer referencia a las leguminosas que pertenecen al género *Phaseolus*, familia Fabaceae o Leguminosae, subfamilia Papilionoidae, tribu Phaseoleae y subtribu *Phaseolinae*. Se ha estimado que desde el siglo XIX se han descrito aproximadamente 400 especies pertenecientes al género *Phaseolus* (Freytag y Debouck, 2002). Carl Von Linnaeus describió 11 especies dentro del género, aunque, posteriormente, algunas de ellas fueron clasificadas dentro del género *Vigna*. El género *Phaseolus* abarca un gran rango de variabilidad en términos fisiológicos y morfológicos (De Ron y Santalla, 2013). La especie con mayor significancia económica y científica es *P. vulgaris*.

*P. vulgaris* es una planta que puede alcanzar (en algunas variedades) alturas de hasta 3-4 metros, es una especie anual y con diferentes hábitos de crecimiento: arbustiva y trepadora. Sus hojas tienen una dimensión de 5-10 x 4-6 cm, trifoliadas, con folíolos peciolados, ovados y acuminados. Sus flores aparecen en racimos axilares, más cortos que las hojas, hasta con seis flores cada uno. El cáliz es campanulado, bilabiado. Corola de 10-18 mm, con estandarte y quilla abiertos, presentan coloración blanca o púrpura. La legumbre tiene una longitud de hasta de 25 x 2,5 cm, es de forma alargada y colgante. Sus semillas son elipsoidales, numerosas, de tamaño, forma y colores muy variables, correspondiendo a la gran cantidad de variedades y cultivares existentes en la actualidad (CIAT., 1984).

### 1.1.1 Domesticación y origen evolutivo

El género contiene 5 especies domesticadas: *P. vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus lunatus* L. (frijol lima), *Phaseolus coccineus* L. (frijol escarlata), *Phaseolus acutifolius* A. (frijol gris) y *Phaseolus polyanthus* (frijol anual), cada una de las cuales han sido seleccionadas y adaptadas a diferentes tipos de características reproductivas, ecológicas y



agrícolas. *Phaseolus lunatus* es filogenéticamente la especie más distante respecto a las otras, las cuales conforman un syngameon, promoviendo la variabilidad fenotípica observada (De Ron y Santalla, 2013).

Todos los cultivares actuales de frijol provienen de dos eventos de domesticación diferentes, uno en el sur de la cordillera de los Andes y otro en Mesoamérica, teniendo un ancestro común originario de Ecuador y el norte de Perú. A principios del siglo XVI la especie llega a Europa, comenzando un proceso de aislamiento genético respecto a la zona de origen, teniendo como resultado una diferenciación genética entre los frijoles europeos y los frijoles americanos (Myoungchai y Gepts, 2009). A partir de un análisis multivariante de datos morfológicos, agronómicos y moleculares en referencia con datos biogeográficos de las razas autóctonas latinoamericanas se describieron dos acervos genéticos de *P. vulgaris*, el de América Media y el de América Andina, los cuales pueden dividirse a su vez en seis razas, Durango, Jalisco y Mesoamérica para el grupo de América Media y Chile, Nueva Granada y Perú en el grupo genético Andino (Singh et al., 1991).

Su posible antepasado andino es *P. aborigineus* (Burkart y Brucher, 1953). Diferentes procesos de domesticación se llevaron a cabo según el contexto ecológico y necesidades agronómicas en el que se desarrollaba el proceso (Bitocchi et al., 2017). Su extensión de distribución a otros continentes y las presiones selectivas artificiales y naturales a las que fueron sometidas han provocado gran diversidad fenotípica, se conocen eventos de hibridación entre los dos posibles grupos de origen (Bitocchi et al., 2017).

### **1.1.2 Características genéticas y genómicas de *Phaseolus vulgaris***

*Phaseolus vulgaris* ha sido utilizado como una especie modelo para derivar principios de vital importancia en el estudio de la genética vegetal. Fue utilizada por científicos como Mendel, Johnnsen y Sax para obtener datos sobre herencia genética (cuantitativa, fenotípica y QTL). Todas las especies del género *Phaseolus* son diploides teniendo en su mayoría 22 cromosomas ( $2n = 2x = 22$ ); sus cromosomas mitóticos o meióticos normales tienen una longitud de 1-3  $\mu\text{m}$ , son metacéntricos y submetacéntricos. Se cuenta con un cariotipo para *P. vulgaris* y *P. coccineus* basado en cromosomas polítenos de las células suspensoras embrionarias. El genoma de *P. vulgaris* es uno de los de menor tamaño dentro de la familia

de las leguminosas, teniendo una longitud de entre 587 Mb y 640 Mb. Se han obtenido datos de secuencias de más de 1000 genes; teniendo un contenido de GC, incluyendo intrones y exones, de aproximadamente 40% (Gepts, 1988; Myounghai y Gepts, 2009; De Ron y Santalla, 2013).

Se estableció un mapa de enlace molecular de consenso, que correlaciona 12 mapas, basado en marcadores RFLP, RAPD, isoenzimas, AFLP, ISSR, microsatélites y marcadores fenotípicos, el cual tuvo una longitud de mapa promedio de 1200 cM. El genoma del frijol común se considera colineal respecto al de *Vigna* sp. (subtribu: Phaseolinae, tribu: Phaseoleae), mostrando muchos reordenamientos en referencia con el genoma de *Glycine max* (subtribu: Glycininae, tribu: Phaseoleae) (Freyre et al., 1998; Santalla et al., 2002). Se han descrito las secuencias de retrotransposones y se han logrado establecer bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos para esta especie. También se han localizado genes relacionados a la resistencia a enfermedades y análogos, así como genes para la nodulación de *Rhizobium* y tolerancia a estrés abiótico como sequía, además se han etiquetado con marcadores moleculares genes no asignados especialmente en resistencia a enfermedades y patrones de color de la semilla (De Ron y Santalla, 2013)

Se cuenta con una gran cantidad de muestras de germoplasma tanto de las formas silvestres como de las domesticadas a nivel mundial en: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Pullman, Washington, E.U.A; Instituto de Investigación Vavilov, San Petersburgo, Rusia; Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CRF-INIA), Alcalá de Henares, España y Misión Biológica de Galicia - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC), Pontevedra, España. La colección de referencia para Phaseolinae se encuentra localizada en el Jardín Botánico Nacional, en Meise, Bélgica (De Ron y Santalla, 2013).

### **1.1.3 Importancia del cultivo**

En el mundo se producen más de 26 millones de toneladas de frijol en grano y 22 millones de toneladas de vainas para su consumo fresco, principalmente en Birmania, India y Brasil (grano), China, Indonesia y Turquía (fresco) (FAO, 2017).

### 1.1.3.1 Composición nutrimental

Una de las razones por las que el cultivo de frijol ha tenido gran relevancia en el desarrollo agrícola es su composición nutrimental (INCNSZ, 2015).

**TABLA 1. Cantidad de nutrimentos por porción que contiene el frijol negro (*P. vulgaris*)**

<b>Nutrimento</b>	<b>Contenido por porción (100 g)</b>
Proteína bruta	20.84 g
Hidratos de carbono	55.88 g
Azúcares	2.12 g
Fibra bruta	4.10 g
Ca	183 mg
P	367 mg
Fe	7.83 mg
Na	5 mg
K	1483 mg

Mg	171 mg
Cu	0.84 mg
Mn	3.65 mg
Se	1.06 mg
Vitamina A	0.03 mg
Vitamina B1	0.76 mg
Vitamina B2	0.19 mg
Niacina	1.84 mg/100g
Vitamina B6	0.29 mg
Folato	444 µg

Dicha composición puede cambiar según la variedad de frijol analizada, así como cómo se consuma la leguminosa (INCNSZ, 2015), en general es un alimento rico en aminoácidos y, junto con cereales, estructura proteínas similares a las de la carne. Estas características han hecho de este cultivo uno de los de mayor importancia agrícola y alimentaria.

#### 1.1.4 Características del cultivo

*Phaseolus vulgaris* es un cultivo con sensibilidad a las bajas temperaturas, así como a los diferenciales bruscos en el ambiente. Suele tener un mejor rendimiento en suelos arenosos ligeramente ácidos, ya que no tolera la alcalinidad de los suelos calizos. Respecto al manejo agrícola del cultivo puede ser un monocultivo, un cultivo asociado (como en la milpa tradicional mesoamericana) o un cultivo de rotación.

### **1.1.5 Variedades**

Su diversidad morfológica, en métodos de cultivo, rango de adaptación y características genéticas han permitido identificar 6 grupos varietales principales: Nueva Granada, Chile, Perú (en el grupo Andino y Durango, Jalisco y Mesoamérica (del grupo mesoamericano) (Singh et al., 1991). Se considera que existen alrededor de 600 variedades, de las cuales 62 son de importancia comercial para su consumo en grano (De Ron et al., 2016), estas variedades suelen distinguirse por el tamaño, la forma y el color de los granos que producen (Angioi et al., 2010). Considerando el tipo de crecimiento se pueden distinguir dos tipos de plantas de frijol, las variedades de mata alta o crecimiento indeterminado y las de mata baja o crecimiento determinado.

## **1.2 Simbiosis**

La interacción entre diferentes especies es el mecanismo fundamental por el que los ecosistemas adquieren su estructura, dando origen a complejas redes tróficas. Estas relaciones, que abarcan dinámicas, son cruciales en la conformación de los entornos naturales. El concepto de simbiosis, derivado de las palabras griegas "syn" (juntos) y "biosis" (vivir), se refiere a las asociaciones biológicas entre organismos de distintas especies, con el propósito de lograr beneficios mutuos durante su desarrollo. Para las plantas, en particular, la consolidación de interacciones simbióticas resulta de vital importancia para adquirir los recursos necesarios para su supervivencia. Dado que las plantas son seres sésiles, su interacción con el entorno y la captación de nutrientes dependen en gran medida de complejas redes de comunicación subterráneas y aéreas (Taiz, 2010). En este contexto, las relaciones que se establecen entre las plantas y microorganismos, como hongos formadores de micorrizas y

bacterias rizobias en la rizosfera, desempeñan un rol especialmente relevante. Estas interacciones simbióticas contribuyen a optimizar la absorción de nutrientes y el crecimiento vegetal al establecer conexiones entre los sistemas radiculares de las plantas y las estructuras microbianas en el suelo. La asociación con hongos micorrícicos permite a las plantas acceder a recursos que de otro modo serían difíciles de alcanzar, mientras que la colaboración con bacterias rizobias enriquece la disponibilidad de nutrientes esenciales como el nitrógeno, crucial para el desarrollo vegetal saludable. En conclusión, la simbiosis es fundamental en la ecología y el desarrollo de los organismos, especialmente en las plantas. Estas asociaciones biológicas subrayan la importancia de la colaboración entre diferentes especies para alcanzar un equilibrio y una prosperidad compartida en los ecosistemas. La comprensión y el estudio de estas interacciones continúan ofreciendo una ventana hacia la complejidad y la interconexión de la vida en la Tierra.

### **1.2.1 La simbiosis como ventaja evolutiva**

La simbiosis, un fenómeno biológico de gran relevancia, ha sido considerada una dinámica con implicaciones macroevolutivas, aunque también se ha planteado su posible influencia en procesos microevolutivos (Lavagnino, 2014). Esta noción se fortaleció gracias a la labor de teóricos como Lynn Margulis, quien promovió la idea de la simbiosis como extensión fundamental de la Teoría Sintética de la Evolución. Las interacciones simbióticas abarcan diversos niveles, desde interacciones conductuales hasta interacciones fisiológicas, genéticas y de productos génicos (Margulis y Sagan, 1995; Margulis, 2002).

En párrafos anteriores, se ha resaltado la importancia de las plantas en su dependencia de relaciones e interacciones con diferentes especies para garantizar su supervivencia. La relación simbiótica que establecen con hongos micorrícicos y bacterias rizobiales, por ejemplo, les otorga acceso a nutrientes que, de otro modo, les sería difícil adquirir, ejerciendo un impacto significativo en todo el ecosistema, especialmente como la principal fuente de fijación de nitrógeno atmosférico. Es relevante destacar que la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias rizobiales es el resultado de una adaptación de la simbiosis entre

plantas y hongos (Parniske, 2008). En ambos casos, la relación simbiótica implica complejidad y conduce a cambios notables en la estructura de las raíces vegetales ( Roi, et al. 2020).

### **1.2.2 Generalidades de la simbiosis *Rhizobium-fabaceae***

La asociación simbiótica entre las raíces de las leguminosas y las bacterias rizobiales presentes en el suelo es esencial para el desarrollo de nódulos especializados. Estos nódulos, una vez formados, desempeñan un papel crucial en la fijación del nitrógeno atmosférico en forma molecularmente utilizable. Los productos resultantes de este proceso, como amidas en climas templados y ureidos en regiones tropicales, son transportados desde los nódulos hacia el resto de la planta, contribuyendo a su desarrollo general. Además del beneficio nutricional que esto implica para las plantas, la fijación de nitrógeno también enriquece el suelo, lo que tiene implicaciones importantes para la agricultura sostenible.

En cuanto a las bacterias, reciben energía y carbono en forma de ácidos dicarboxílicos durante la fijación de nitrógeno. Se establece un intercambio de aminoácidos entre las bacterias y las células vegetales, así como el suministro de glutamato por parte de las plantas a las bacterias. Esto permite a las bacterias regular la asimilación de amonio y la producción de compuestos beneficiosos para las plantas. El sistema que abarca la membrana vegetal y las bacterias diferenciadas en bacteroides recibe el nombre de simbiosoma (Oldroyd et al., 2011). La transferencia de nutrientes ocurre después de la formación de estas estructuras y es mediada por reguladores moleculares como SYMRK, componentes del poro nuclear, canales de cationes y quinasas de tipo receptor (Sutton et al., 1994, Gherbi et al., 2008; Laffont et al., 2018).

La fijación biológica del nitrógeno, conocida como diazotrofia, constituye un proceso ancestral que data del Eón Arqueano, período caracterizado por la ausencia de oxígeno en la atmósfera terrestre. Este fenómeno, presente en organismos procariotas, ha experimentado

una coevolución significativa con las angiospermas, estableciendo las bases moleculares para las relaciones simbióticas mutualistas. Las bacterias rizobiales llevan a cabo la fijación del nitrógeno en órganos especializados denominados nódulos, los cuales se forman en las raíces, y en casos excepcionales, en el tallo de las leguminosas. La formación de estos nódulos está regulada por factores nodulación codificados en plásmidos, cuya aparición se relaciona estrechamente con la presencia de los hospederos específicos, es decir, las leguminosas (Lloret & Martínez, 2005).

### **1.2.3 Coevolución rizobio-leguminosa**

Las angiospermas han coevolucionado con organismos fijadores de nitrógeno, y con bacterias rizobiales, , específicamente las familias Fabaceae y Ulmaceae.

Los nódulos presentan diversidad morfológica y funcional. Algunas leguminosas forman nódulos determinados, que alcanzan su madurez en pocas semanas y tienen una forma esférica. Otros forman nódulos de crecimiento indeterminado, que persisten durante más tiempo y tienen una forma alargada (Roy, et al. 2020) La especialización en la interacción entre bacterias rizobiales y leguminosas ha llevado a la evolución de los factores Nod, que son proteínas especializadas para la nodulación en función del hospedero. Estos factores pueden ser altamente específicos o más promiscuos, y su evolución ha estado influenciada por señales bioquímicas intercambiadas entre ambas partes. (Epstein, et al. 2023).

### **1.2.4 Origen de los genes NOD**

La interacción planta-rizobio, desencadena, en el simbiote bacteriano, la producción de factores NOD (lipoquitooligosacáridos), éstos tienen una función de reconocimiento y presentación con el hospedero vegetal. Estos genes se agrupan en operones y pueden localizarse tanto en cromosomas como en plásmidos simbióticos. Algunos genes de nodulación codifican funciones celulares comunes, pero están especializados para el proceso de nodulación (Roy, et al. 2020).



### **1.2.5 ¿Qué es *Rhizobium*?**

El término "rizobio" se utiliza para hacer referencia a bacterias diazotróficas gram negativas que habitan la rizosfera y que suelen generar relaciones mutualistas con algunas familias de angiospermas. Estas bacterias son bacilos de aproximadamente 0.5-0.9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.2-3.0  $\mu\text{m}$  de largo. Prefieren ambientes aeróbicos y son tolerantes a concentraciones elevadas de dióxido de carbono, carbohidratos simples y compuestos amino. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 25 y 30 °C, y su pH óptimo está en el rango de 6.0 a 7.0.

### **1.2.5 Comunicación química durante el establecimiento de la simbiosis**

La comunicación inicial en la interacción simbiótica involucra la liberación de compuestos químicos por parte de las bacterias rizobiales en respuesta a señales químicas emitidas por las plantas. Este proceso se inicia con la liberación de oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados, conocidos como factores Nod, producidos por las bacterias rizobiales. Estos factores desencadenan una serie de eventos que conducen a la formación de nódulos y la posterior interacción simbiótica. A lo largo de la interacción, las señales bioquímicas se intercambian entre las bacterias y las plantas para regular la nodulación y el metabolismo (Roy et al. 2020).

### **1.2.6 Descripción detallada de la simbiosis**

Durante la interacción simbiótica entre las plantas y las bacterias rizobiales, se forman estructuras especializadas llamadas nódulos. Estos nódulos constan de varias zonas, como una corteza externa, un endodermo, una corteza interna (parénquima del nódulo) y una zona central donde residen las bacterias. La interacción comienza con la unión de las bacterias a los pelos radiculares de la planta y la posterior penetración en el tejido cortical a través de un "hilo de infección". Esto lleva a la formación de un "simbiosoma", que es una estructura que

alberga las bacterias en el interior de las células vegetales. Las bacterias liberan factores NOD en respuesta a moléculas específicas liberadas por las plantas, lo que estimula la formación de nódulos. Las bacterias también interactúan con la planta para crear un entorno de baja concentración de oxígeno en el nódulo, que es crucial para la fijación de nitrógeno (Xiao et al., 2014).

### **1.3 Quinasas tipo receptor (RLK)**

Dentro del intercambio molecular generado por la interacción entre plantas y microorganismos, existen diferentes familias de proteínas que juegan un papel significativo como intermediarios de la comunicación simbiótica. Las quinasas tipo receptor pertenecen a la familia de genes RLK/Pelle y desempeñan un papel importante en la percepción y transducción de señales en plantas. Se encuentran en la membrana plasmática y se caracterizan por tener un dominio extracelular, una región transmembranal y una región intracelular que contiene una proteína quinasa. Estas proteínas están involucradas en respuestas a variables ambientales y procesos de desarrollo en plantas.

Dentro de la familia RLK/Pelle, existe una subfamilia llamada RLKs (CRR-RLK o CRKs). Los miembros de esta subfamilia tienen dominios DUF26 en su región extracelular, los cuales están compuestos por un motivo C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>2</sub>-C. La familia CRK es una de las más grandes y diversificadas, con múltiples miembros en diversas especies vegetales. Su estructura y función varían según la especie y el contexto de señalización.

Las repeticiones tándem y las duplicaciones cromosómicas son comunes en la familia CRK, lo que ha contribuido a su diversificación. Aunque muchos miembros de esta familia aún no han sido caracterizados en detalle, se ha demostrado que los CRK están involucrados en rutas de señalización relacionadas con la simbiosis y el estrés, tanto biótico como abiótico.

#### **1.3.1 Anotación funcional de la familia de CRK**

Los *CRK* caracterizados a la fecha han sido genes analizados en *Arabidopsis*, en donde se ha asociado su expresión con la respuesta a patógenos. A partir de análisis de sobreexpresión se ha logrado identificar a varios genes *AtCRKs* (*AtCRK4*, *AtCRK5*, *AtCRK6*, *AtCRK13*, *AtCRK28*, *AtCRK36* y *ATCRK45*) relacionados con un incremento en la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv tomato (Pst), (Chen et al., 2003, Acharya et al., 2007, Ederli et al., 2011, Yeh et al., 2015, Yadeta et al., 2016). A pesar de la relación de estos genes con la bacteria patógena, su interacción génica y su expresión espacio temporal son distintas, como se ha demostrado con la sobreexpresión de *AtCRK45* que incrementa la expresión de genes de defensa, mientras que las mutantes (gen silenciado) son menos resistentes a *P. syringae* (Ederli et al., 2011). Estudios en *AtCRK4*, *AtCRK6* y *AtCRK26* demostraron que incrementan la respuesta de defensa a patógenos (PTI) temprana y tardía (Yeh et al., 2015). Se ha demostrado que *AtCRK5* y *AtCRK2* mostraron estar involucrados en el proceso de cierre estomático al expresarse en células oclusivas durante una infección patogénica; su silenciamiento afecta directamente la función estomática (Bourdais et al., 2015). La sobreexpresión de *AtCRK6* ha demostrado inducir el cierre de estomas, lo que sugiere que el incremento en la resistencia se debe posiblemente a la inmunidad estomática (Yeh et al., 2015). El gen *AtCRK13* fue relacionado con una respuesta exclusiva a patógenos bacteriano, generando muerte celular tipo-HR con su sobreexpresión, con la activación de marcadores moleculares y celulares relacionados a las respuestas de defensa, con una acumulación de ácido salicílico y un incremento en los niveles de resistencia a diversas cepas bacterianas (virulentas y no virulentas) (Acharya et al., 2007).

Su especificidad bacteriana permitió demostrar que la activación de CRK se llevaba a cabo por flg22. La sobreexpresión de *AtCRK13* disminuyó 20 veces la presencia de patógenos bacterianos virulentos y 10 veces de avirulentos. Se sabe que *AtCRK28* en *Arabidopsis* interviene en la modulación de la respuesta a ácido abscísico (ABA), demostrando su importancia en la morfología en modelos mutantes *CRK28* y de sobreexpresión *35S::CRK28*, en donde se pudo observar que el crecimiento general, el número de tricomas y la longitud de raíces vellosas se vieron afectados de manera significativa (Pelagio-Flores et al., 2019). En *Oriza sativa* se ha demostrado la importancia de los genes *OsCRK6* y *OsCRK10* en la cascada de señalización del gen *BTB/POZ domain*

and ankyrin repeat-containing protein NPR1-like (NH1) (homólogo de *AtNPR1*), el cual confiere inmunidad de amplio espectro (Chern et al., 2016), corroborándose al silenciar el gen, lo que dio como resultado la supresión de la inmunidad mediada por NH1. En un estudio adicional, se llevó a cabo el silenciamiento del gen *OsCRK10* en arroz provocando la inducción en la expresión de varios genes *Pathogenesis-related proteín PRB 1-3 (PR)* (*PR1a*, *PR1b*, *PR2* y *PR10*) en la vaina y láminas de la planta, al mismo tiempo que se reportó una acumulación de ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA). Se realizó un análisis de expresión diferencial entre dos variedades de trigo (*Triticum*), una resistente (CI12633) a *Rhizoctonia cerealis* y otra susceptible, identificando al gen *TaCRK1* como regulado positivamente en la variedad resistente (Yang et al., 2013). A pesar de esto, el silenciamiento de *TaCRK1* no compromete la resistencia de CI12633 a *R. cerealis*, lo que permite suponer gracias a la naturaleza redundante de la familia de genes CRKs, que existen genes con función homóloga dentro del grupo (Yang et al., 2013). En algodón, *Gossypium barbadense*, se ha identificado la familia de CRKs, demostrando que existe expresión diferencial como respuesta a la infección provocada por *V. dahliae* (Li et. al., 2018). Se identificó un gen candidato de resistencia, *GbCRK18*, ya que su silenciamiento ocasionó susceptibilidad al patógeno. En *Hordeum vulgare*, se seleccionó el gen *HvCRK1* debido a su sobreexpresión en variedades susceptibles a *Blumeria graminis* (Rayapuram et al., 2012). A partir de estudios de sobreexpresión y silenciamiento se ha podido observar que el gen *HvCRK1* interacciona negativamente en la respuesta de resistencia basal contra *Blumeria graminis* f.sp. sin llegar a influir en la respuesta de muerte celular programada mediada por genes R (Rayapuram et al., 2012).

### **1.3.2 Implicaciones de la familia génica durante la simbiosis *Phaseolus-Rhizobium***

En *Phaseolus vulgaris*, *PvCRK20* redujo su expresión de manera rápida y transitoria como respuesta a la interacción con cepas patogénicas y no patogénicas del hongo *F. sonali*, al mismo tiempo que se demostró la regulación negativa del gen en interacción con factores NOD de una cepa de *Rhizobium* sin capacidad de simbiosis, lo cual indicaría que *PvCRK20* tiene una función preponderante en la diferenciación de simbiontes (mutualistas y

antagonistas). De manera adicional, existe un solo reporte que vincula CRKs con el proceso de simbiosis, identificando un gen *CRK* altamente expresado en la interacción entre el *Phaseolus* y *Rhizobium* (Quezada et al., 2019). El gen *PvCRK12* demostró tener una regulación positiva de ~7.3 veces sobre el nivel basal en raíces noduladas en comparación con controles. El diferencial de expresión encontrado en este gen, apunta a que *PvCRK12* es un gen candidato de importancia en simbiosis con bacterias rizobiales. De acuerdo con los análisis de expresión y localización, se ha demostrado que es casi exclusiva del tejido nodular en raíces colonizadas.

Se ha demostrado la implicación de varios RLKs durante la simbiosis en leguminosas (Nishimura et al., 2002; Krusell et al., 2002; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Limpens et al., 2003; Parniske, 2004), actualmente *SymCRK* en *Medicago truncatula* ha sido identificado como el único CRK con un papel directo en el proceso de simbiosis (Stracke et al., 2002; Endre et al., 2002).

#### **1.4 Transformación genética de *P. vulgaris***

Diversos trabajos en transformación de plantas de *P. vulgaris* han permitido demostrar la dificultad para generar plantas transgénicas, estableciéndose como una planta recalcitrante a transformación. A pesar de que se ha conseguido llevar a cabo transformaciones estables en frijol común a partir de métodos directos como el bombardeo de partículas y electroporación, estos métodos han demostrado bajas frecuencias de éxito, rondando el 0.03% y el 0.8%, sumado a lo complicado del proceso (Russell et al., 1993; Aragão et al., 1996; Vianna et al., 2004; Bonfim et al., 2007). Estos métodos han demostrado generar una gran cantidad de inserciones, patrones de integración complejos y más altas probabilidades de generar plantas quiméricas, apuntando a la transformación por *Agrobacterium* como el método más atractivo por su eficacia y accesibilidad (Jackson et al., 2013). Sin embargo, hasta hace poco, la transformación genética de *P. vulgaris* por este método tenía una tasa de eficiencia muy baja (Veltcheva et al., 2005). Algunos trabajos han presentado tasas de transformación de 12% (Liu et al., 2005), sin embargo, no se han llevado a cabo evaluaciones exhaustivas.

Debido a lo mencionado, se ha adoptado el uso de *Agrobacterium rhizogenes* como la alternativa de transformación más eficiente para el desarrollo de estudios de biología radicular e interacción simbiótica, ya que es un método rápido, de alta eficiencia y practicidad, teniendo compatibilidad con varios cultivares y razas criollas de *P. vulgaris* (Estrada-Navarrete et al., 2007). Con este método se emplea a la cepa *A. rhizogenes K599* para generar plantas con un sistema radicular transgénico con un brote WT; teniendo la capacidad de inocular con bacterias rizobiales y micorrizas a dichas raíces, la bacteria induce la producción de raíces pilosas en un sitio específico de herida del huésped, gracias a su plásmido Ri de inducción de raíces, el cual contiene un locus codificante para ADN de transferencia responsable de la introducción estable de material genético a las células huésped (Ron et al., 2014). La sección específica y bien definida del plásmido Ri es transferida al genoma nuclear del hospedero, provocando la generación de raíces pilosas con el inserto génico de interés (Tepfer, 2017). Los sistemas de transformación génica para *P. vulgaris* han sido establecidos a partir de un sistema mediado por *Agrobacterium* en *P. acutifolius* y por métodos biolísticos. El establecimiento de protocolos que aprovechan la generación de raíces pilosas por cepas de *Agrobacterium* en tejido radicular ha permitido generar tejido transgénico que ha facilitado el estudio y caracterización genética en las fabáceas a partir de análisis de sobreexpresión y promotores. Al mismo tiempo que permite inocular las raíces pilosas transgénicas con raíces nodulantes para realizar análisis de la interacción a diversos niveles.

## Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Como objetivo general del presente estudio se lleva a cabo la caracterización de la función del gen *PvCRK12* de *Phaseolus vulgaris* así como de su papel durante la interacción simbiótica con *Rhizobium* mediante estudios de expresión, análisis de promotores, localización subcelular y sobreexpresión.

## 2.2 Objetivos específicos

- Clonación y promoción de la actividad promotora *PvCRK12* en frijol bajo condiciones de simbiontes para reconocer la expresión espacio – temporal del gen.
- Clonación y estudios de localización subcelular del *PvCRK12* en las raíces del frijol para reconocer las regiones celulares y subcelulares del tejido en donde el gen se expresa bajo condiciones de simbiosis y control.
- Aislamiento y clonación del gen *PvCRK12* en vector binario para estudios de sobreexpresión para obtener bacterias transgénicas de *Agrobacterium rhizogenes* K599 que permitan la generación raíces transgénicas.
- Generación de raíces pilosas transgénicas que sobreexpresan *PvCRK12* y su validación por RT-PCR, de esta manera se logrará resaltar los efectos del gen bajo una condición de simbiosis planta-rizobio.
- Realizar estudios histológicos de las raíces transgénicas que sobreexpresan *PvCRK12* en frijoles en diferentes etapas de simbiosis de rizobio, de ésta manera se logrará caracterizar el fenotipo simbiótico.
- Análisis moleculares de *PvCRK12* en patrones de señalización.
- Estudios cuantitativos de tallo, raíz y producción para conocer los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de *PvCRK12*.

## Hipótesis

El proyecto de investigación titulado ‘Sobreexpresión y caracterización de *PvCRK12* durante la simbiosis de frijol-rhizobia’ abarca un conjunto completo de hipótesis interconectadas. En primer lugar, postula que la sobreexpresión del gen *PvCRK12* sustenta significativamente el establecimiento y diferenciación de nódulos, desempeñando un papel fundamental en la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*. Mediante el aislamiento, la clonación y la sobreexpresión de *PvCRK12* en un vector binario, se generarán y validarán raíces peludas transgénicas mediante RT-PCR, lo que proporcionará un vínculo tangible con una expresión mejorada de *PvCRK12*. Las raíces transgénicas resultantes estarán sujetas a

examen histológico en varias etapas de simbiosis de rizobios para dilucidar el impacto de *PvCRK12* en el desarrollo y la nodulación de las raíces. Los análisis moleculares explorarán el papel potencial de *PvCRK12* en la mediación de patrones de señalización cruciales para la intrincada comunicación entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*. Por último, las evaluaciones cuantitativas del desarrollo del tallo, la raíz y los nódulos ofrecerán información sobre las implicaciones más amplias de la sobreexpresión de *PvCRK12*. Juntas, estas hipótesis forman un marco integral para descubrir la dinámica multifacética de *PvCRK12* y sus contribuciones a la intrincada interacción entre plantas y microorganismos simbióticos, lo que resulta prometedor tanto para conocimientos fundamentales como para aplicaciones agrícolas prácticas.

## **Justificación**

La caracterización molecular detallada de la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y bacterias rizobiales es de vital importancia por diversas razones.

A pesar de que se han caracterizado diversas moléculas reguladoras como proteínas y factores de transcripción (Nod, SYMRK, componentes de poro nuclear, canales de cationes y quinasas de tipo receptor) aún existen nodos e interacciones moleculares no identificadas y no descritas de manera satisfactoria que podrían tener gran influencia en el desarrollo de la relación simbiótica entre fabáceas y bacterias rizobiales. La obtención de datos, así como la descripción de procesos y mecanismos moleculares que intervienen en procesos simbióticos entre distintas especies, permitirá vislumbrar las implicaciones evolutivas que este tipo de interacciones tienen en el desarrollo de los organismos y la dinámica de las especies. El conocer de manera detallada la función de familias de genes sobreexpresadas de manera específica durante los procesos de simbiosis permite comparar datos que nos llevan a entender mejor el origen de estas interacciones y sus implicaciones en otros procesos evolutivos más generales

Además, la identificación de las rutas génicas y metabólicas que intervienen en el proceso de establecimiento de la relación simbiótica entre rizobios y fabáceas abre la puerta



a posibles herramientas génicas de fitomejoramiento en beneficio del planeta al promover la disminución de la fertilización artificial a partir de la generación de fenotipos vegetales hiperespecializados en la fijación de nutrientes a los suelos agrícolas.

## Antecedentes

### 5.1 Ruta de señalización simbiótica

Se ha demostrado que durante la interacción simbiótica entre *P. vulgaris* y Micorriza Arbuscular (MA) o Rizobio (RLS, *Rhizobium*-Legume Symbiosis) el organismo hospedero tiene un alto grado de control. A partir de estudios llevados a cabo en mutantes han permitido la identificación del efecto de genes puntuales durante la interacción simbiótica, estableciendo la hipótesis conceptual de Señalización Simbiótica Común (CSSP: Common Symbiosis Signaling Pathway) entre MA y RLS. La CSSP actuaría de manera posterior a la percepción de la señal inicial de ambos microorganismos, lo que conllevaría la activación de una respuesta en cada uno de los simbioses (Genre y Russo, 2016). De esta forma se puede afirmar que a pesar del diferencial morfológico generado por las distintas interacciones, el mecanismo a partir del cual se lleva a cabo la comunicación y se activan las cascadas de señalización molecular encargadas de la transducción es el mismo. Los genes sobrelapados se denominan genes *SYM* (Stougaard, 2001; Strackle, 2002). Esta ruta de señalización se estableció evolutivamente de manera conjunta a la aparición de las plantas terrestres, ya que permitía la viabilidad de la interacción simbiótica con MA, siendo el mismo mecanismo el que posteriormente sufrió adaptaciones que permitieron el establecimiento de la simbiosis con rizobios (Duc et al., 1989; Markmann y Parniske, 2009; Oldroyd, 2013). Se han logrado identificar al menos diez proteínas esenciales tanto para simbiosis MA como para *Rhizobium* (HMGR1, NUP85, 133, NENA, CASTOR, POLLUX, MCA8, CCaMK y CYCLOPS) (Genre y Russo, 2016).

SYMRK es una quinasa tipo receptor con dominios de lelectina localizado en la membrana celular interactuando con otros receptores como NFR1 y NFR5. NUP85, NUP113

y NENA se localizan en el complejo de poro nuclear y son esenciales de CSSP, aunque se desconoce su función en la transducción de señales y la interacción con componentes dentro de este proceso. MCA8 se localiza en el nucleoplasma funcionando como bomba de  $\text{Ca}_2^+$  al activarse con ATP. DMI1, CASTOR y POLLUX son canales de iones encargados de incrementar la concentración de  $\text{Ca}_2^+$  en la región nuclear y perinuclear (Capoen et al., 2011; Kim et al., 2019). Señales de  $\text{Ca}_2^+$  son las responsables de activar a la quinasa nuclear CCaMK la cual fosforila a la proteína CYCLOPS, la cual es un regulador transcripcional que da inicio a la señalización génica producida durante la simbiosis. Se ha llevado a cabo la clonación y producción de mutantes de varios genes *SYM* para obtener datos sobre su rol dentro del proceso simbiótico (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002; Ané et al., 2004; Imaizumi-Anraku et al., 2005; Kanamori et al., 2006). Estos estudios indican que existe un set compartido de genes que se encarga de la regulación de la interacción con MA y RLS, sin embargo, algunos datos señalan que esta hipótesis puede estar equivocada (Genre y Russo, 2016), ya que a pesar de que los genes que se encuentran en esta ruta común si son compartidos, la transducción de señales que se producen no necesariamente debe ser la misma, ya que ¿Cómo puede una sola ruta discernir entre dos señales y activar dos respuestas totalmente distintas río-abajo? (Bonfante y Requena, 2011). La influencia de la intensidad de la señal de activación dentro de una proteína en la transducción de la señal puede ser un factor para considerar (Shimoda et al., 2012; Poovaiah et al., 2013), indicando la probable existencia de complejos proteicos especializados en cada una de las interacciones simbióticas.

## **5.2 Genes expresados significativamente durante nodulación**

La interacción simbiótica entre leguminosa y rizobia da comienzo con la señalización provocada por los factores de nodulación o Nod-factors (NOD) que son lipochitoooligosacáridos especializados y se encuentran en las células epidérmicas y corticales del sistema radicular. En las células epidérmicas los NF dan inicio a una depolarización de la membrana plasmática conllevando la oscilación de  $\text{Ca}_2^+$  (*calcium flux* y *calcium spiking*), promoviendo la inducción de la expresión génica de ENOD (*Early nodulin*) y modificando

la morfología de los vellos radiculares (Ehrhardt & Atkinson, 1992; Pichon et al., 1992; Ehrhardt et al., 1996; Cárdenas et al., 2000; Journet et al., 2001). Se han identificado al menos 6 genes en *Medicago truncatula* que muestran una respuesta rápida a NF (NFP, DMI1, DMI2, DMI3, NSP1 y NSP2) (Marsh et al., 2007). La identificación inicial se atribuye a los genes NFP en *M. truncatula* y a NFR1/NFR5 en *Lotus japonicus*, siendo quinasas tipo receptor con dominios LysM (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003). En *P. sativum* y *M. truncatula* se han localizado los genes ortólogos de *LjNFR5*, siendo *PsSYM10* y *MtNFP* respectivamente. En *M. truncatula* se ha logrado identificar a dos genes de quinasas tipo receptor que codifican dominios LysM, MtLYK3 y MtLYK4, mostrando una alta similitud con *LjNFR1*. Los genes MtDMI1, PsSYM8 y MtDMI2 (ortólogos: *PsSYM19*, *LjSYMRK*, *MsNORK*) permiten el ‘calcium spike’ y mantienen el ‘calcium flux’ (Oldroyd y Downie, 2004). La importancia fundamental de esta señalización de calcio ha sido demostrada en el proceso de transducción de señales producidas por NOD, activando cambios transcripcionales como respuesta a señales simbióticas (Wais et al., 2000; Walker et al., 2000; Miwa et al., 2006).

## **Métodos y materiales**

### **6.1 Análisis del promotor de *PvCRK12***

Se realizó la búsqueda de la secuencia *PvCRK12* dentro del genoma de *Phaseolus vulgaris* v2.1 en la base de datos Phytozome v12.1. (longitud: 2716 pb, CDS:1242 pb) Posteriormente se seleccionaron 1,500 pb río arriba a partir del codón de inicio del gen considerándola como el promotor putativo del gen *CRK12*. A partir de la secuencia del promotor se realizó un análisis bioinformático de esta para lograr caracterizar sus elementos regulatorios e identificar los probables sitios de unión para TF.

### **6.2 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para análisis de promotor, sobreexpresión (OX) y localización (LOC)**

Considerando los análisis bioinformáticos y moleculares anteriormente mencionados se tomó la secuencia de *PvCRK12* obtenida del software Phytozome v12.1 para diseñar los oligonucleótidos necesarios para el análisis del promotor y la sobreexpresión del gen.

Los oligonucleótidos correspondientes al promotor fueron diseñados a partir de un fragmento de 1,500 pb río arriba a partir del codón de inicio de la secuencia del gen (ATG), de esa forma se aseguró contener la caja TATA y el origen de transcripción del promotor putativo. Se obtuvieron oligonucleótidos forward (FWD) y reverse (REV) (Tabla), los cuales generaban un amplicón de 1065 pb. Se integró la secuencia CACC al oligo derecho con la finalidad de tener la capacidad de direccionar la inserción del promotor amplificado dentro del vector de entrada pENTR/D-TOPO. Se determinó la utilización de secuencias homólogas para el diseño de los oligonucleótidos para los análisis de localización y sobreexpresión, teniendo una cobertura total del gen y se determinó una secuencia de inicio que abarcara el origen de replicación (oligo derecho).

Para asegurar la funcionalidad, las secuencias diseñadas se evaluaron los parámetros de compatibilidad de temperaturas, los porcentajes de densidad de GC y la probabilidad de dimerización y generación de bucles de orquilla, la evaluación de los parámetros se llevó a cabo con el software OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (Kibbe, 2007).

	FWD	REV	Amplicón
Promotor	CACC GAC AAA TGT GAG ACA GGC C	CAC ACG GAT CAC AGA AAC CAT G	1065 pb
LOC	CACC GGA GAA GGT GGT TTT GGA GC	CTC GTA TCG TTC AGA CCA AC	1242 pb
OX	CACC GGA GAA GGT GGT TTT GGA GC	CTC GTA TCG TTC AGA CCA AC	1242 pb

**Tabla 1.** Diseño de oligonucleótidos. Tamaño de los amplicones esperados para las secuencias diseñadas como oligonucleótidos para los análisis de promotor, sobreexpresión y localización del gen *PvCRK12* de *P. vulgaris*.

AAACAATGTTTTCTGTGATCCGTCTGAAATTGATCTCAATTCTTATGTTCTACTTACTTGGCACCTTAACGTTTTACCGACTGAAACAG  
 CCTCAACTTTTCAGGCATATGATTGCACAAACAAGGCAAAGTTTAGTCCCAAAGCAGTTACCAATTCACCTGAATAAACTCTTATCT  
 AAACCTACATCCAAAATTAACATCACCAACTACTACAACACCACAGTGAGTGGAAACAAACAAACGAGACATTGTCTATGGCCTCTTCAT  
 GTGCAATGGATATATGGAGAAATGTGGAGAATGTGTAAGTACTTCCATACAGACACTTAAATCAAAGTGTGTCTTCAACAAAGAGGCTA  
 TAATTTGGACTCATGAATGCCTGGTTCGCTACTCAGACAAGTTTTTCCCAACACTCCTGAGAAATGGCCATCTAGGTGTGTTAGGAAG  
 AGTGAGGATTATGAGGGAGAATTGGATAGTTTCAACAAAGTCTGAGTTCCTTGATGGACGATCTTCTGACTGAAGCCAATGAAGCTCC  
 AATGGATTCTATTAATTTGCTGTGAAGAAAATAACCATCTCTGAGGACCAGCACCTTTTTGGCTTTGCTCAGTGCACCCCATACCTCT  
 CCAAGGAAAATTGCAAGAAGTGCCTTAGGGATGCCATGAATTTTCTCAAACATGTGCAAGAGGCAAGACAGGAGGAAGATTATATAT  
 CCGAGCTGTATTGTTAGATATGATCATTATCTATTTTTCCCACTCCTAGAGGAAAAAGAAAGAATCTGGGAGTAATTGCATCAATCAT  
 ATTTTTTCATGCCCTTGTCCAGTCATTGTTTTGTTTTGTTTGTCTATTGCTACACAGGGAGTCAAGGAAGGATCTCAAGCACCAGAA  
 AGGGAAATTGTGGGGAAGAGATTTCAACAGAATTGAACCTTTGCAATTTGAATTGAGAACTATTCAAGAAGCAACAAACAAGTTTTCT  
 GATGATAACAAGATAGGAGAAGGTGGTTTTGGAGCAGTTTACAAGGGTGGTTTTCTCAAATGGACTTGAAATAGCCGTAAGAGGCTAAA  
 GAAAAATCCAGTCAAGGAGCTATAGAATTCAAGAAAGAGGTTTTGCTGATTTCCAAACTTCAACACAGAAATCTTGTGAGACTGTTAG  
 GATTTTGTGTGAAAGGAATGAGAAGATACTCATTATGAGTTTTGTGCACAACAAAAGCCTTGATTACTACCTGTCCCTCAAAATCATAG  
 GAAATTAAGTTGGTCTGAACGATACGAGATTATAAAAGGAATTGCACGAGGAATTCTCTATCTCCATGAAGATTCTCATCTTAATATTA  
 TACATTGTGATCTTAAACCTAGTAACATTTTGTAGACAACAAAATGAATGCAAAGATATTAGATTTGGACTAGCAAGGATTATTTCC  
 ATTGATCAAATGCAAGGAAACACTAGTATAATTTCCGGAACATAGCTTGGAAAGAGTGAAGGAAAATGAAGTATTTGAATTGTTGGAT  
 CCCTCATTACAACACTCCTTCTCTGAAACAGAAATCATTAAAGTGTGTAATAAATTTGGTTTATTATGTGTGCAAGGAAACCCAGATCAGAG  
 ACCTATCATGGCAAAAATGCTTTGTATTTTAGCTGTGAGCAAGTTGAGATGTTGCCTTCCCTCAAGAACCAGCATTTTTCAATCGTG  
 GAAAAATAGAAACCAAAGATGTATAACAAGGAATTAGA

**Figura 1.** Localización de los oligonucleótidos de OX/LOCEL oligo derecho se localiza dentro de la región CDS, el izquierdo dentro de la región UTR 5'. Para los oligos de localización y sobreexpresión (OX/LOC) se utilizaron los mismos oligos, los cuales se localizan colindando la región CDS de la secuencia del gen, el derecho contiene la secuencia correspondiente al codón de inicio (ATG).

### 6.3 Aislamiento de ADN genómico de *P. vulgaris*

Para llevar a cabo el aislamiento genómico se eligió el tejido radicular de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, se procedió a realizar un enjuague con duración de un minuto dentro de alcohol (etanol) absoluto, posteriormente se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito al 10%, seguida de enjuagues abundantes con agua potable. Se colocaron para su germinación en cajas Petri de cristal durante 72 horas, mismas que contenían papel humedecido con agua estéril e incubadas a 28°C. Se recolectaron 100 mg del sistema radicular de las semillas geminadas llevándose a cabo la extracción de ADN siguiendo el protocolo comercial DNAeasy Plant Mini Kit de Qiagen. La cuantificación de concentración

y verificación de calidad del material genético obtenido fue evaluada en NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

La clonación del material genético obtenido se llevó a cabo con una reacción PCR, la separación de los productos se realizó a partir de un proceso de electroforesis en gel de agarosa en donde se seleccionan los fragmentos requeridos en base a su peso molecular y se recortan para su posterior purificación y elución con el kit comercial de Extracción de Gel ThermoScientific Genejet siguiendo el protocolo señalado por el proveedor.

#### **6.4 Clonación de fragmentos en vector pENTR/D-TOPO**

El producto de PCR obtenido se sometió a una reacción de *blunting* utilizando la enzima contenida en el kit CloneJET PCR Cloning Kit, esto se lleva a cabo considerando que el vector pENTR/D-TOPO (Figura) requiere forzosamente de insertos con finales romos. Durante el proceso se utilizaron 5 µl del producto génico, 5.46 µl del buffer de reacción 2X y 0.9 µl de enzima Blunting. Dicha reacción fue incubada a 70°C durante 10 minutos para ser transferido posteriormente a hielo. El producto con los extremos romo fue utilizado en la reacción de clonación para pENTR/D-TOP, agregando 4.5 µl del producto, 1 µl de solución salina y 0.5 µl del vector pENTR/D-TOPO a un tubo para PCR. Dicha reacción fue incubada por un mínimo de 4 horas.

#### **6.5 Transformación a *E. coli* TOP10**

Para la transformación en *E. coli* se descongelaron células competentes (*E. coli* TOP10) sobre hielo; se agregaron 5 µl de la reacción proveniente del vector a 50 µl de células, sometándose a transformación mediante el método de heat shock (Froger y Hall, 2007). Se cultivaron 50 µl y 100 µl de las células en cajas de medio nutritivo LB sólido con selección para kanamicina 50 µg/ml a una temperatura de 37° durante la noche. Posterior a 24 horas se seleccionaron 10 colonias de forma aleatoria para realizar PCR de colonia. El cultivo se sometió a incubación a 37°C. Se seleccionaron las dos colonias con mayor peso molecular

de sus amplicones para ser cultivadas en medio LB líquido con un antibiótico de selección, se incubó durante la noche. Posteriormente se realizó el aislamiento del plásmido de las muestras recolectadas de ambos cultivos a partir del kit GenElute Plasmid Miniprep siguiendo el protocolo del fabricante. El producto obtenido se sometió a amplificación por PCR utilizando los oligos M13 y la polimerasa Platinum™ Pfx™ DNA Polymerase, se evalúan los resultados mediante un gel de electroforesis.

### **6.6 Clonación del fragmento en vector final pBGWFS7.0 para análisis de promotor**

Se llevó a cabo la reacción de LR clonasa entre el fragmento aislado con los oligonucleótidos M13 y el vector final/destino, el cual variaba según el clon de entrada. Para el promotor se empleó el vector pBGWFS7.0. el cual contiene el gen reportero de la betaglucoronidasa GUS para la identificación visual la expresión espacio temporal del promotor.

### **6.7 Clonación de fragmento en vector final pH7WG2D.1 para análisis de sobreexpresión**

El vector final de sobreexpresión pH7WG2D.1 (figura) se emplea para llevar a cabo la fusión del fragmento con el gen reportero *Green Fluorescence Protein (GFP)* y un promotor *CaMV 35S*, además de contar con un gen de resistencia a espectinomicina (Spec100).

La reacción LR se realizó siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Posteriormente se utilizaron 5 µl de la reacción LR obtenida para generar la transformación de células competentes de *E.coli* TOP10 mediante el método de heat shock. Se cultivaron 50 µl y 100 µl de las células en cajas Petri con medio nutritivo LB sólido agregando el factor de correspondiente, se incubaron a 37° durante la noche. Se realizó la selección de 10 colonias

para realizar amplificación por PCR de colonia, el producto se corrió en gel de electroforesis para su evaluación. De los cultivos obtenidos se llevó a cabo la selección de las dos colonias que mostraran una mayor amplificación para su cultivo en medio nutritivo LB líquido con su antibiótico selectivo correspondiente a una temperatura 37°C en agitación durante toda la noche.

Del mismo modo se aisló el ADN plasmídico y se corrió un PCR para verificar la presencia del fragmento, este se realizó con los oligonucleótidos específicos para el fragmento y GoTaq® DNA Polimerase. El producto se evaluó en gel de electroforesis a una concentración de 1% para promotor y OX/LOC.

### **6.8 Transformación de *A. rhizogenes* con el vector final**

Por medio de electroporación se realizó la transformación del material genético plasmídico a células de *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599. Para dicho procedimiento se agregaron 4 µl del producto miniprep de la construcción requerida a 50 µl de células electrocompetentes, posteriormente se incubaron en hielo por 30 minutos. El producto se traslada a una cubeta de 1ml de BioRad y se somete a electroporación a 1.8 kV, 25 µF, 200 Ω. Se agregaron 500 µl de medio nutritivo LB a la cubeta recuperando el total con una micropipeta para ser trasladado a un tubo de 1.5 ml e incubarse a una temperatura 28°C por 2 horas.

Del cultivo generado se extrajeron 100 y 150 µl para cultivar en medio LB con agregación del antibiótico selectivo correspondiente, incubándose a una temperatura de 28°C durante dos días. Posteriormente se realizó amplificación por PCR de la colonia con GoTaq MasterMix, las colonias que produjeron amplicones fueron cultivadas en medio nutritivo LB líquido. Del cultivo final obtenido se generaron alícuotas en glicerol para la realización de una reacción de miniprep y su almacenamiento a una temperatura de -80°C. Se realizó una amplificación por PCR para la evaluación final del producto obtenido de la reacción.



## **6.9 Generación de raíces transgénicas en semillas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa.**

### 6.9.1 Esterilización de las semillas

Se procedió a esterilizar 80 semillas; correspondiendo 40 para la prueba de sobreexpresión de *PvCRK12* y 40 para el grupo control (inoculado con el vector vacío). La esterilización se llevó a cabo según el protocolo siguiente (Nanjareddy et al., 2017):

1. Sumergir en etanol a una concentración de 96% durante 1 minuto, desechar el etanol.
2. *Dentro de una campana de flujo laminar.* Agregar las semillas a una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 20% en H<sup>2</sup>O (para eliminar cualquier microorganismo indeseado de la superficie de las semillas). Sumergir durante 10 minutos, mezclando de manera constante.
3. Lavar con exceso de agua esterilizada. Repetir 3 veces.

### 6.9.2 Germinación de las semillas

Para la germinación de las semillas se seleccionaron las semillas que permanecían en buen estado y (dentro de una campana de flujo laminar) se colocaron en cajas Petri de vidrio de 15 cm de diámetro cubiertas por papel absorbente estéril humedecido al máximo con agua estéril. El recipiente se cubrió con papel aluminio y se colocó en oscuridad a 28°C durante 3 días.

### 6.9.3 Inducción de raíces pilosas en plántulas de frijol

A partir de la alícuota generada de las células transformadas de *A. rhizogenes* (para cada construcción: LOC, OX y Promotor) se tomaron 200 µl de esta y se plaquearon sobre cajas Petri con medio nutritivo LB sólido con su respectivo antibiótico selectivo y se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 28°C. Para el sistema hidropónico de crecimiento de las plántulas de frijol se colocaron 15ml de agua en un tubo de ensayo grande Pyrex, además de agregar a un tubo de centrifuga solución B&D hasta alcanzar su máxima capacidad. La boca del tubo de 15 ml se cubrió con papel aluminio y se hicieron dos agujeros sobre su superficie: uno de alrededor de 4 mm y otro de 2.5 mm. El tubo de 15 ml se colocó

dentro del tubo Pyrex que contiene agua, posteriormente se cubrió con una tapa de plástico. Se esterilizó todo el sistema por autoclave.

Del cultivo de bacterias transformadas se obtuvo un raspado que fue colocado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se resuspendió en agua estéril. Una vez que creció la bacteria transformada, se raspó sin tomar el medio y se colocó dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se resuspendió en agua estéril hasta alcanzar una solución ligeramente viscosa. Se realizó la inyección de la solución de cultivo en el hipocotilo de las plántulas germinadas. Una vez inyectada, se colocó la plántula en el orificio de 4mm del tubo del sistema y se cultivaron a una temperatura de 28° C., asegurando mantener la humedad requerida dentro del sistema hidropónico a partir de su aislamiento adecuado. Cuando el desarrollo de la planta sobrepasa la longitud del tubo Pyrex, se retira la tapa plástica y se coloca Parafilm como barrera aislante de humedad.

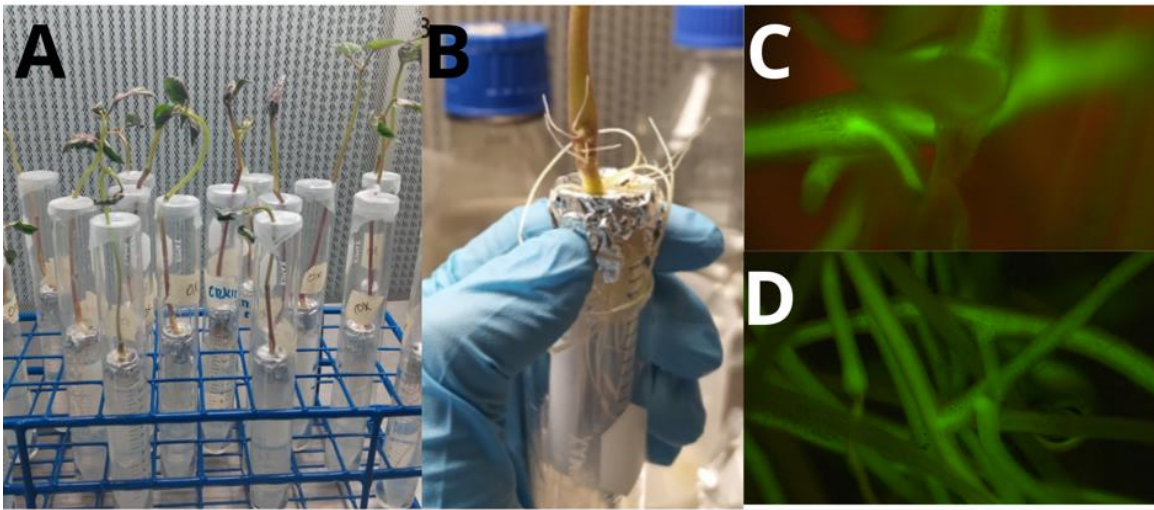
#### **6. 10 Inoculación de plantas con *Rhizobium tropici* y análisis de expresión espacio-temporal**

La inoculación de *R. tropici* se llevó a cabo en las raíces pilosas (hairy roots) transgénicas dos semanas después de la inyección con *A. rhizogenes* de la siguiente forma:

1. 48 horas previas a la inoculación se cultivaron las colonias de *Rhizobium* específicas necesarias para esta. Se utilizaron las cepas para tinción de GUS en plantas de OX y LOC, y la cepa con fluorescencia RFP y GUS para el promotor. (Se agregan las recetas específicas para cada parte del procedimiento en la sección de anexos).
2. Las raíces analizadas se seleccionaron considerando los niveles de fluorescencia observados en microscopio estereoscópico. Se procedió a cortar las raíces naturales y aquellas no transgénicas (que no presentaron fluorescencia), trasplantando la planta completa a recipientes con una capacidad de 250 ml. La composición correspondía a una proporción de 1:1 vermiculita/peatmoss para el análisis de OX y LOC, y de arena

fin a en el caso del promotor. Se dejaron incubar en cámara de crecimiento por 48 horas a una temperatura de 28°C.

3. Posterior a la incubación, se agregaron 4 ml del medio desarrollado de *A. Rhizogenes* para inocular cada una de las plantas, agregándolo lo más cercano posible al tallo
4. Se estableció un periodo de riego de 72 horas, correspondiendo la cantidad de agua a la requerida por la etapa de desarrollo de la planta



**Figura 2.** Cultivo in vitro para la generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris*. A) inyección de *A. rhizogenes* K599 con vector de sobreexpresión *PvCRK12* en raíces de *P. vulgaris*. B) Emergencia de raíces pilosas a los 14 días post inyección. C) Raíz pilosa transformada fluorescente (GFP) de plantas control. D) Raíz pilosa transformada fluorescente (GFP) de plantas con vector de sobreexpresión *PvCRK12*.

### 6.11 Ensayo de tinción GUS:X-gluc

Las plantas seleccionadas y tratadas para el estudio de promotor y aquellas que fueron inoculadas con *Rhizobium* GUS se retiraron y se enjuagaron con abundante agua para retirar la totalidad del sustrato. Se verificó la presencia del gen deseado en microscopia bajo fluorescencia, seleccionando únicamente las raíces que mostraban el marcador. De estas se tomaron segmentos de 2cm de largo y se colocaron en tubos negros de microcentrifuga de 1.5 mL con buffer GUS:X-gluc. Se colocaron en incubación a una temperatura de 37 °C por un periodo de 16 hrs. Posteriormente se enjuagaron con agua desionizada tres veces y se

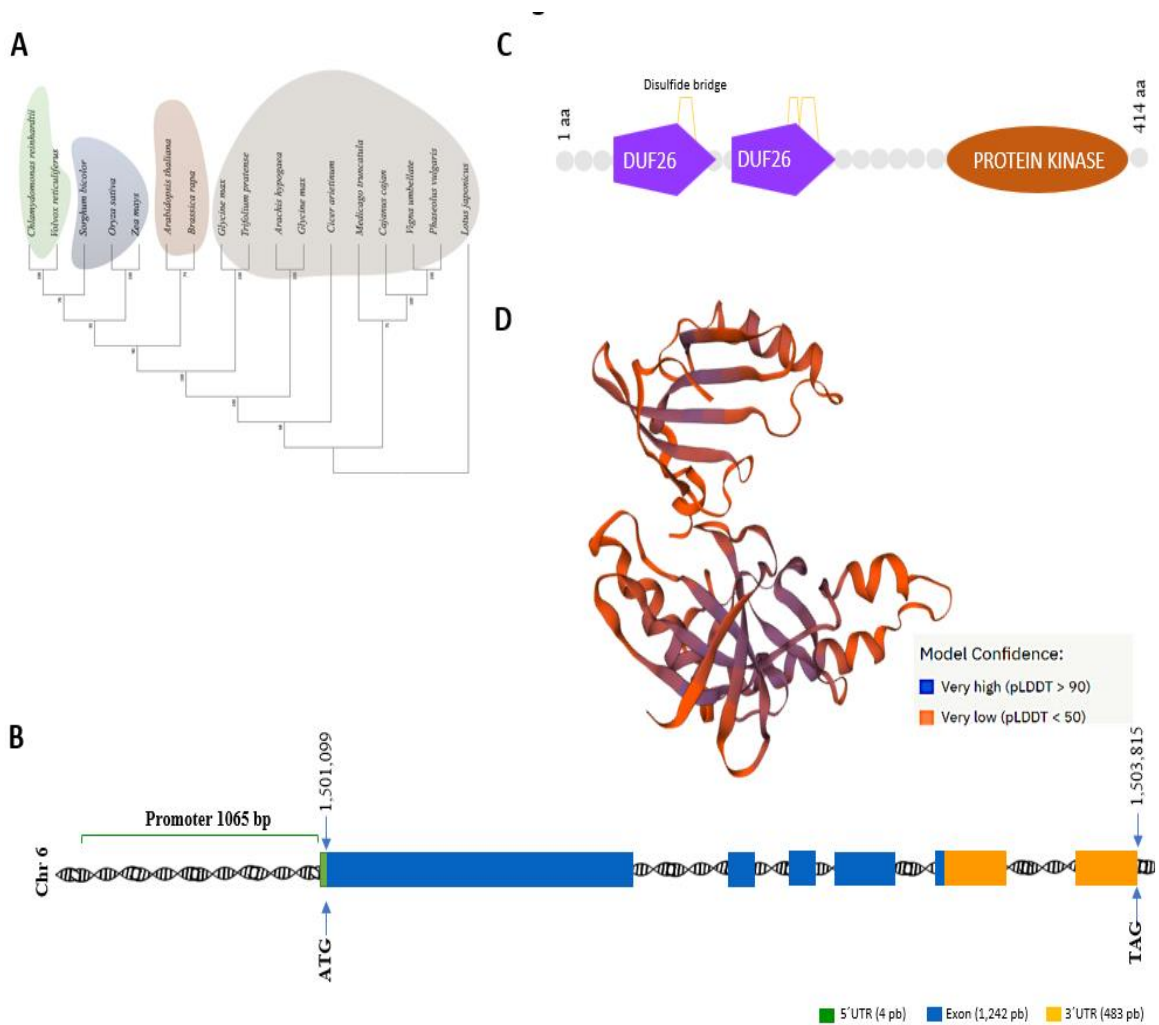
sumergieron en una solución de cloro 2% por 1 hr para clarificar, se realizó un último enjuague previo al análisis.

### **6.12 Análisis de expresión y patrones de colonización**

Para esto se colocaron muestras en portaobjetos de puente para facilitar la visualización de raíces, las muestras de tejido radicular fueron colocadas junto con agua hasta cubrir su superficie. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio Leica DM5000 B bajo campo brillante y bajo fluorescencia para RFP para las muestras inoculadas con *Rhizobium* RFP, y en el estereoscópico Leica MZ10 F bajo luz blanca y fluorescencia para RFP. Las imágenes obtenidas se muestran a continuación.

## **Resultados**

La secuencia del gen *CRK12* de *Phaseolus* fue identificada en la base de datos Phytozome.13 para estudios de estructura génica. El gen *CRK12* se encuentra en el cromosoma 6, y su estructura génica reveló 5 exones y 4 intrones en la región CDS y un intrón en el 3' UTR. La longitud del transcrito maduro fue de 1729 pb, el CDS fue de 1242 pb, el 5' UTR fue de 4 pb, y el 3' UTR fue de 483 pb (Figura 3B). El gen *CRK12* codifica 413 aminoácidos con 2 dominios DUF26 compuestos por 2 alfa-hélices y una hoja beta de cinco hebras, que forman una arquitectura de dominio único compacto con un plegamiento alfa + beta. El dominio DUF26 contiene un motivo C-X<sub>8</sub>-C-X<sub>2</sub>-C, y su estructura, predicha por la herramienta ExPASy PROSITE, muestra que los residuos de cisteína forman tres puentes disulfuro intramoleculares: C1-C5, C2-C3 y C4-C6.

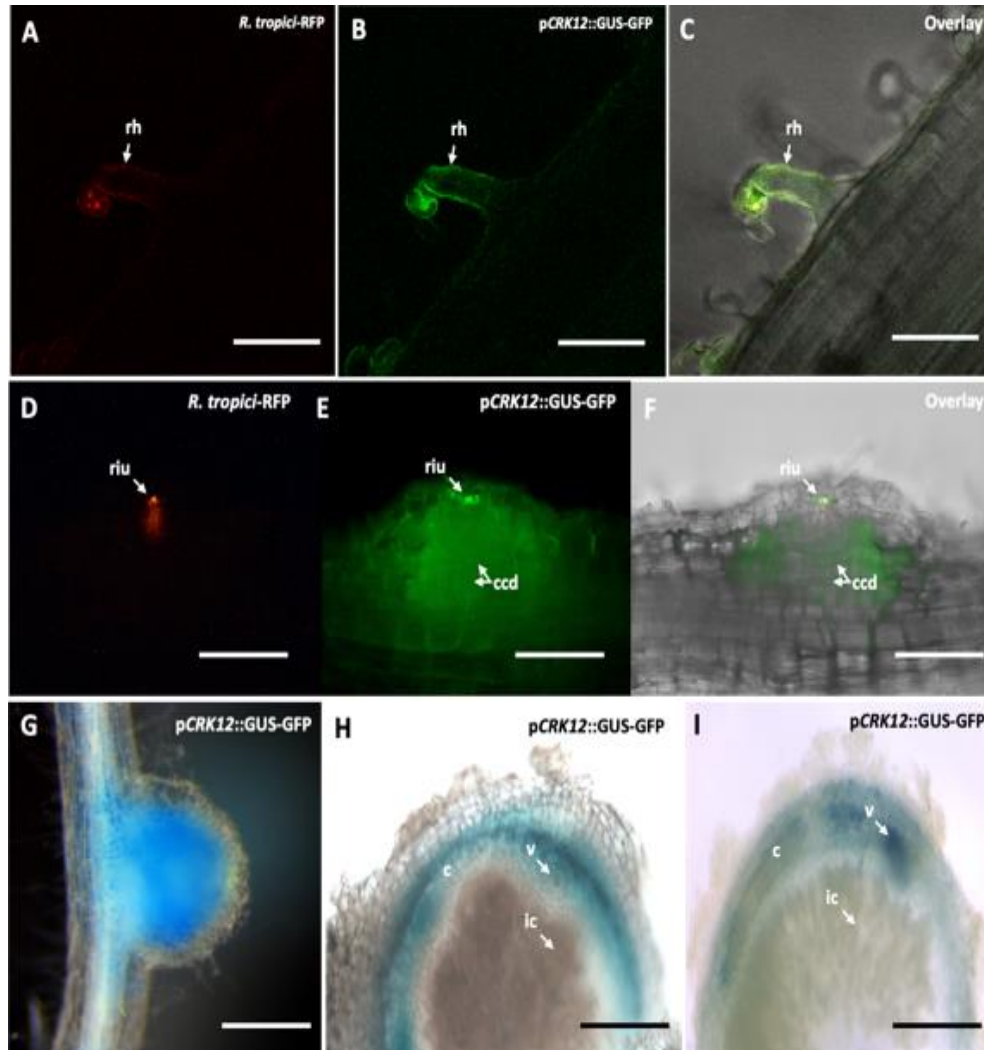


**Figura 3.** Estructura del gen *CRK12* de *Phaseolus*. (A) La estructura del gen se obtuvo de la base de datos del genoma de *Phaseolus vulgaris* v2.1 en Phytozome. (B) La estructura del dominio se determinó según la herramienta en línea ExPASy PROSITE. (C) Alineación de la estructura tridimensional (3D) de la proteína *CRK12* construida por un servidor de modelado de homología. Los datos mostrados provienen de tres repeticiones biológicas (n > 9).

## 7.1 Análisis de la expresión espaciotemporal del promotor y localización subcelular de la proteína CRK12

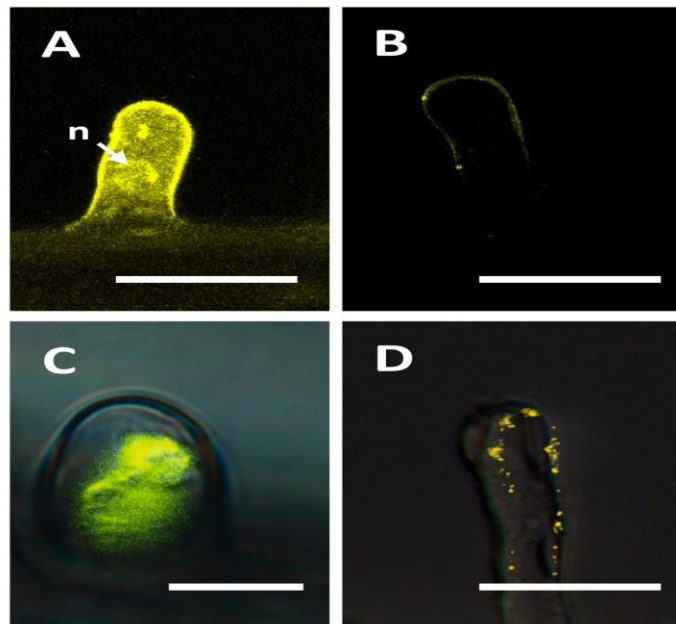
Para demostrar la actividad del promotor *CRK12* en condiciones de simbiosis con *R. tropici* en las raíces de *P. vulgaris*, identificamos y aislamos la secuencia 1044 pb aguas arriba del codón de inicio de *CRK12*. Este fragmento de promotor aislado se clonó y se ligó para impulsar la expresión de dos reporteros, GUS y GFP, dentro del vector pBGWFS7.0. El vector binario resultante pBGWFS7.0/*pCRK12*::GUS-GFP se transformó en la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes*, que a su vez se utilizó para generar raíces peludas transgénicas en *P. vulgaris*. Observamos que las raíces transgénicas a los 3 días después de la inoculación (dpi) con *R. tropici* (cepa CIAT899-RFP) mostraron expresión de GFP impulsada por *CRK12* en el sitio de la infección de las células de los pelos radicales (Figura 4A-C). No se observó tal expresión de GFP en las células de los pelos radicales de las raíces transgénicas no inoculadas. La expresión de GFP se intensificó durante la formación de primordios de nódulo específicamente en el sitio de la infección de *Rhizobium* y en las células corticales divididas del nódulo (Figura 4 D-F).

Las secciones mostraron que *CRK12* fue más activo en las células corticales internas y en la vasculatura de los nódulos maduros de 21 días (Figura 4H). Al comienzo de la senescencia del nódulo (28 días), la actividad de GUS disminuyó en los nódulos (Figura 4I). En conjunto, nuestros resultados mostraron que en las etapas tempranas del desarrollo del nódulo, el promotor de *CRK12* estaba activo en los hilos de infección, en las células corticales divididas de los primordios de nódulo. Se observó una actividad promotor de *CRK12* fuerte en los nódulos jóvenes, mientras que en los nódulos maduros, la actividad se limitó a las células corticales internas y la vasculatura de los nódulos maduros y senescentes de *P. vulgaris*.



**Figura 4.** Patrones de expresión espaciotemporal del promotor *CRK12* en raíces de *P. vulgaris*. Se inoculó *Rhizobium tropici* CIAT 899 que expresa el marcador RFP en raíces peludas transgénicas que expresan una construcción *pCRK12::GUS-GFP*, y las observaciones se registraron utilizando un microscopio de fluorescencia confocal a 3 ppp. (A) Pelo de raíz que muestra infección por *R. tropici* (marcador RFP). (B) Actividad *pCRK12* detectada como fluorescencia de GFP y (C) superposición. Imagen de una raíz transgénica a 6 ppp que muestra primordios de nódulos con (D) fluorescencia de RFP en el sitio de "riu", (E) expresión de GFP en "riu" y "ccd", y (F) superposición. Las raíces transgénicas se inocularon con *R. tropici* CIAT 899 de tipo salvaje y se evaluaron para comprender la actividad del promotor *CRK12* en el desarrollo de nódulos mediante un ensayo GUS. Imagen representativa de (G) un nódulo joven de 14 días, secciones de nódulo que muestran GUS en (H) un nódulo maduro de 21 días y (I) un nódulo senescente de 28 días. dpi, días postinoculación; rh, raíz hai; riu, unidad de infección por *Rhizobium*; ccd, división celular cortical; c, corteza; v, vasculatura; ic, célula infectada. Barras: (A–F) 20  $\mu$ m; (G) 500  $\mu$ m; y (H,I) 1 mm.

Para investigar la localización subcelular de la proteína CRK12, se utilizó un vector pEarleyGate104 para la expresión transitoria de la proteína CRK12 fusionada con la proteína fluorescente amarilla (YFP). Las imágenes de microscopía confocal de las raíces peludas de *P. vulgaris* que expresaban YFP-CRK12 mostraron que CRK12 se localizaba en la membrana plasmática de las células de los pelos radicales (Figura 5B), y las raíces peludas que expresaban YFP no fusionado se usaron como controles. Como se predijo, se observó YFP no fusionado tanto en el citoplasma como en los núcleos de las células de los pelos radicales (Figura 5A). La plasmólisis inducida por NaCl (250 mM) confirmó aún más la asociación de la fluorescencia con la membrana plasmática (Figura 5D). En contraste, la plasmólisis de los pelos radicales de control mostró que la fluorescencia de YFP permanecía en el citoplasma (Figura 5C). Al mismo tiempo, analizamos la localización subcelular utilizando una herramienta in silico. Para esto, la secuencia completa de la proteína CRK12 se sometió a la herramienta de predicción de localización subcelular de proteínas WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>). Como se anticipaba, a nivel subcelular, la proteína CRK12 se dirigió a la membrana plasmática.



**Figura 5.** Localización subcelular de *Phaseolus* CRK12. El ORF de *PvCRK12* se clonó en pEarleyGate104 para construir un YFP N-terminal, que se fusionó y transformó en raíces peludas de *P. vulgaris* para determinar la localización subcelular de la proteína. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal equipado con una cámara digital. (A) La construcción de control 35S-YFP no fusionada se localiza en el citoplasma y los

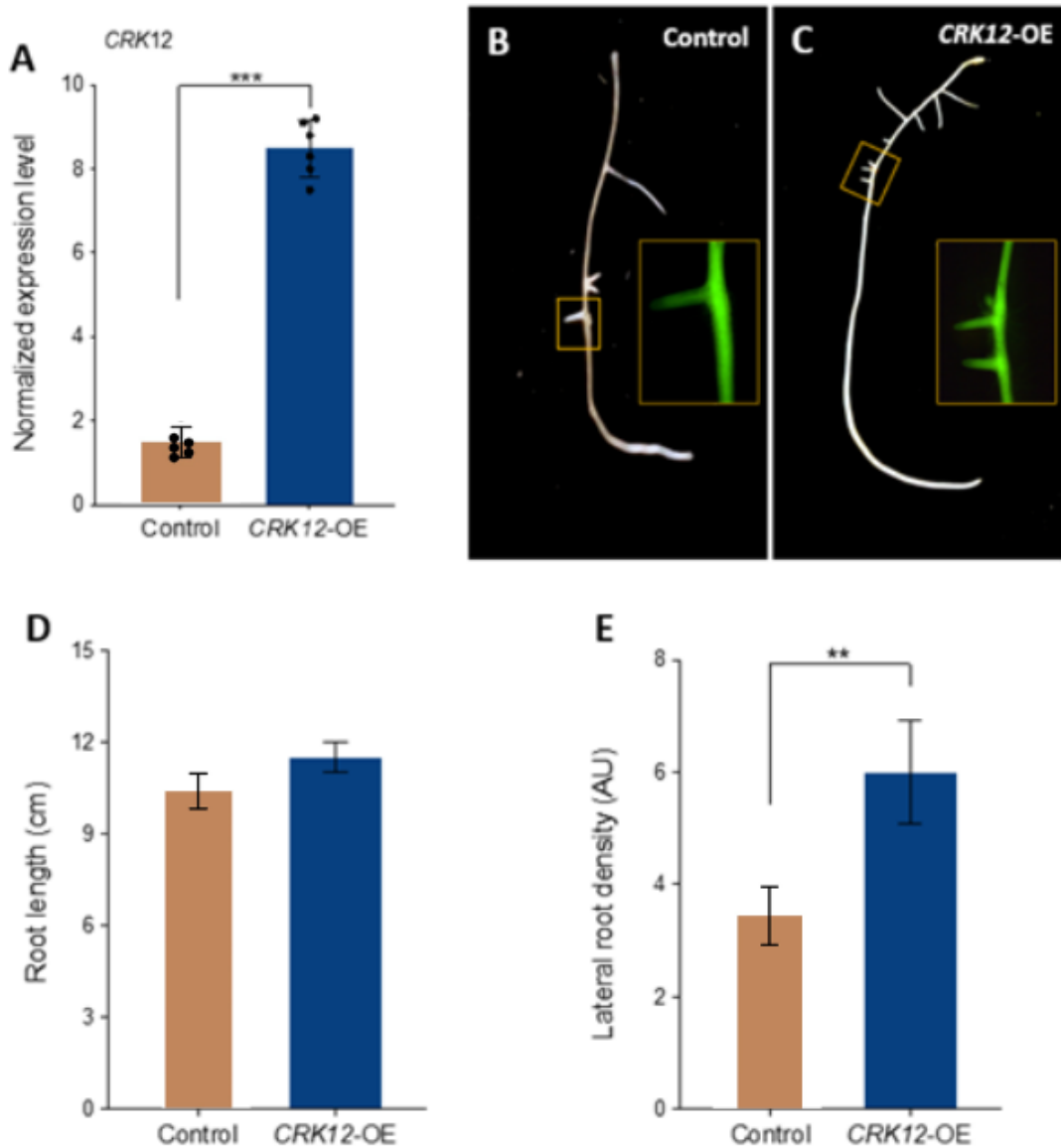


núcleos. (B) La construcción YFP-*CRK12* exhibe localización en la membrana plasmática en pelos radiculares en crecimiento. Se indujo plasmólisis en células ciliadas de raíz de *P. vulgaris* mediante tratamiento con NaCl 150 mM durante 12 minutos antes de la obtención de imágenes; (C) control y (D) YFP-*CRK12*. Barras = 10  $\mu$ m. n, núcleo.

## 7.2 *CRK12* altera la morfología de las raíces y los pelos radicales

Para investigar la función de *CRK12*, generamos raíces peludas transgénicas de *P. vulgaris* que expresaban *CRK12*-OE para observar los fenotipos de las raíces y los nódulos bajo condiciones simbióticas. La secuencia de codificación completa de *CRK12* se aisló del ADNc fresco de *P. vulgaris* y se clonó en un vector binario pK7GWIWG2D(II) y pH7WG2D.1 río abajo del promotor 35S constitutivo, respectivamente. Se utilizó *Agrobacterium rhizogenes* K599 que portaba un promotor 35S::*CRK12* (*CRK12*-OE) para generar las raíces pilosas transgénicas.

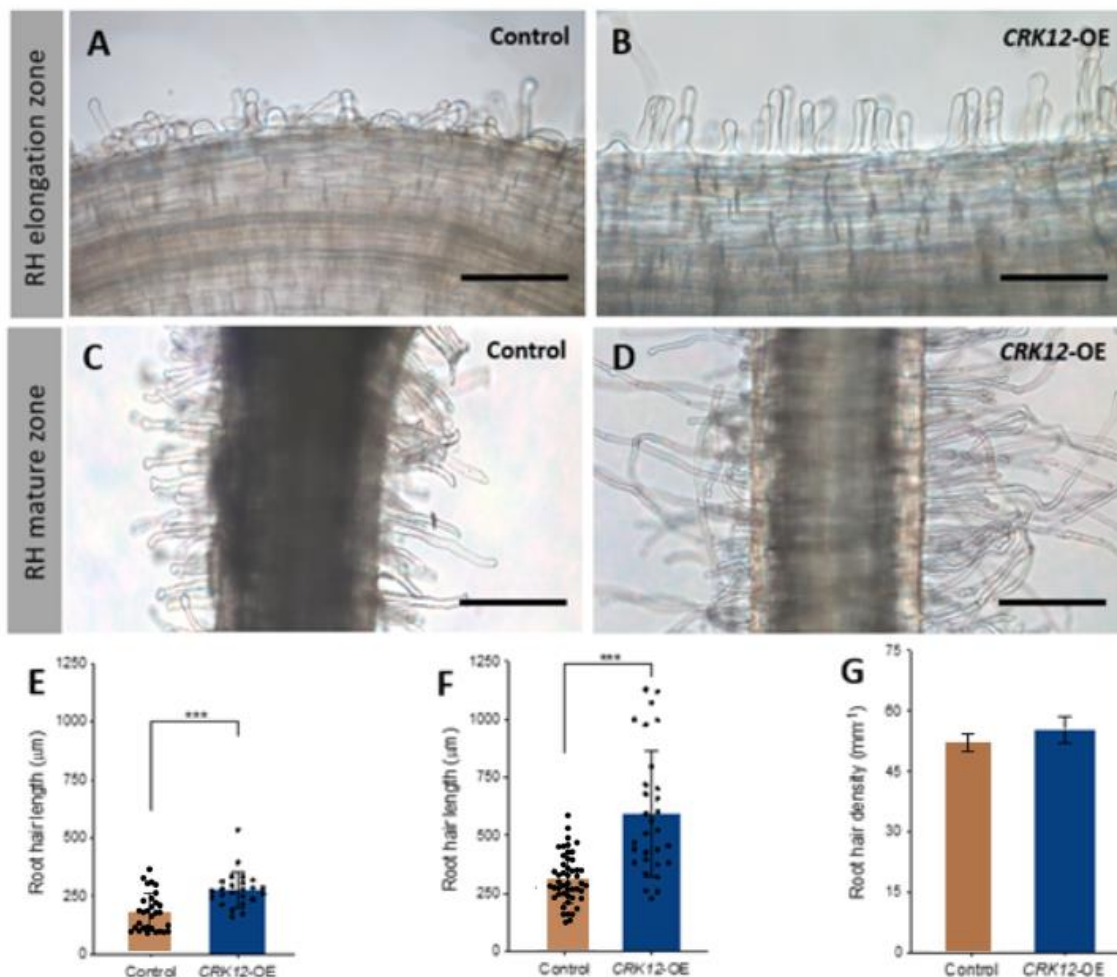
Los fenotipos de las raíces peludas transgénicas *CRK12*-OE y control se analizaron a los 7 días después de la emergencia. Se utilizó un vector pH7WG2D.1 que expresaba un marcador visible, eGFP (Figura 4C,D), para seleccionar las raíces transgénicas de control EV y las plantas transgénicas compuestas *CRK12*-OE (que tenían raíces peludas transgénicas pero brotes de tipo silvestre). La longitud de la raíz primaria había aumentado ligeramente, pero no significativamente, en las plantas *CRK12*-OE en comparación con los controles (Figura 4C-E). Sin embargo, la densidad de las raíces laterales se encontró significativamente aumentada en las plantas *CRK12*-OE en relación con los controles (Figura 4F). Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de *CRK12* aumentó el número de raíces laterales, lo que podría justificarse por la abundancia de transcritos de genes relacionados con el desarrollo de las raíces laterales en *P. vulgaris*.



**Figura 6.** Fenotipos de raíces transgénicas. (A) Fenotipos de la longitud y el número de raíces laterales de (B) control, (C) raíces peludas transgénicas CRK12-OE en una semana después de la emergencia. Las imágenes insertadas muestran la naturaleza transgénica de las raíces peludas que expresan un marcador visible, eGFP. Análisis cuantitativo de (E) longitud de la raíz primaria y (F) densidad de la raíz lateral en CRK12-OE y raíces peludas de control. Las barras de error representan las medias  $\pm$  errores estándar de las medias. Los datos mostrados se obtuvieron de tres replicaciones biológicas ( $n > 6$  para (A);  $n > 27$  para (D, E))

Luego, se analizó la morfología de los pelos radicales de las raíces transgénicas a los 10 días después de la emergencia. Las observaciones a través de la microscopía de luz revelaron un aumento en la densidad de los pelos radicales tanto en la zona de elongación de los pelos

radicales (Figura 7 A-C) como en la zona de maduración (Figura 7 D-F) de las raíces *CRK12*-OE en comparación con los controles. En las zonas de elongación y maduración de las raíces *CRK12*-OE, los pelos radicales exhibieron una variedad de longitudes, desde 279  $\mu\text{m}$  hasta 594  $\mu\text{m}$ . En comparación, el grupo de control tenía pelos radicales de 174  $\mu\text{m}$  en la zona de elongación y 307  $\mu\text{m}$  en la zona de maduración. Sin embargo, los pelos radicales eran ligeramente más densos (Figura 7 B-G) en las raíces *CRK12*-OE que en las raíces control. En conjunto, estos resultados sugirieron que la sobreexpresión de *CRK12* aumentó la longitud de los pelos radicales y la expresión de los genes reguladores de los pelos radicales.



**Figura 7.** Fenotipos de raíces transgénicas. (A) Fenotipos de la longitud y el número de raíces laterales de (B) control, (C) raíces peludas transgénicas *CRK12*-OE en una semana después de la emergencia. Las imágenes insertadas muestran la naturaleza transgénica de las raíces peludas que expresan un marcador visible, eGFP. Análisis cuantitativo de (E) longitud de la raíz primaria y (F) densidad de la raíz lateral en *CRK12*-OE y raíces

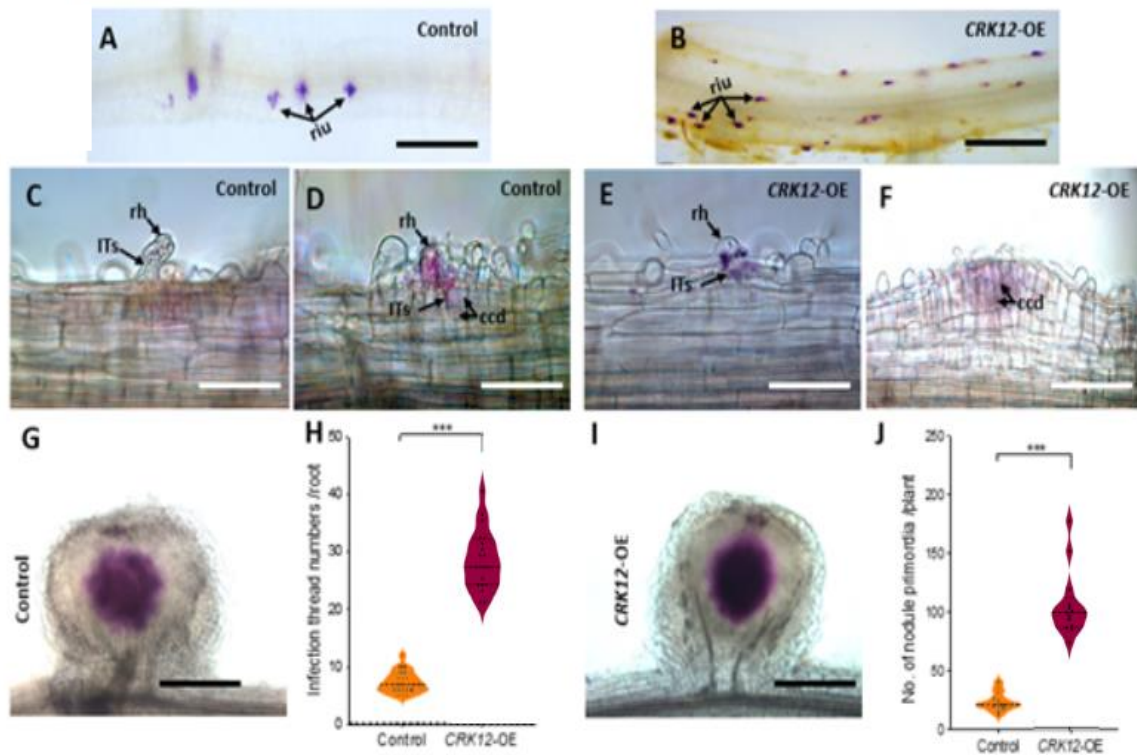
peludas de control. Las barras de error representan las medias  $\pm$  errores estándar de las medias. Los datos mostrados se obtuvieron de tres replicaciones biológicas (n > 6 para (A); n > 27 para (D, E))

### **7.3 *CRK12* regula el número de nódulos y los puntos de infección en *P. vulgaris***

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de *CRK12* en la nodulación, primero inoculamos las plantas transgénicas compuestas con *R. tropici* CIAT 899 que expresaba un reportero GUS. Periódicamente, las raíces se ensayaron para GUS y se analizaron para determinar el fenotipo de la simbiosis. Después de una semana de inoculación con CIAT 899, se reveló que la frecuencia de los eventos de infección en las raíces *CRK12*-OE fue mayor (29/planta) que en las raíces control. Las observaciones de microscopía de luz en las raíces *CRK12*-OE revelaron que el fenotipo de los procesos tempranos de desarrollo de los nódulos, como la progresión del hilo de infección de los pelos radicales y la división de las células corticales de los primordios de nódulo, eran similares a los de las raíces control (Figura 8 C-F).

Luego, se comparó el número de primordios de nódulo en las raíces *CRK12*-OE con el de las raíces control. Se observó un número significativamente mayor de primordios de nódulo (108/planta) en las raíces *CRK12*-OE que en las raíces control (24/planta) a los 10 días después de la inoculación. Todos los nódulos jóvenes de control y *CRK12*-OE se colonizaron con éxito con *rhizobium*.

En conjunto, nuestros datos indican que *CRK12* funciona durante las etapas tempranas de la formación y el desarrollo del nódulo, lo que se refleja en términos de unidades de infección de rhizobia aumentadas, números de primordios de nódulo y aumento de la expresión de genes de señalización temprana en *P. vulgaris*.

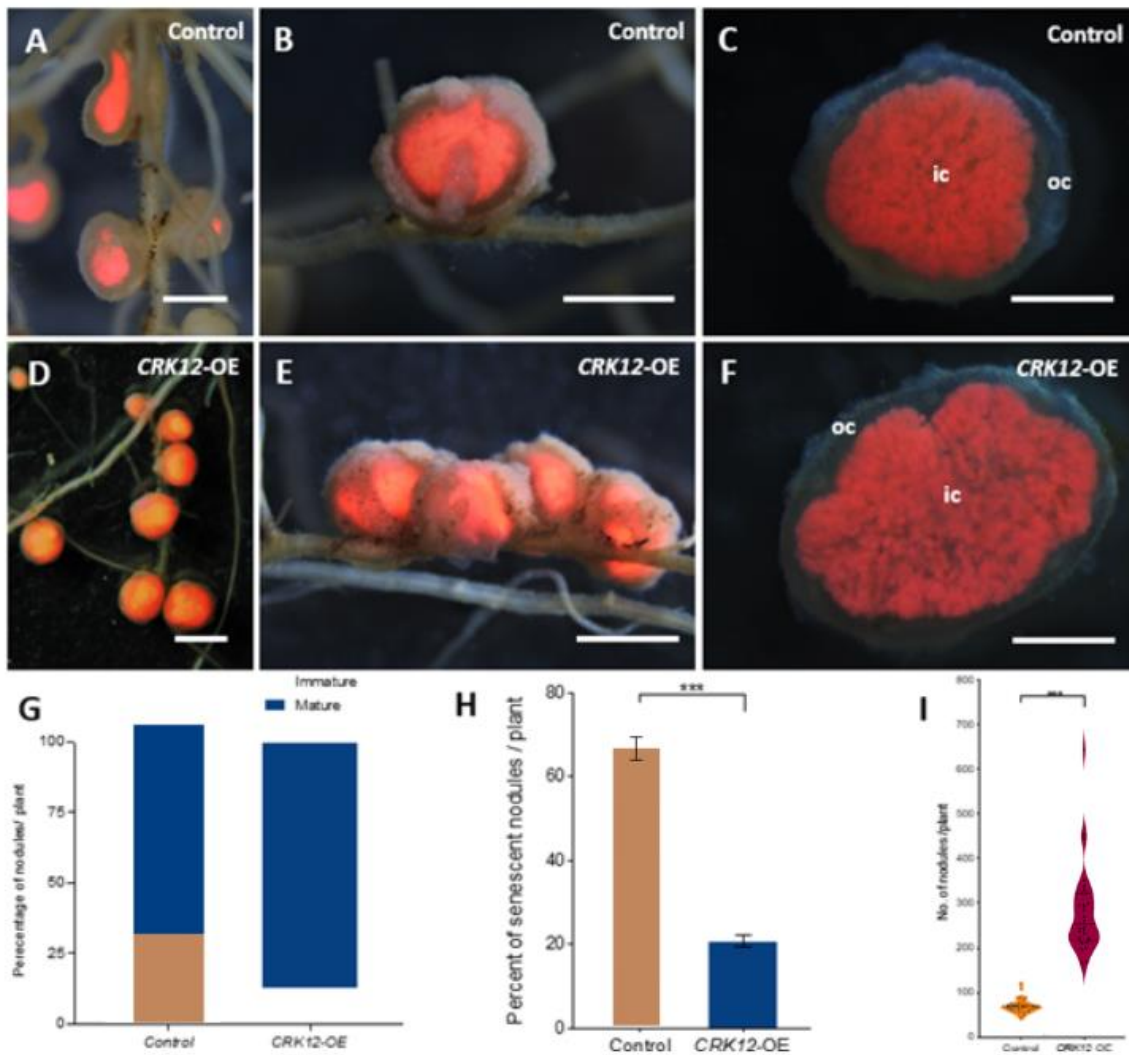


**Figura 8.** Respuesta a la infección por rizobios de raíces transgénicas *CRK12*. Las raíces transgénicas de control y *CRK12*-OE se inocularon con *Rhizobium tropici* CIAT 899 que expresa el indicador GUS y se registraron las observaciones. Raíces analizadas con GUS que muestran unidades de infección por rizobios a 7 ppp en (A) control y (B) *CRK12*-OE. Las raíces que muestran hilos de infección característicos (D – F) y células corticales en división en las raíces transgénicas de control y *CRK12*-OE. De manera similar, nódulos jóvenes teñidos con GUS en (G) control, (H) raíces transgénicas *CRK12*-OE. Los datos representados en el gráfico del violín muestran (H) el número de hilos de infección por raíz transgénica y (J) el número promedio de primordios de nódulos por planta. Las barras de error representan las medias  $\pm$  errores estándar de las medias (SEM). Los datos mostrados se obtuvieron de tres replicaciones biológicas ( $n > 30$ ). dpi, días postinoculación; riu, unidad de infección por rizobios; rh, pelo de raíz; ITs, hilo de infección; ccd, división celular cortical. Barras: (A–D) 20  $\mu$ m; (E,F) 50  $\mu$ m; y (G – I) 200  $\mu$ m.

#### 7.4 La sobreexpresión de *CRK12* resulta en hipernodulación en raíces transgénicas de *P. vulgaris*

Mientras intentábamos identificar el impacto de la regulación a la baja del transcripto *CRK12* en la simbiosis de los nódulos radicales, a los 21 días después de la inoculación encontramos que los números de nódulos permanecían críticamente bajos. Además, las raíces transgénicas

*CRK12*-OE mostraron un aumento en el número de nódulos en comparación con las raíces transgénicas de control. Además, los datos cuantitativos revelaron un número de nódulos 4 veces mayor en las raíces *CRK12*-OE que en las raíces control. El número promedio de nódulos fue de 71.7 por planta de control, y 289.3 por planta de *CRK12*-OE. Entre ellos, el 87.1 por ciento de los nódulos eran rosados y maduros a los 21 dpi en las raíces *CRK12*-OE, mientras que en el control el 69.7 por ciento de los nódulos eran rosados y el 30.3 por ciento eran blancos. La sección transversal de los nódulos maduros de control (Figura 7G-I) mostró características histológicas típicas de un nódulo determinado, como la corteza externa e interna, la vasculatura del nódulo y el núcleo del nódulo (Cermola et al. 2000).

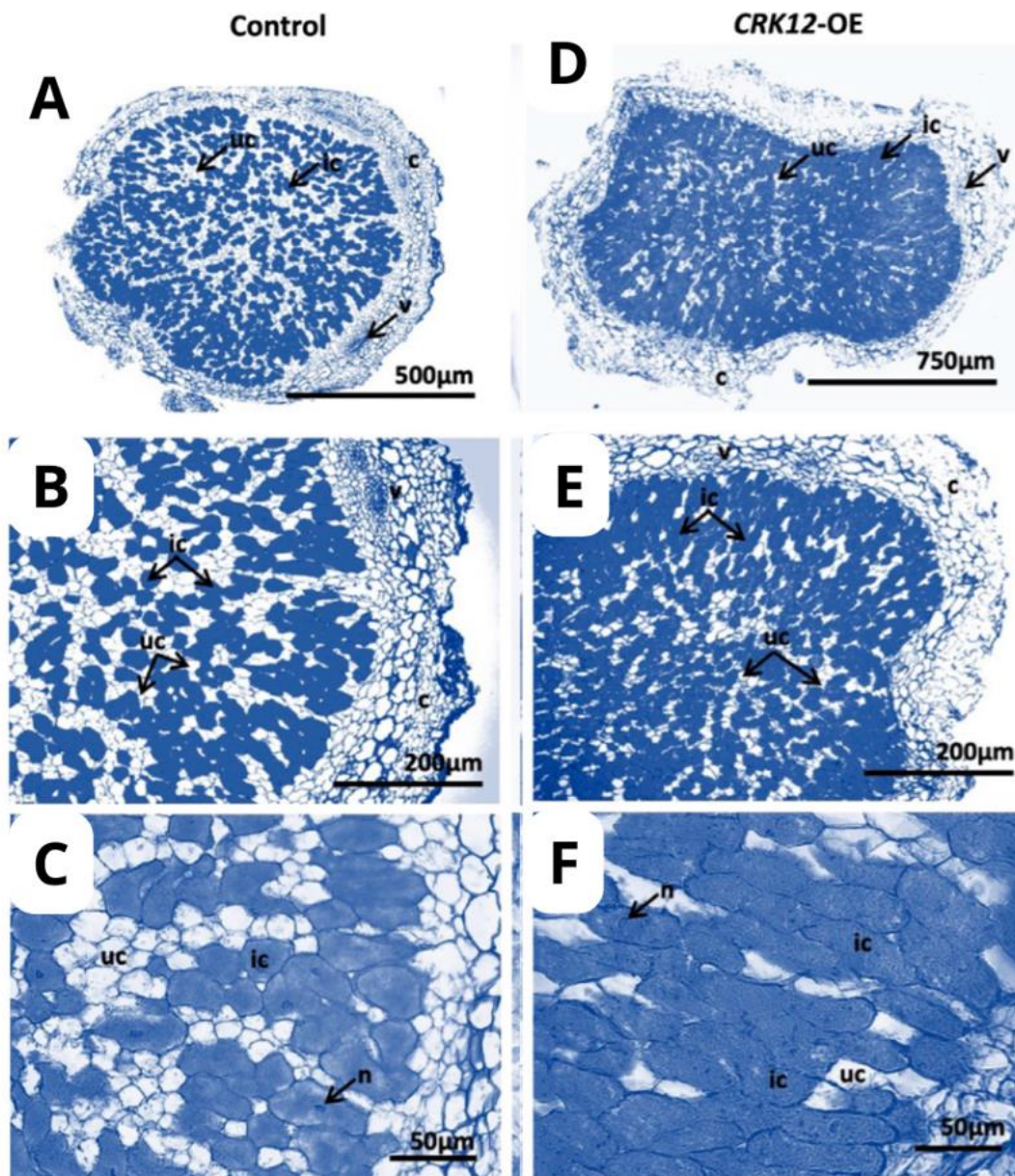


**Figura 9.** Fenotipos de raíces transgénicas. (A) Fenotipos de la longitud y el número de raíces laterales de (B) control, (C) raíces peludas transgénicas CRK12-OE en una semana después de la emergencia. Las imágenes insertadas muestran la naturaleza transgénica de las raíces peludas que expresan un marcador visible, eGFP. Análisis cuantitativo de (E) longitud de la raíz primaria y (F) densidad de la raíz lateral en CRK12-OE y raíces peludas de control. Las barras de error representan las medias  $\pm$  errores estándar de las medias. Los datos mostrados se obtuvieron de tres replicaciones biológicas ( $n > 6$  para (A);  $n > 27$  para (D, E))

El tejido del núcleo del nódulo estaba compuesto por células infectadas que albergaban *R. tropici* CIAT 899 . La histología de los nódulos maduros CRK12-OE mostraron infecciones de *rhizobium* más densas en el tejido del núcleo del nódulo y corteza externa (Figura 9 C-F). Las observaciones y la cuantificación de microscopía de luz en secciones de nódulo también mostraron un fenotipo hipernodulante, donde el número de unidades de infección (UIs) por nódulo aumentó significativamente en las raíces CRK12-OE en comparación con las raíces de control. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de CRK12 resulta en hipernodulación y mayor densidad de unidades de infección en las raíces de *P. vulgaris*.

### **7.5 El estrés oxidativo se altera en raíces de *P. vulgaris* que expresan CRK12**

Para estudiar la relación entre CRK12 y el estrés oxidativo, se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las raíces de *P. vulgaris* a través de la tinción con DAB (3,3'-diaminobenzidina). Las raíces transgénicas CRK12-OE mostraron niveles más bajos de tinción, lo que indicó una disminución en la producción de ROS en estas raíces en comparación con las raíces control. La tinción con NBT (nitro azul de tetrazolio) confirmó la producción que la producción de ROS fue significativamente menor en las raíces CRK12-OE en comparación con las raíces control. Estos resultados sugieren que CRK12 tiene un papel en la regulación de los niveles de ROS en las raíces de *P. vulgaris*.



**Figura 10.** Secciones transversales teñidas de azul de toluidina de ( A – C) control y ( D – F) *CRK12* - Nódulos OE que revelan características estructurales como se muestra en micrografías.

## Discusión

En este estudio, investigamos la función del gen *CRK12* en la formación y el desarrollo del nódulo en *P. vulgaris*. Hemos demostrado que *CRK12* está involucrado en la



regulación de la nodulación, la morfología de las raíces y los pelos radicales, la densidad de las unidades de infección y la respuesta al estrés oxidativo en *P. vulgaris*.

Los receptores de tipo quinasa similares a receptores (RLKs, por sus siglas en inglés) poseen dominios extracelulares distintos que posibilitan el reconocimiento de diversos ligandos y facilitan la transmisión de múltiples señales extracelulares, incluyendo aquellas relacionadas con la simbiosis (Considine et al. 2014). La simbiosis es iniciada por las leguminosas y los rizobios, los cuales intercambian moléculas señalizadoras como parte de un proceso de comunicación bidireccional. En respuesta a los metabolitos secundarios (flavonas o isoflavonas) liberados por el huésped, los rizobios generan y liberan factores de nodulación, también conocidos como lipoquitoligosacáridos (LCOs) (Cai, et al. 2018). Estos LCOs son detectados por los receptores de membrana tipo LysM, tales como NFR1, NFR5 y NFRc en *Lotus japonicus*. Entre ellos, tanto NFR1 como NFR5 son elementos esenciales para la señalización de los factores nodales (Madsen et al. 2003), mientras que NFRc posiblemente intensifique la señalización en las células epidérmicas de la raíz (Murakami et al. 2018). Posterior a la detección por los receptores tipo LysM, una serie de genes de señalización simbiótica y factores de transcripción (FTs) operan para desencadenar la formación de hilos de infección, la organogénesis de nódulos y otros procesos en las raíces de las leguminosas (Roi et al. 2020).

El grupo más amplio de RLKs en las plantas está constituido por quinasas receptoras ricas en cisteína o proteínas con el dominio DUF26. Sin embargo, las funciones biológicas de estos RLKs en las interacciones simbióticas de las plantas han sido poco exploradas. Investigaciones previas en *Medicago truncatula* han demostrado que las mutaciones en *symCRK* resultan en la formación de nódulos que exhiben reacciones similares a las de defensa, muerte bacteriana y, en última instancia, la incapacidad para fijar nitrógeno (Berrabah et al., 2014; Berrabah et al., 2015, Berrabah et al., 2018). Un estudio previo enfocado en *P. vulgaris* sugirió que los genes posiblemente relacionados con *PvCRK* podrían estar implicados en la regulación de estas diversas interacciones simbióticas (Quezada et al., 2019). Además, investigaciones recientes han identificado que *AeCRK* es un elemento crucial en el inicio de la nodulación de raíces y tallos en *Aeschynomene evenia* (Quilbé et al., 2021).

En primer lugar, caracterizamos la estructura génica de *CRK12* en *P. vulgaris* y observamos que su expresión aumenta significativamente en raíces inoculadas con *R. tropici* en comparación con raíces no inoculadas, indicando su regulación en respuesta a la infección de rhizobio. Además, demostramos que la expresión de *CRK12* está temporalmente regulada durante el desarrollo del nódulo, siendo más pronunciada en las etapas tempranas y disminuyendo durante la senescencia del nódulo. Estos resultados sugieren que *CRK12* podría desempeñar un papel crucial en la regulación de eventos tempranos de la formación del nódulo.

Investigamos la expresión espaciotemporal del promotor *CRK12* y la localización subcelular de la proteína *CRK12* en *P. vulgaris*. Mostramos que el promotor *CRK12* se activa en las células de los pelos radicales y se intensifica durante la formación de primordios de nódulo y en nódulos jóvenes y maduros. Esto sugiere que *CRK12* podría estar involucrado en la regulación de eventos específicos de la infección y el desarrollo del nódulo. Además, mediante la expresión transitoria de una proteína de fusión *CRK12*-YFP, demostramos que *CRK12* se localiza en la membrana plasmática de las células de los pelos radicales, lo que es consistente con su función en la señalización y respuesta a la infección de rhizobio.

El resultado central de nuestras investigaciones preliminares en *P. vulgaris* nos condujo a una caracterización funcional de *CRK12* en este presente estudio. Este análisis buscó dilucidar la función específica de *CRK12* en las interacciones entre *P. vulgaris* y *Rhizobium tropici*. *CRK12* en *Phaseolus* se distingue por tener dos dominios *DUF26*, los cuales contienen un motivo C-X(8)-C-X(2)-C similar a otros CRKs (Quezada et al., 2019). Aunque el propósito exacto de este dominio aún no se comprende completamente, reportes previos sugieren su posible participación en la regulación del redox y las interacciones proteína-proteína (Chen et al., 2004, Wrzaczek et al., 2013). Resulta intrigante notar que los patrones temporales de expresión de *CRK12* en las plantas inoculadas con simbiontes de *Rhizobium* exhibieron un aumento en los niveles de transcripción en todas las etapas de la simbiosis. Al analizar los elementos cis en la región reguladora de *CRK12*, se observa la ausencia de factores de transcripción específicos de la simbiosis (Quezada et al., 2019). No obstante, se detecta una abundancia de factores de transcripción vinculados a la regulación de fitohormonas, lo que sugiere la posible presencia de un mecanismo de señalización (Lin et

al., 2020; Li et al., 2022). Para una indagación más profunda, examinamos la expresión del promotor del gen *CRK12*, lo cual generó hallazgos de gran interés. El promotor de *CRK12* mostró expresión en unidades de infección de *Rhizobium*, hilos de infección, células corticales en división, córtex interno y vasculatura de nódulos maduros.

Las funciones de los CRKs en aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas han sido previamente caracterizadas (Bourdais et al., 2015). En este estudio, la sobreexpresión de *CRK12* llevó a una mayor densidad de raíces laterales y a raicillas más extensas en la región de elongación de las raicillas y en la zona de maduración, en comparación con los controles. Cabe destacar que nuestros resultados difieren de estudios anteriores sobre los mutantes de *Arabidopsis* *CRK28*, *CRK29* y *CRK42*, en los cuales las mutaciones en los genes *CRK* resultaron en raíces primarias más extensas y mayor densidad de raíces laterales [Bourdais et al., 2015; Pelagio-Flores et al., 2019). Estos CRKs perciben señales a través de dominios extracelulares, transmembrana e intracelulares, lo que activa las vías de MAPK y resulta en la posterior transcripción génica. En *Medicago truncatula*, la participación de SymCRK, una quinasa receptora similar rica en cisteína, ha sido documentada en interacciones mutualistas, como la simbiosis. En esta investigación, nos enfocamos en examinar los efectos de la supresión y la sobreexpresión de *CRK12* en la simbiosis de los nódulos rizobianos (RNS). En plantas de *Phaseolus*, la sobreexpresión de *CRK12* conllevó a un notable incremento en la frecuencia de eventos de infección, con 108 eventos por planta, una cifra significativamente superior en comparación con los controles que mostraron únicamente 24 eventos por planta. Este aumento también se reflejó en el número de nódulos, ya que *CRK12*-OE generó 289.3 nódulos en las raíces, lo que representa un aumento de cuatro veces en relación al grupo de control con 71.7 nódulos. Los nódulos con sobreexpresión de *CRK12* exhibían, en observaciones histológicas, un aumento tanto en el número como en el tamaño de las células infectadas. Estos descubrimientos concuerdan con las capacidades de fijación de nitrógeno que presentan los nódulos de *CRK*-OE. Investigaciones previas que involucraron a *SymCRK* en mutantes de *M. truncatula* no mostraron un cambio sustancial en el número de nódulos; no obstante, la mayoría de los nódulos desarrollados eran nódulos necróticos no funcionales (Berrabah et al. 2014). Adicionalmente, estudios acerca del

desarrollo de los nódulos de tallo y raíz de *Aeschynomene evenia* sugirieron que *AeCRK*, junto a otros genes de la vía simbiótica, era esencial para el proceso.

En *Medicago*, se ha comprobado que la sobreexpresión de una quinasa receptora tipo lectina (LecRK), un posible RLK que se une a lipochitoooligosacáridos rizobiales, incrementa el número de nódulos [55]. En este estudio, el aumento observado en los eventos de infección y el número de nódulos al sobreexpresar *CRK12*, así como el efecto contrastante al reducir la transcripción de *CRK12*, sugieren una potencial función de *CRK12* como receptor de los factores nodales rizobiales. Además, en las plantas de *Phaseolus*, la sobreexpresión de *CRK12* llevó a la sobreexpresión del homólogo B del estallido oxidativo respiratorio (*RbohB*), lo que resultó en niveles incrementados de especies reactivas de oxígeno. Estudios previos han reportado la participación de *RbohB* en el mantenimiento del número de simbiosomas, el tamaño de los bacteroides y la fijación de nitrógeno en los nódulos de *Phaseolus* (Arthikala et al., 2014). Es relevante señalar que los CRKs han sido asociados a la detección directa de ROS debido a las posibles funciones de regulación del redox en su dominio proteico extracelular (Bourdais et al., 2015). Por lo tanto, es plausible suponer que la interacción entre *CRK12* y la señalización de ROS podría contribuir al aumento observado en el número de nódulos.

En conjunto, nuestros resultados indican que *CRK12* desempeña un papel multifuncional en *P. vulgaris*, regulando la nodulación, la morfología de las raíces, los pelos radicales y la densidad de unidades de infección. Los hallazgos proporcionan una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a la formación y desarrollo de nódulos en leguminosas, lo que podría implicar mejorar la fijación de nitrógeno en los cultivos agrícolas y promover la sostenibilidad agrícola.

## Conclusiones

En resumen, este estudio ha contribuido a una mayor comprensión profunda de la función del gen *CRK12* en las interacciones simbióticas entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*. Los resultados muestran que *CRK12* podría estar implicado en diversos procesos como la regulación de la nodulación, la morfología de las raíces y los pelos radicales, la densidad de las unidades de infección y la respuesta al estrés oxidativo en *P. vulgaris*. La sobreexpresión de *CRK12* condujo a un aumento en el número de nódulos y unidades de infección, lo que sugiere que *CRK12* está involucrado en la señalización y regulación de eventos tempranos en la formación del nódulo. Además, la sobreexpresión de *CRK12* promovió el crecimiento de raíces laterales y una mayor densidad de pelos radicales, lo que podría estar relacionado con la regulación de genes implicados en el desarrollo de las raíces.

Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la formación y el desarrollo de nódulos en leguminosas. La capacidad de manipular la expresión de *CRK12* y, por lo tanto, la nodulación y el crecimiento de las raíces en *P. vulgaris*, podría tener aplicaciones en la mejora de la fijación de nitrógeno en los cultivos agrícolas y en la promoción de la sostenibilidad agrícola.

Además, este estudio también arroja luz sobre la función de los receptores de tipo quinasa similares a receptores (RLKs) en las interacciones planta-microorganismo. Los RLKs son una familia diversa de proteínas que desempeñan un papel crucial en la percepción de señales extracelulares y la transducción de señales intracelulares. Nuestros resultados sugieren que *CRK12* podría actuar como un receptor de señales rizobiales, lo que amplía nuestra comprensión de la comunicación planta-microorganismo en las simbiosis radiculares.

En última instancia, este estudio contribuye al campo de la biología de las plantas y la microbiología al proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos que rigen las interacciones simbióticas entre leguminosas y rizobios. Estos hallazgos tienen el potencial de tener un impacto significativo en la agricultura sostenible al mejorar la capacidad de las plantas leguminosas para fijar nitrógeno en el suelo, lo que podría reducir la dependencia de

los fertilizantes nitrogenados y promover prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente.

## Bibliografía

- Acharya, B. R., Raina, S., Maqbool, S. B., Jagadeeswaran, G., Mosher, S. L., Appel, H. M., ... & Raina, R. (2007). Overexpression of CRK13, an Arabidopsis cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, 50(3), 488-499.
- Ané J.-M., et al. (2004). *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**: 1364–1367.
- Angioi, S. A., Rau, D., Attene, G., Nanni, L., Bellucci, E., Logozzo, G., ... & Papa, R. (2010). Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 829-843.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., ... & Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 142-150.
- Arthikala, M.; Sánchez-López, R.; Nava, N.; Santana, O.; Cárdenas, L.; Quinto, C. *RbohB*, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytol.* **2014**, 202, 886–900.
- Berrabah, F., Balliau, T., Aït-Salem, E. H., George, J., Zivy, M., Ratet, P., & Gourion, B. (2018). Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia. *New Phytologist*, 219(1), 310-323.
- Berrabah, F., Ratet, P., & Gourion, B. (2015). Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1977-1985.
- Berrabah, F.; Bourcy, M.; Eschstruth, A.; Cayrel, A.; Guefrachi, I.; Mergaert, P.; Wen, J.; Jean, V.; Mysore, K.; Gourion, B.; et al. A non RD receptor-like kinase prevents

nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytol.* **2014**, *203*, 1305–1314.

Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M. L., Gioia, T., ... & Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus* spp.) as a model for understanding crop evolution. *Frontiers in plant science*, *8*, 722.

Bonfante, P., & Requena, N. (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, *14*(4), 451-457.

Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O., Mendes, É. A., & Aragão, F. J. (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-microbe interactions*, *20*(6), 717-726.

Bourdais, G.; Burdiak, P.; Gauthier, A.; Nitsch, L.; Salojärvi, J.; Rayapuram, C.; Idänheimo, N.; Hunter, K.; Kimura, S.; Merilo, E.; et al. Large-Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to Oxidative Stress. *PLOS Genet.* **2015**, *11*, e1005373

Burkart, A. and H. Brücher. (1953). *Phaseolus aborigineus*, the presumed Andean parent form of the bean culture. *23*(3):65-72.

Cai J., et al. (2018). Role of the Nod factor hydrolase MtNFH1 in regulating Nod factor levels during rhizobial infection and in mature nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **30**: 397–414.

Capoen, W., Sun, J., Wysham, D., Otegui, M. S., Venkateshwaran, M., Hirsch, S., ... & Oldroyd, G. E. (2011). Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(34), 14348-14353.

Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant physiology*, *123*(2), 443-452.

Cermola, M.; Fedorova, E.; Riccio, A.; Favre, R.; Patriarca, EJ; Cermola, EFM; Sujkowska-Rybkowska, M.; Ważny, R.; Vía, VD; Traubenik, S.; et al. Invasión de nódulos y diferenciación de simbiosomas durante la simbiosis de *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris*. *Mol. Interacción planta-microbio.* **2000**, *13*, 733–741. [



- Chen, K.; Du, L.; Chen, Z. Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2003**, *53*, 61–74.
- Chen, K.; Fan, B.; Du, L.; Chen, Z. Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *56*, 271–283.
- Chen, T.-K.; Yang, H.-T.; Fang, S.-C.; Lien, Y.-C.; Yang, T.-T.; Ko, S.-S. Hybrid-Cut: An Improved Sectioning Method for Recalcitrant Plant Tissue Samples. *J. Vis. Exp.* **2016**, *117*, e5475
- Considine, M.J.; Foyer, C.H.; Zaffagnini, M.; Fermani, S.; Marchand, C.H.; Costa, A.; Sparla, F.; Rouhier, N.; Geigenberger, P.; Lemaire, S.D.; et al. Redox regulation of plant development. *Antioxidants Redox Signal.* **2014**, *21*, 1305–1326.
- De Ron, A. M., & Santalla, M. (2013). *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 290–292. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.01145-1
- De Ron, A. M., Rodiño, A. P., Santalla, M., González, A. M., Lema, M. J., Martín, I., & Kigel, J. (2016). Seedling emergence and phenotypic response of common bean germplasm to different temperatures under controlled conditions and in open field. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1087.
- de Bary, H.A. Karl J. Trubner, Strasburg, (1879) *Die Erscheinung der Symbiose*. citado en Relman, D.A. "Till death do us part": coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Reviews Microbiology* *6*, 721-724 (2008)
- Debouck, Daniel G.; Hidalgo Rigoberto. Ospina O., Héctor F.; Flor M., Carlos A. Cali, Colombia, (1984). *Morfología de la planta de frijol común*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. 56 p. (SERIE 04sb-09.01).
- Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. (1989). First report of non-mycorrhizal plant mutants (Myc<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant science*, *60*(2), 215-222.
- Ederli, L., Madeo, L., Calderini, O., Gehring, C., Moretti, C., Buonauro, R., ... & Pasqualini, S. (2011). The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20

modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. *Journal of plant physiology*, 168(15), 1784-1794.

Ehrhardt, D. W., Atkinson, E. M., & Long, S. R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 256(5059), 998-1000.

Ehrhardt, D. W., Wais, R., & Long, S. R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, 85(5), 673-681.

Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**: 962–966.

Epstein, B., Burghardt, L. T., Heath, K. D., Grillo, M. A., Kostanecki, A., Hämälä, T., Young, N. D., & Tiffin, P. (2023). Combining GWAS and population genomic analyses to characterize coevolution in a legume-rhizobia symbiosis. *Molecular Ecology*, 32, 3798–3811.

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., ... & Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature protocols*, 2(7), 1819-1824.

Freyre R, Skroch PW, Geffroy V, et al. (1998) *Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core linkage map and alignment of RFLP maps*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 847–856.

Freytag GF and Debouck DG (2002) *Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America*. Fort Worth, TX: BRIT Press.

Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). *Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and central America*. Botanical Research Institute of Texas.

Genre, A., & Russo, G. (2016). Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant–microbe interactions?. *Frontiers in plant science*, 7, 96.

Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Péret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and

Frankiacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 25;105(12):4928-32. doi: 10.1073/pnas.0710618105. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18316735; PMCID: PMC2290763.

Gualtier, G. & T. Bisseling. (2000). *The evolution of nodulation*. Plant Mol. Biol. 42:181–194.

Imaizumi-Anraku H., et al. (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. Nature **433**: 527–531.

Jackson, M. A., Anderson, D. J., & Birch, R. G. (2013). Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. *Transgenic research*, 22, 143-151.

Journet, E. P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., de Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., ... & Gianinazzi-Pearson, V. (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 737-748.

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

Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W43-W46.

Kim G.-B., Son S.-U., Yu H.-J., Mun J.-H. (2019). *MtGA2ox10* encoding C20-GA2-oxidase regulates rhizobial infection and nodule development in *Medicago truncatula*. Sci. Rep. **9**: 5952.

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

Laffont C, De Cuyper C, Fromentin J, Mortier V, De Keyser A, Verplancke C, Holsters M, Goormachtig S, Frugier F. MtNRLK1, a CLAVATA1-like leucine-rich repeat receptor-like kinase upregulated during nodulation in *Medicago truncatula*. Sci Rep. 2018 Feb 1;8(1):2046. doi: 10.1038/s41598-018-20359-4. PMID: 29391543; PMCID: PMC5794917.

Lavagnino, N. J., Massarini, A., & Folguera, G. (2014). Simbiosis y evolución: un análisis de las implicaciones evolutivas de la simbiosis en la obra de Lynn Margulis. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia*, 14(29), 161-181.

Li, T.-G.; Zhang, D.-D.; Zhou, L.; Kong, Z.-Q.; Hussaini, A.S.; Wang, D.; Li, J.-J.; Short, D.P.G.; Dhar, N.; Klosterman, S.J.; et al. Genome-Wide Identification and Functional Analyses of the CRK Gene Family in Cotton Reveals GbCRK18 Confers Verticillium Wilt Resistance in *Gossypium barbadense*. *Front. Plant Sci.* **2018**, 9, 1266.

Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630–633.

Lin, J.; Frank, M.; Reid, D. No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Commun.* **2020**, 1, 100104.

Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 365-367

Liu, Z., Park, B. J., Kanno, A., & Kameya, T. (2005). The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration in *Agrobacterium*-mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. *Molecular Breeding*, 16, 189-197.

Lloret L, Martínez-Romero E. (2005) *Evolución y filogenia de rhizobia*. *Microbiología*.47(1-2):43-60.

Madsen, E.B.; Madsen, L.H.; Radutoiu, S.; Olbryt, M.; Rakwalska, M.; Szczyglowski, K.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **2003**, 425, 637–640

Margulis, Lynn & Sagan, Dorion. *Microcosmos. Cuatro mil millones de años de evolución desde nuestros ancestros microbianos*. Barcelona: Tusquets Editores, 1995.

Margulis, Lynn. *Planeta Simbiótico. Un Nuevo punto de vista sobre la evolución*. Madrid: Editorial Debate, 2002.

Markmann, K., & Parniske, M. (2009). Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules?. *Trends in plant science*, 14(2), 77-86.

Marsh, J. F., Rakocevic, A., Mitra, R. M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., ... & Oldroyd, G. E. (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent

nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant physiology*, *144*(1), 324-335.

Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2006). Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(8), 914-923.

Mulligan, J.T.; Long, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 6609–6613.

Murakami, E.; Cheng, J.; Gysel, K.; Bozsoki, Z.; Kawaharada, Y.; Hjuler, C.T.; Sørensen, K.K.; Tao, K.; Kelly, S.; Venice, F.; et al. Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signalling in *Lotus japonicus*. *Elife* **2018**, *7*, e33506

Myounghai K and Gepts P (2009) *Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (Phaseolus vulgaris L., Fabaceae)*. *Theoretical and Applied Genetics* *118*: 979–992.

Nanjareddy, K.; Arthikala, M.-K.; Aguirre, A.-L.; Gómez, B.-M.; Lara, M. Plant Promoter Analysis: Identification and Characterization of Root Nodule Specific Promoter in the Common Bean. *J. Vis. Exp.* **2017**, *130*, e56140.

Nishimura R., Hayashi M., Wu G.-J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M., Harada K., Kawaguchi M. (2002). HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* **420**: 426–429.

Oldroyd, G. E., Harrison, M. J., & Udvardi, M. (2005). Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in legume-microbe symbioses. *Plant physiology*, *137*(4), 1205-1210.

Oldroyd, G. E., 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.

Parniske, M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, *7*(4), 414-421.

Parniske, M. (2008). *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. *Nat Rev Microbiol*, *6*, 763-75.

Pelagio-Flores, R.; Muñoz-Parra, E.; Barrera-Ortiz, S.; Ortiz-Castro, R.; Saenz-Mata, J.; Ortega-Amaro, M.A.; Jiménez-Bremont, J.F.; López-Bucio, J. The cysteine-rich

receptor-like protein kinase CRK28 modulates Arabidopsis growth and development and influences abscisic acid responses. *Planta* **2019**, 251, 2.

Pichon, M., Journet, E. P., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., & Barker, D. G. (1992). Rhizobium meliloti elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *The Plant Cell*, 4(10), 1199-1211.

Poovaiah, B. W., Du, L., Wang, H., & Yang, T. (2013). Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant physiology*, 163(2), 531-542.

Quezada, E.-H.; García, G.-X.; Arthikala, M.-K.; Melappa, G.; Lara, M.; Nanjareddy, K. Cysteine-Rich Receptor-Like Kinase Gene Family Identification in the *Phaseolus* Genome and Comparative Analysis of Their Expression Profiles Specific to Mycorrhizal and Rhizobial Symbiosis. *Genes* **2019**, 10, 59.

Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Madsen, E.B.; Felle, H.H.; Umehara, Y.; Grønlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal, N.; et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **2003**, 425, 585–592

Rayapuram, C., Jensen, M. K., Maiser, F., Shanir, J. V., Hornshøj, H., Rung, J. H., ... & Lyngkjaer, M. F. (2012). Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 135-147.

Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J., & McCabe, D. E. (1993). Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 12(3), 165-169.

Santalla M, Rodiño AP, and De Ron AM (2002) *Allozyme evidence supporting southwestern Europe as a secondary center of genetic diversity for common bean*. Theoretical and Applied Genetics 104: 934–944.

Shimoda, Y., Han, L., Yamazaki, T., Suzuki, R., Hayashi, M., & Imaizumi-Anraku, H. (2012). Rhizobial and fungal symbioses show different requirements for calmodulin binding to calcium calmodulin-dependent protein kinase in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell*, 24(1), 304-321.

Singh SP, Gepts P, and Debouck DG (1991) *Races of common bean (Phaseolus vulgaris, Fabaceae)*. Economic Botany 45: 379–396.

- Stougaard J . (2001) . *Reguladores y regulación del desarrollo de nódulos radiculares de leguminosas . Fisiología vegetal* **124** : 531 - 540 .
- Stougaard, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant physiology*, *124*(2), 531-540.
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K., Parniske M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**: 959–962.
- Sutton JM, Lea EJ, Downie JA. The nodulation-signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* forms ion channels in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9990-4. doi: 10.1073/pnas.91.21.9990. PMID: 7524090; PMCID: PMC44943.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (No. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated.
- Tepfer, D. (2017). DNA transfer to plants by *Agrobacterium rhizogenes*: A model for genetic communication between species and biospheres. *Transgenesis and secondary metabolism*, 3-43.
- Veltcheva, M., Svetleva, D., Petkova, S. P., & Perl, A. (2005). In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. *Scientia Horticulturae*, *107*(1), 2-10.
- Vianna, G. R., Albino, M. M., Dias, B. B., de Mesquita Silva, L., Rech, E. L., & Aragão, F. J. (2004). Fragment DNA as vector for genetic transformation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia horticulturae*, *99*(3-4), 371-378.
- Wais, R. J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Penmetsa, R. V., Cook, D., ... & Long, S. R. (2000). Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(24), 13407-13412.
- Walker, S. A., Viprey, V., & Downie, J. A. (2000). Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(24), 13413-13418.

- Wong, c. H., Pankhurst, c. E., Kondorosi, a. & Broughton, w. J. 1983. *Morphology of root nodules and nodule-like structures formed by Rhizobium and Agrobacterium strains containing a Rhizobium meliloti megaplasmid*. *J Cell Biol*, 97, 787-94
- Wong, C. H., Pankhurst, C. E., Kondorosi, A. & Broughton, W. J. 1983. *Morphology of root nodules and nodule-like structures formed by Rhizobium and Agrobacterium strains containing a Rhizobium meliloti megaplasmid*. *J Cell Biol*, 97, 787-94.
- Wrzaczek, M.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J. ROS signaling loops—Production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, 16, 575–582.
- 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* **141**: 3517–3528.
- Yadeta, K.A.; Elmore, J.M.; Creer, A.Y.; Feng, B.; Franco, J.Y.; Rufian, J.S.; He, P.; Phinney, B.; Coaker, G. A Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiol.* **2016**, 173, 771–787.
- Yang, K., Rong, W., Qi, L., Li, J., Wei, X., & Zhang, Z. (2013). Isolation and characterization of a novel wheat cysteine-rich receptor-like kinase gene induced by *Rhizoctonia cerealis*. *Scientific Reports*, 3(1), 3021.
- Yeh, Y.-H.; Chang, Y.-H.; Huang, P.-Y.; Huang, J.-B.; Zimmerli, L. Enhanced Arabidopsis pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. *Front. Plant Sci.* **2015**, 6, 322.



## Glosario

**SNF** Fijación Simbiótica de Nitrógeno

**CRK** Cysteine Rich Receptor-like Kinase

**Lb** Leghemoglobina

**pb** Pares de Bases

**IT** Infection Tread (Hilo de infección)

**OX** Over Expression (Sobreexpresión)

**PL** Plásmido

**LB** Luria Broth

**mTOR** Mammalian Target of Rapamycin (diana de rapamicina en células de mamífero)

**ULK** Unc-51 like kinase

**GFP** Green Florescent Protein (Proteína Verde Florescente)

**Dpi** Days Post Inoculation (días post inoculación)

**Hr** Hairy root (pelo radicular)

***P. vulgaris*** *Phaseolus vulgaris*

***R. tropici*** *Rhizobium tropici*

## Anexos

PCR con oligos M13				
Plásmido		1.5 $\mu$ l		
Go Taq.		10 $\mu$ l		
Oligo M13 F		1 $\mu$ l		
Oligo M13 R		1 $\mu$ l		
H <sub>2</sub> O		6.5 $\mu$ l		
<b>Volumen Total</b>		<b>20 <math>\mu</math>l</b>		
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
3'	30	30	30	7'
		<b>x30</b>		

*Componentes, cantidades y programa para la adición de oligos M13 al plásmido OX-CRK12 mediante PCR.*

<b>FRAGMENTO RNAi (370 pb)</b>
CDO RiF- CAC CCA AGC TCC TGA GAT GAG GC
CDO RiR- AGT TCT CCA CAA TCT TTG GAC CAC

Oligos diseñados (Forward y Reverse)

AMPLIFICACIÓN				
cDNA	5 $\mu$ l			
Oligo F	2.5 $\mu$ l			
Oligo R	2.5 $\mu$ l			
dntps	2 $\mu$ l			
5x Superfi buffer	10 $\mu$ l			
Superfi Taq.	0.5 $\mu$ l			
H2O	27.5 $\mu$ l			
<b>Volumen Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>			
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
3'	30	30	30	7'
	<b>x35</b>			

*Componentes, cantidades y programa para la amplificación mediante PCR del frag*

Oligo Mix CDO	
Oligo Forward	5 $\mu$ l
Oligo Reverse	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	90 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	<b>100 <math>\mu</math>l</b>

*FComponentes y cantidades para el mix de oligos CRK12 F y R.*

CULTIVO <i>R. tropici</i> GUS	
Medio PY	100 ml
NAL	100 $\mu$ l
Kanamicina	50 $\mu$ l
CaCl 1M	700 $\mu$ l
<i>R. tropici</i> GUS	400 $\mu$ l

*Componentes y cantidades para cultivo *R. tropici* GUS.*

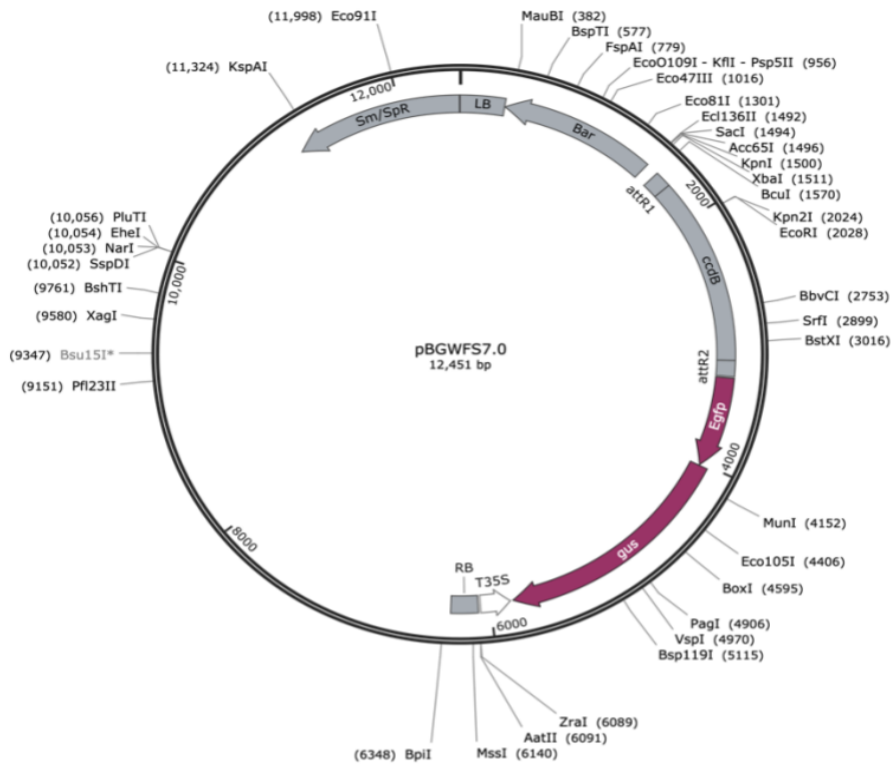
Solución B&D	
Solución A	500 $\mu$ l
Solución B	500 $\mu$ l
Solución C	500 $\mu$ l
Solución D	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1 L

MEDIO LB LÍQUIDO	
NaCl	1.5 g
Triptona	1.5 g
Extracto de levadura	0.75 g
H <sub>2</sub> O	150 ml

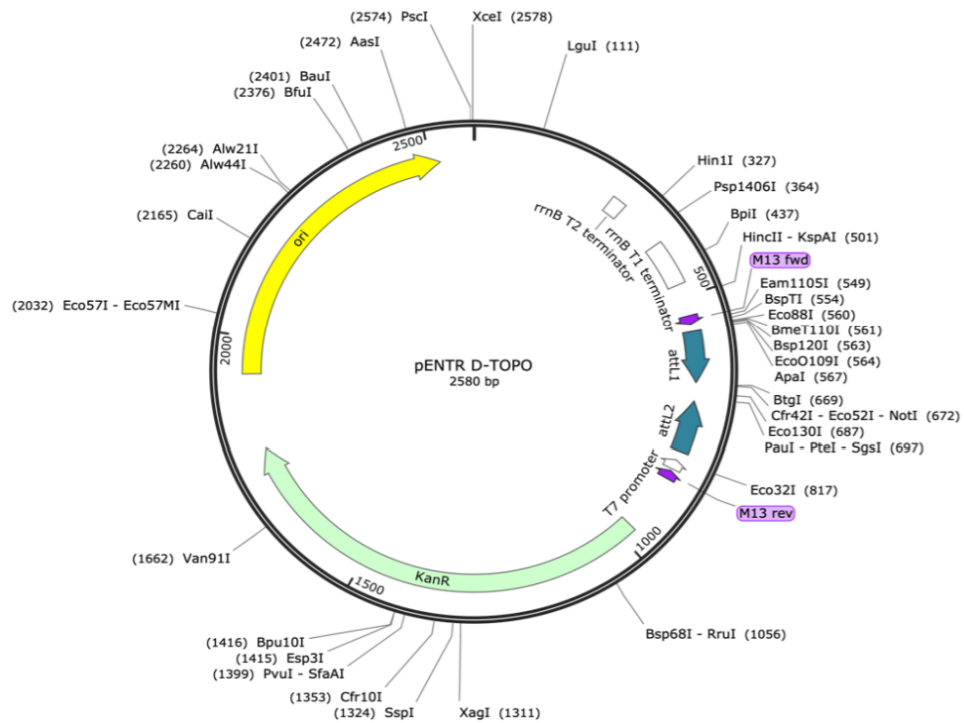
*Componentes y cantidades para preparar medio LB líquido.*

MEDIO LB SÓLIDO	
NaCl	1.5 g
Triptona	1.5 g
Extracto de levadura	0.75 g
Agar	3 g
H <sub>2</sub> O	150 ml

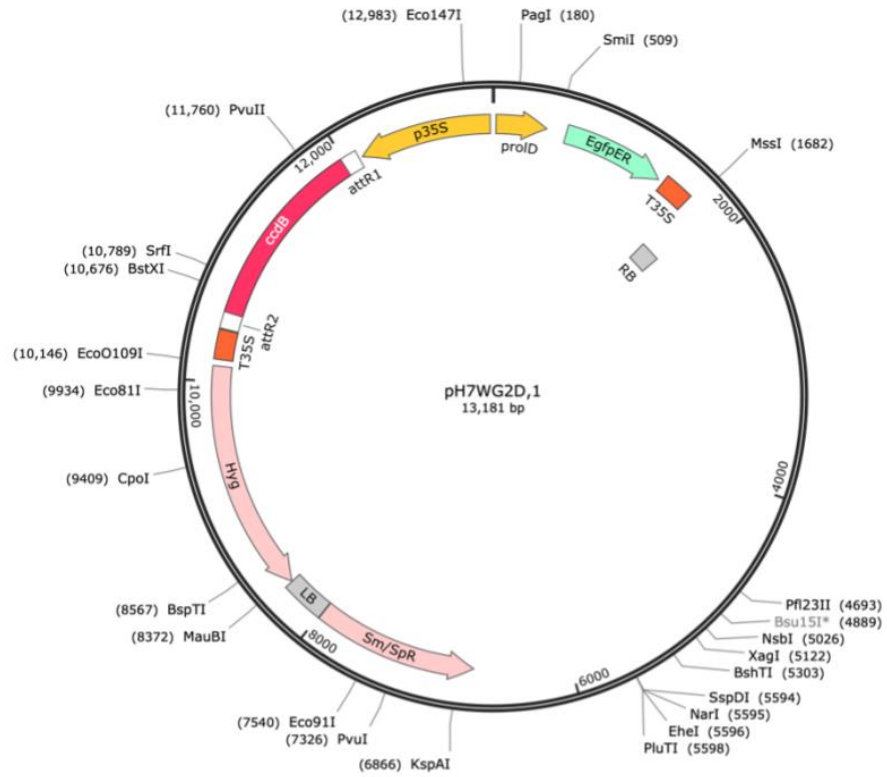
*Componentes y cantidades para preparar medio LB sólido.*



Mapa del vector final/destino pBGWFS7.0 el cual contiene el gen reportero GUS para la localización de expresión espacio-temporal



Mapa de la estructura del vector p-ENTR D-TOPO



Mapa del vector pH7WG2D con casete de promotor CaMV 35S y GFP.

## Productos

### Publicaciones:

- **Lecona, Antonino Michel**, Nanjareddy, Kalpana, Blanco, Lourdes, Piazza, Valeria, Vera-Núñez, José Antonio, Lara, Miguel, & Arthikala, Manojkumar. (2023). *CRK12: A Key Player in Regulating the Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici Symbiotic Interaction*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11720. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241411720>

IF: 5.6 (Q1)

### Participación en congresos:

#### Congresos nacionales:

- **Antonino M. Lecona**, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Miguel Lara & Manojkumar Arthikala\*, Sobreexpresión de *Cysteine-rich Receptor-like Kinase 12* induce hipernodulación en *P. vulgaris*. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. SMBB, México. Sept-Oct, 2021
- **Antonino M. Lecona**, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Miguel Lara & Manojkumar Arthikala\*, La sobreexpresión de *Cysteine-rich Receptor-like Kinase 12* incrementa el número de nódulos en *Phaseolus vulgaris*. Primer Congreso Nacional de Investigación de Posgrado. Universidad de LaSalle Bajío, México. Ago. 2022

#### Congresos internacionales:

- **Antonino M. Lecona**, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Miguel Lara & Manojkumar Arthikala\*, Ectopic expression of *Phaseolus CRK12* induces hypernodulation in common bean. Congreso Internacional "Agrigenomics for Food and Health. Connecting Engineering, Industry and Science". Tecnológico de Monterrey, México. Sep. 2022
- **Antonino M. Lecona**, Kalpana Nanjareddy & Manojkumar Arthikala\*, *PvCRK12* Silencing in *Phaseolus vulgaris* Reduces Nodule Formation During Symbiosis with *Rhizobium*. International Conference on Advances in Materials, Ceramics and Engineering Sciences, AMCES. Department of Applied Sciences, VTU, Begalavi, India. Mar. 2023.



Article

---

# *CRK12*: A Key Player in Regulating the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* Symbiotic Interaction

---

Antonino M. Lecona, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Valeria Piazza,  
José Antonio Vera-Núñez, Miguel Lara and Manoj-Kumar Arthikala

## Special Issue

Molecular Research on Plant-Associated Nitrogen-Fixing Bacteria

Edited by  
Prof. Dr. Stefanie Kautz



<https://doi.org/10.3390/ijms241411720>





Article

# CRK12: A Key Player in Regulating the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* Symbiotic Interaction

Antonino M. Lecona <sup>1</sup>, Kalpana Nanjareddy <sup>1</sup> , Lourdes Blanco <sup>2</sup>, Valeria Piazza <sup>3</sup> , José Antonio Vera-Núñez <sup>4</sup>, Miguel Lara <sup>2</sup> and Manoj-Kumar Arthikala <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Ciencias Agrogenómicas, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), León 37689, GTO, Mexico; antonino.lecona@comunidad.unam.mx (A.M.L.); kalpana@enes.unam.mx (K.N.)

<sup>2</sup> Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca 62210, MOR, Mexico; lourdes.blanco@ibt.unam.mx (L.B.); miguel.lara@ibt.unam.mx (M.L.)

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones en Óptica A. C., Loma del Bosque 115, León 37150, GTO, Mexico; vpiazza@cio.mx

<sup>4</sup> Departamento Biotecnología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, Irapuato 36821, GTO, Mexico; jose.vera@cinvestav.mx

\* Correspondence: manoj@enes.unam.mx; Tel.: +52-1-477-1940800 (ext. 43462)

**Abstract:** Cysteine-rich receptor-like kinases (CRKs) are a type of receptor-like kinases (RLKs) that are important for pathogen resistance, extracellular reactive oxygen species (ROS) signaling, and programmed cell death in plants. In a previous study, we identified 46 CRK family members in the *Phaseolus vulgaris* genome and found that *CRK12* was highly upregulated under root nodule symbiotic conditions. To better understand the role of *CRK12* in the *Phaseolus*–*Rhizobium* symbiotic interaction, we functionally characterized this gene by overexpressing (*CRK12*-OE) and silencing (*CRK12*-RNAi) it in a *P. vulgaris* hairy root system. We found that the constitutive expression of *CRK12* led to an increase in root hair length and the expression of root hair regulatory genes, while silencing the gene had the opposite effect. During symbiosis, *CRK12*-RNAi resulted in a significant reduction in nodule numbers, while *CRK12*-OE roots showed a dramatic increase in rhizobial infection threads and the number of nodules. Nodule cross sections revealed that silenced nodules had very few infected cells, while *CRK12*-OE nodules had enlarged infected cells, whose numbers had increased compared to controls. As expected, *CRK12*-RNAi negatively affected nitrogen fixation, while *CRK12*-OE nodules fixed 1.5 times more nitrogen than controls. Expression levels of genes involved in symbiosis and ROS signaling, as well as nitrogen export genes, supported the nodule phenotypes. Moreover, nodule senescence was prolonged in *CRK12*-overexpressing roots. Subcellular localization assays showed that the *PvCRK12* protein localized to the plasma membrane, and the spatiotemporal expression patterns of the *CRK12*-promoter::GUS-GFP analysis revealed a symbiosis-specific expression of *CRK12* during the early stages of rhizobial infection and in the development of nodules. Our findings suggest that *CRK12*, a membrane RLK, is a novel regulator of *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* symbiosis.

**Keywords:** cysteine-rich receptor-like kinases; CRK; hyper nodulation; nitrogen fixation; overexpression; *Phaseolus*; senescence; silencing; *Rhizobium*; Symbiosis



**Citation:** Lecona, A.M.; Nanjareddy, K.; Blanco, L.; Piazza, V.; Vera-Núñez, J.A.; Lara, M.; Arthikala, M.-K. *CRK12: A Key Player in Regulating the Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* Symbiotic Interaction. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11720. <https://doi.org/10.3390/ijms241411720>

Academic Editor: Stefanie Kautz

Received: 16 June 2023

Revised: 16 July 2023

Accepted: 18 July 2023

Published: 21 July 2023



**Copyright:** © 2023 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

Receptor-like kinases (RLKs) are abundant proteins located in the plasma membrane of various eukaryotic organisms, as evidenced by several studies [1–3]. Within the RLK family, cysteine-rich receptor-like kinases (CRKs) or domains of unknown function (DUF26) proteins represent a significant subgroup. CRKs consist of distinct domains, including an extracellular domain responsible for perceiving signals, a transmembrane domain, and an intracellular serine/threonine (Ser/Thr) protein kinase domain that facilitates signal transduction [4]. The classification of CRK proteins is based on domain types, such as

DUF26 and Ginkbilobin-2 (Gnk2), or the presence of antifungal domain motifs in the extracellular region [5].

DUF26 domains possess a unique structure comprising of two  $\alpha$ -helices and a five-stranded  $\beta$ -sheet, along with three conserved cysteine residues arranged in a C-X(8)-C-X(2)-C configuration, capable of forming two cysteine bridges. The cysteine bridges in DUF26 domains allow CRKs to sense reactive oxygen species (ROS)/redox signals (similar to other cysteine-rich domains) before transmitting the signal through the cytoplasmic kinase domain [6]. Plant CRKs exhibit considerable diversity, with examples such as 30 members in *Gossypium* [7], over 40 members in *Oryza* [8], 44 in *Arabidopsis* [4,9], 46 in *Phaseolus* [10], and 91 in *Glycine* [11].

CRKs have been implicated in the regulation of various physiological processes in plants, including stomatal dynamics and density, organogenesis, root length and density, cell death, differentiation of vascular tissue, and seed germination [12–14].

Plant-microbe interactions are characterized by their dynamic and continuous nature, encompassing both pathogenic and mutualistic relationships. These interactions involve the exchange of signals through distinct molecules produced by the host plant, microbes, or both. Membrane-bound receptor-like kinases play a critical role as receptors in these interactions, facilitating microbe-specific responses through signal transduction. In the context of pathogen infection, the host plant activates defense responses to counteract the invading pathogens. Substantial evidence suggests the involvement of CRKs in plant-pathogen interactions.

Previous studies have demonstrated the significant impact of overexpressing certain cysteine-rich receptor-like kinases on plant resistance against specific pathogens. For instance, *Arabidopsis* CRK5, CRK6, CRK36, and CRK45 [9,15,16] have been shown to enhance resistance to *Pseudomonas syringae* by rapidly inducing the expression of defense genes and promoting the production of reactive oxygen species (ROS) [17–19]. In *Triticum aestivum*, the overexpression of TaCRK2 was found to slow down the penetration and intercellular growth of *Zymoseptoria tritici* [20], and TaCRK2 also exhibited resistance against *Puccinia triticina* infection while positively regulating the hypersensitive reaction (HR) cell death process induced by the pathogen [21].

Furthermore, TaCRK-7A was shown to directly inhibit the growth of *Fusarium pseudo-graminearum* and confer *Fusarium* Crown Rot (FCR) resistance in wheat by promoting the expression of defense genes associated with the jasmonate pathway [22]. Manipulation of the CaCRK5 expression in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annum* was found to modulate resistance against *Ralstonia solanacearum* [16], while GbCRK18 provided resistance to *Verticillium* wilt in *Gossypium barbadense* [7]. The molecular evidence and crystal structure of Gnk2 revealed the importance of fungal mannose binding to specific residues (asparagine-11, arginine-93, and glutamate-104) in Gnk2 for its antifungal activity [5]. These studies collectively highlight the role of CRKs in enhancing plant defense mechanisms against various pathogens and provide insights into their molecular interactions.

The interaction between legumes and rhizobia initiates in the rhizosphere through the exchange of molecular signals between the host's root hairs and the bacteria. The recognition process during this symbiotic relationship involves crucial molecules, namely, plant-derived isoflavonoids and bacterial-derived Nod factors. These signals play a role in suppressing plant defenses and enabling bacterial access to the epidermal root hairs and cortical cells of the host. This access is facilitated by the formation of a tubular infection thread, guiding the rhizobia towards the division of cortical cells. As a result, a nodule primordium is formed, which eventually gives rise to nodules containing symbiosome-specialized cell organelles inclosing nitrogen-fixing bacteroids [23,24].

The establishment of symbiosis involves the temporary suppression of defense responses, which is crucial for symbiosome development and bacterial differentiation. Through the study of legume mutants, researchers have identified several host genes contributing to this suppression, including *Medicago* SymCRK, regulator of symbiosome differentiation (RSD), defective in nitrogen fixation 2 (DNF2), and nodules with activated defense 1 (NAD1) [25–28].

It has been demonstrated that *DNF2* and *SymCRK* affect defense signaling through the ethylene pathway, while *NAD1* regulates immune responses in nodules via the CDPK-Rboh signaling axis [26,29]. Additionally, a recent genetic study conducted on *Aeschynomene evenia* revealed the requirement of *AeCRK* for triggering both root and stem nodulation [30].

In the context of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean), our previous transcriptomic analysis identified several upregulated *CRK* genes in the roots colonized by rhizobia. Among the nine *CRK* genes identified, five were common genes expressed under both mycorrhizal and rhizobial symbiosis conditions, while the remaining four genes *CRK8*, *CRK12*, *CRK20*, and *CRK42* were unique genes expressed exclusively under nodulated conditions. Notably, the upregulation of the *CRK12* gene was particularly significant, as observed in the study by Quezada et al. [10].

Our objective in this study was to conduct a comprehensive functional analysis of the *CRK12* gene in the grain legume *Phaseolus vulgaris*. To achieve this, we employed RNA interference (RNAi) to downregulate and overexpress the *CRK12* gene in transgenic hairy roots of *P. vulgaris*, aiming to investigate its impact on the symbiotic interaction with *Rhizobium*. As a result, the overexpression of *CRK12* genes led to notable changes in root morphology, including increased lateral root and root hair density, as well as longer root hairs. In contrast, silencing of the *CRK12* gene produced contradictory results. During the process of rhizobial colonization, we observed the activity of the *CRK12* promoter in the early stages of symbiosis, specifically at the sites of rhizobia infection units, infection threads, and dividing cortical cells. Quantitative analysis revealed that the overexpression of *CRK12* significantly increased the number of rhizobial infection units and nodule primordia. Moreover, at later stages, these roots exhibited a hypernodulation phenotype compared to the control lines. Conversely, *CRK12*-RNAi roots displayed a phenotype that was contrary to the overexpression lines. Additionally, the ectopic expression of *CRK12* resulted in delayed nodule senescence. Taken together, our findings suggest that *CRK12*, a membrane receptor kinase, is a novel regulator of *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* symbiosis.

## 2. Results

### 2.1. Structure of *CRK12* Gene and Its Expression

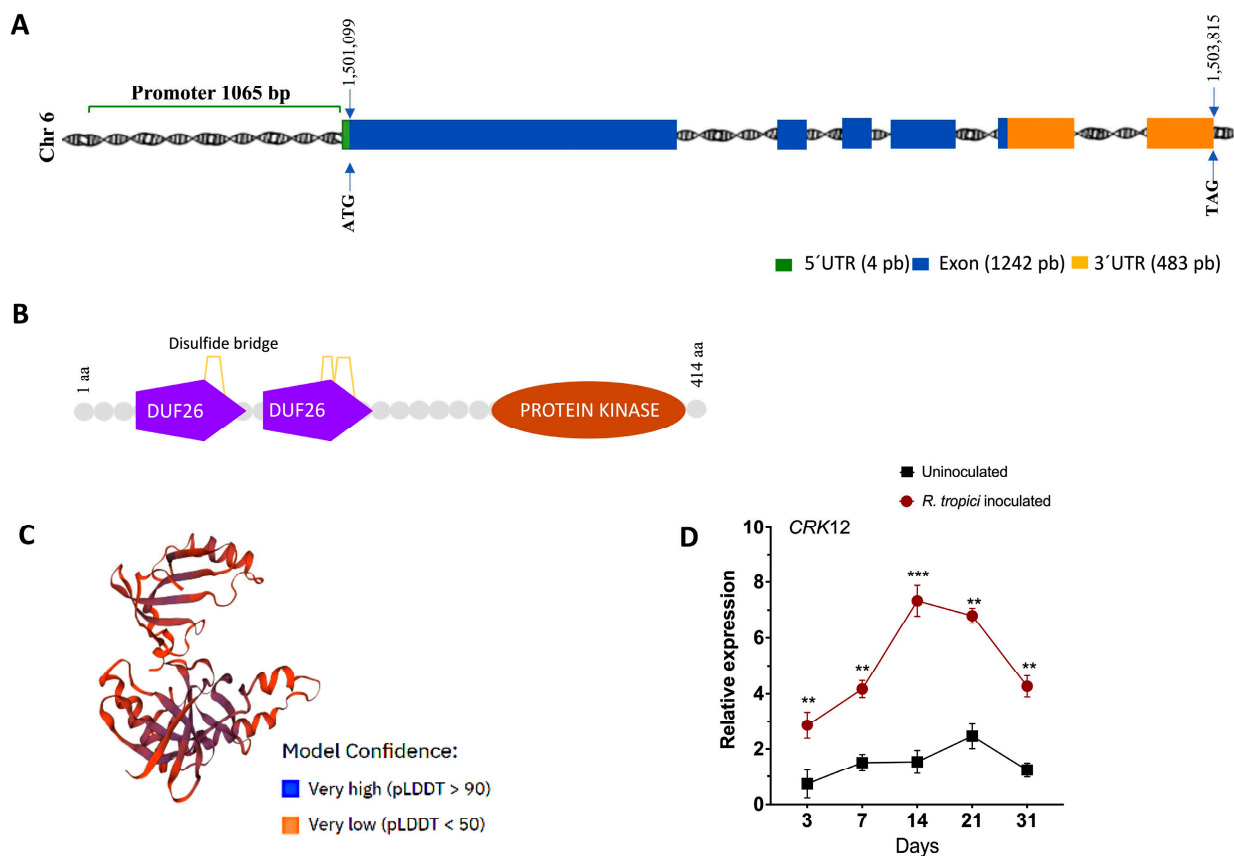
The *Phaseolus CRK12* gene sequence was identified in Phytozome 13 database for gene structure studies. The *CRK12* gene is located on chromosome 6, and its gene structure revealed 5 exons and 4 introns in the CDS region and one intron in the 3' UTR. The mature transcript length was 1729 bp, the CDS was 1242 bp, the 5' UTR was 4 bp, and the 3' UTR was 483 bp (Figure 1A). The *CRK12* encodes 413 amino acids with 2 DUF26 domains composed of 2 alpha-helices and a five-stranded beta-sheet, which forms a compact single-domain architecture with an alpha + beta-fold. The DUF26 domain contains a C-X(8)-C-X(2)-C motif, and its structure predicted by the ExPASy PROSITE tool shows cysteine residues form three intramolecular disulfide bridges: C1-C5, C2-C3, and C4-C6 (Figure 1B,C) [31].

We next sought to determine the temporal expression of *CRK12* in wild-type *P. vulgaris* roots. We inoculated the roots with *R. tropici* and monitored *CRK12* expression at different time points: during early signaling (3 dpi); in nodule primordia (7 dpi); and in young, mature, and senescent nodules (14, 21, and 31 dpi, respectively). A significant surge in *CRK12* transcript abundance was observed in all *R. tropici* inoculated root tissues compared to uninoculated root tissues at all the measured time points (Figure 1D). *CRK12* expression was strongly expressed at 3 and 7 dpi, and maximum expression was observed at 14 dpi in the roots. These results indicate that the *CRK12* gene is temporally expressed from the establishment of the nodule to senescence in *P. vulgaris*.

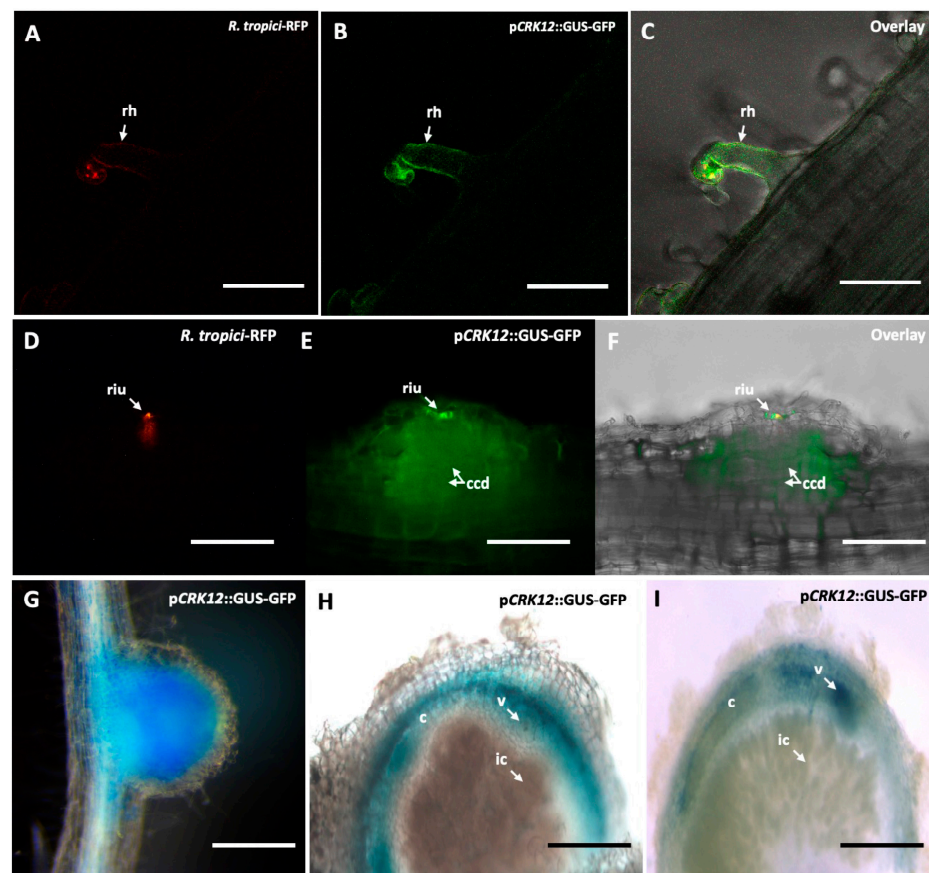
### 2.2. Spatiotemporal Promoter Expression Analysis and Protein Subcellular Localization *CRK12*

To demonstrate spatiotemporal expression of *CRK12* promoter activity in *P. vulgaris* roots under rhizobial symbiosis conditions, we identified and isolated the sequence 1044 bp upstream of the *CRK12* start codon. This isolated promoter fragment was cloned and ligated to drive the expression of two reporters, GUS and GFP, within the vector pBGWFS7.0 [32].

The resultant pBGWFS7.0/*pCRK12::GUS-GFP* binary vector was transformed into the *Agrobacterium rhizogenes* strain K599, which in turn was utilized to generate transgenic hairy roots in *P. vulgaris*. We observed that the transgenic roots at 3 days post-inoculation (dpi) with *R. tropici* (strain CIAT899-RFP) showed *CRK12*-driven GFP expression at the site of rhizobia infection in root hair cells (Figure 2A–C). No such GFP expression was seen in the root hair cells of uninoculated transgenic roots (Supplementary Figure S1). GFP expression intensified during nodule primordium formation specifically at the site of the *Rhizobium* infection and in the dividing cortical cells of the nodule (Figure 2D–F). Transgenic roots containing 14-, 21-, and 28-day-old nodules were assayed for the histochemical localization of GUS. Fourteen-day-old young nodules presented an intense GUS color (Figure 2G). The sections show that *CRK12* was most active in the inner cortical cells and vasculature of the 21-day-old mature nodules (Figure 2H). Upon the onset of nodule senescence (28 days old), GUS activity was decreased in the nodules (Figure 2I). Together, our results showed that at the early stages of nodule development, the *CRK12* promoter was active in ITs, dividing cortical cells of nodule primordia. Strong *CRK12* promoter activity was observed in the young nodules, whereas in the mature nodules, the activity was restricted to the inner cortical cells and vasculature of the mature and senescent nodules of *P. vulgaris*.

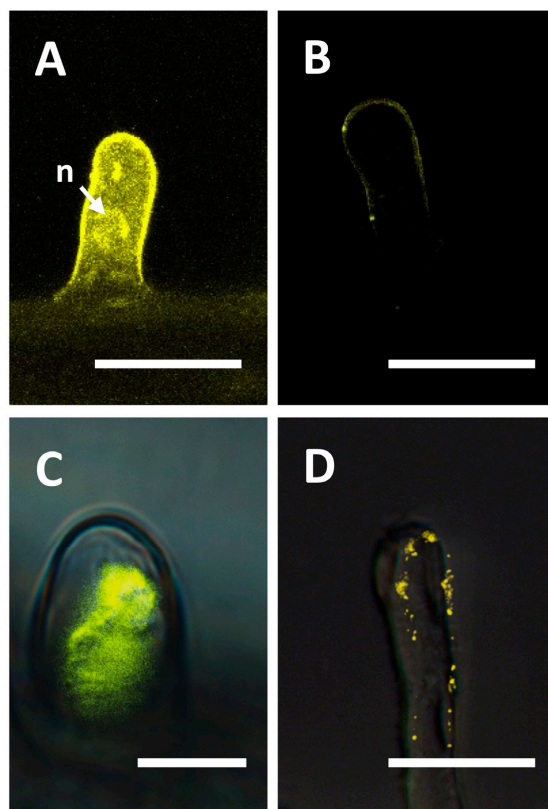


**Figure 1.** Structure and expression of the *Phaseolus CRK12* gene. (A) The gene structure was retrieved from the Phytozome *Phaseolus vulgaris* v2.1 genome database. (B) The domain structure was determined based on the ExPASy PROSITE online tool. (C) Three-dimensional (3D) protein structure alignment of *CRK12* constructed by a homology-modelling server. (D) Quantitative RT-PCR analysis of roots of *P. vulgaris* inoculated with *R. tropici*. Statistical significance was determined using an unpaired two-tailed Student's *t* test (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ), and the data are presented as the means  $\pm$  SDs. The data shown were obtained from three biological replications ( $n > 9$ ).



**Figure 2.** Spatiotemporal expression patterns of the *CRK12* promoter in *P. vulgaris* roots. *Rhizobium tropici* CIAT 899 expressing the RFP marker was inoculated into transgenic hairy roots expressing a pCRK12::GUS-GFP construct, and observations were recorded using a Confocal fluorescence microscope at 3 dpi. (A) Root hair showing *R. tropici* (RFP marker) infection (B) pCRK12 activity detected as GFP fluorescence and (C) overlay. Image of a transgenic root at 6 dpi showing nodule primordia with (D) RFP fluorescence at the site of 'riu', (E) GFP expression at 'riu' and 'ccd', and (F) overlay. The transgenic roots were inoculated with the wild-type *R. tropici* CIAT 899 and assessed to understand the *CRK12* promoter activity in developing nodules using a GUS assay. Representative image of (G) a 14-day-old young nodule, nodule sections showing GUS in (H) a 21-day-old mature nodule and (I) a 28-day-old senescent nodule. dpi, days post-inoculation; rh, root hair; riu, *Rhizobium* infection unit; ccd, cortical cell division; c, cortex; v, vasculature; ic, infected cell. Bars: (A–F) 20 μm; (G) 500 μm; and (H,I) 1 mm.

To investigate the subcellular localization of the CRK12 protein, a pEarleyGate104 vector was used for a transient expression of the CRK12 protein fused to yellow fluorescent protein (YFP). The confocal images of the *P. vulgaris* hairy roots expressing YFP-CRK12 showed that CRK12 was localized to the plasma membrane of the root hair cells (Figure 3B), and hairy roots expressing non-fused YFP were used as controls. As predicted, unfused YFP was observed in both the cytoplasm and nuclei of the root hair cells (Figure 3A). NaCl (250 mM)-induced plasmolysis further confirmed the association of fluorescence with the plasma membrane (Figure 3D). In contrast, plasmolysis of control root hairs showed that YFP fluorescence remained in the cytoplasm (Figure 3C). Simultaneously, we analyzed the subcellular localization using an in silico tool. For this, the full protein sequence of CRK12 was submitted to the protein subcellular localization prediction tool WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html?src=leftbar>, accessed on 15 March 2022). As anticipated, at the subcellular level, the CRK12 protein was targeted to the plasma membrane.



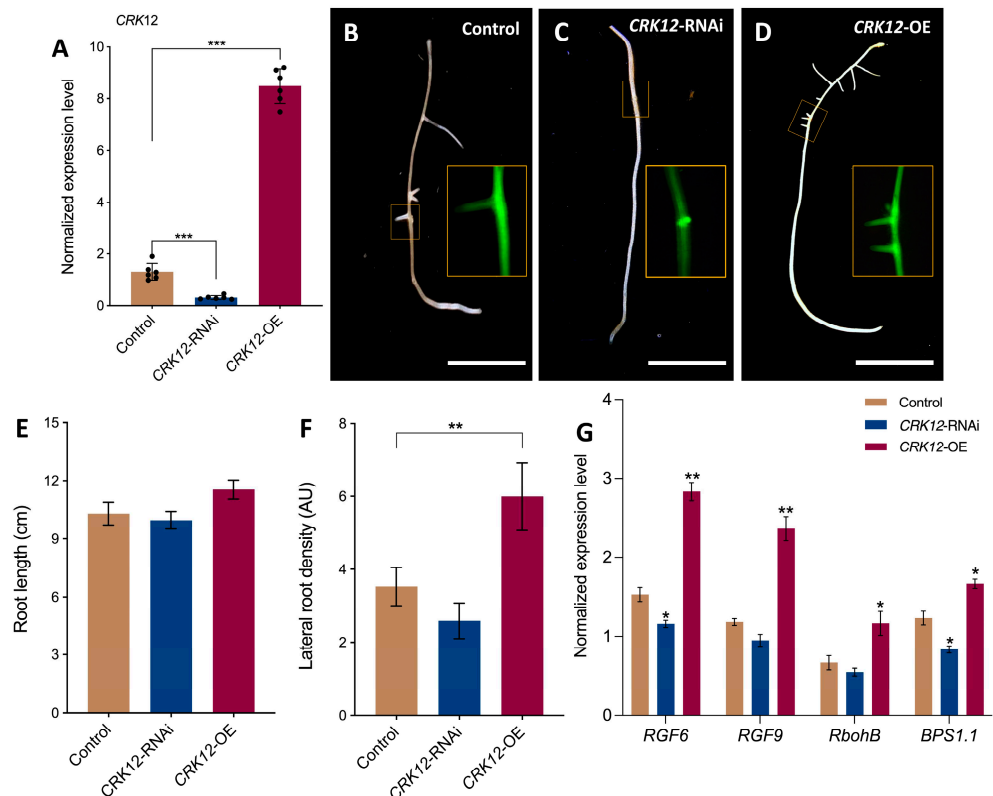
**Figure 3.** Subcellular localization of *Phaseolus CRK12*. The ORF of *PvCRK12* was cloned into pEarley-Gate104 to construct an N-terminal YFP, which was fused and transformed into *P. vulgaris* hairy roots to determine the subcellular localization of the protein. The images were obtained with a confocal microscope equipped with a digital camera. (A) The nonfused 35S-YFP control construct localizes to the cytoplasm and nuclei. (B) The YFP-CRK12 construct exhibits plasma membrane localization in growing root hairs. Plasmolysis was induced in *P. vulgaris* root hair cells by treatment with 150 mM NaCl for 12 min before imaging; (C) control, and (D) YFP-CRK12. Bars = 10  $\mu\text{m}$ . n, nucleus.

### 2.3. *CRK12* Alter Root and Root Hair Morphology

To investigate the function of *CRK12*, we generated *P. vulgaris* with transgenic hairy roots expressing *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE to observe the root and nodule phenotypes under symbiotic conditions. The non-conserved sequence of *CRK12* or complete coding sequence of *CRK12* was isolated from fresh *P. vulgaris* cDNA and cloned into a pK7GWIWG2D(II) and pH7WG2D.1 binary vector downstream of the constitutive 35S promoter, respectively. *Agrobacterium rhizogenes* K599 harboring a 35S-promoter::*CRK12*-RNAi (*CRK12*-RNAi) or 35S-promoter::*CRK12* (*CRK12*-OE) was used to generate the transgenic hairy roots. The quantitative RT-PCR results showed (Figure 4A) a 0.76-fold lesser and 5.44-fold greater *CRK12* transcript abundance in the *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE roots, respectively, compared to the control roots (those expressing the empty pH7WG2D.1 vector), demonstrating transcript downregulation and overexpression in respective roots of the *P. vulgaris* transgenic roots.

The phenotypes of the *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE transgenic and control hairy roots were analyzed at 7 days post-emergence. A pK7GWIWG2D(II)-RNAi vector and pH7WG2D.1 vectors expressing a visible marker, eGFP (Figure 4C,D), were used to select the transgenic roots of EV control and *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE composite transgenic plants (which had transgenic hairy roots but wild-type shoots). The primary root length had marginally decreased in *CRK12*-RNAi and slightly, but not significantly, increased in *CRK12*-OE plants compared to controls (Figure 4C–E). However, the density of lateral roots was found marginally decreased in *CRK12*-RNAi and significantly increased in the *CRK12*-OE plants

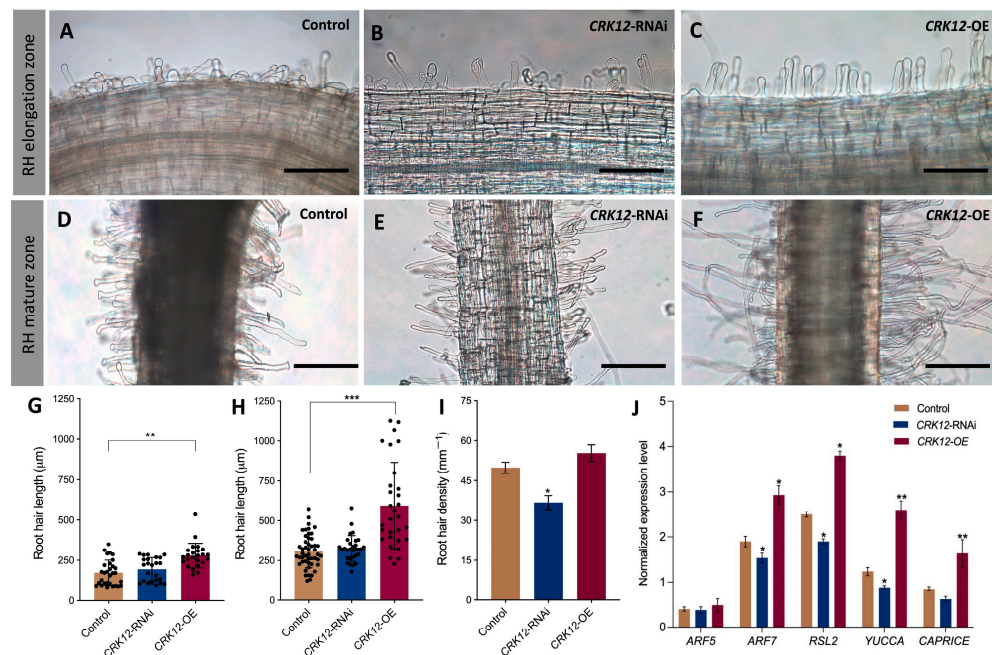
relative to the controls (Figure 4F). Quantitative RT-PCR analysis of these roots showed a significant surge in the abundance of transcripts of root meristem regulatory genes such as the root meristem growth factor-like6 (*RGF6*) and *RGF9*, and respiratory burst oxidase homologues, *RbohB* and *BPS1.1* (*Bypass 1.1*), in the transgenic roots, in which *CRK12* was overexpressed and a transcript downregulation in *CRK12* silenced roots was recorded compared to the control roots (Figure 4G). These results indicated that the overexpression of *CRK12* increased the lateral root numbers, and which could be justified by the abundance of transcripts of genes related to lateral root development in *P. vulgaris*.



**Figure 4.** Quantitative RT-PCR of *CRK12* and phenotypes of transgenic roots. (A) Transcript abundance of *CRK12* in the *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE and control hairy roots at one-week post-emergence (wpe), as measured using quantitative RT-PCR. Phenotypes of the length and lateral root numbers of (B) control, (C) *CRK12*-RNAi, and (D) *CRK12*-OE transgenic hairy roots at one wpe. The inset images show the transgenic nature of hairy roots expressing a visible marker, eGFP. Quantitative analysis of (E) primary root length and (F) lateral root density in *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE and control hairy roots. (G) Expression levels of root meristem regulatory genes, viz., *RGF6*, *RGF9*, *RbohB* and *BPS1.1*, in *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE and control hairy roots, as assessed by quantitative RT-PCR. The statistical significance of differences between the control group and *CRK12*-RNAi or *CRK12*-OE group was determined using an unpaired two-tailed Student's *t* test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). The error bars represent the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM). The data shown were obtained from three biological replications ( $n > 6$  for (A);  $n > 27$  for (D,E);  $n > 9$  for (F)). Bars: (B–D) 1 cm.

Next, the root hair morphology of the transgenic roots at 10 days post-emergence was analyzed. Observations via light microscopy revealed a decrease in the density of root hairs both in root hair elongation (Figure 5A–C) and maturation zone (Figure 5D–F) of *CRK12*-RNAi roots and the contrary was true for the *CRK12*-OE plants compared to the controls. In the elongation and mature zones of *CRK12*-OE roots, the root hairs exhibited a range of lengths, from 279  $\mu\text{m}$  to 594  $\mu\text{m}$ . In comparison, the control group had root hairs measuring 174  $\mu\text{m}$  in the elongation zone and 307  $\mu\text{m}$  in the mature zone, which were comparable to the measurements of *CRK12*-RNAi root hairs, specifically 195  $\mu\text{m}$  and 325  $\mu\text{m}$ , respectively

(Figure 5G,H). However, the root hairs were slightly denser (but not statistically different) on the *CRK12*-OE roots than control roots. In contrast, the density of *CRK12*-RNAi root hairs was significantly lower than that of the control (Figure 5I). Subsequently, several genes, viz., *auxin response factor 5 and 7* (*ARF5*, *ARF7*), *RHD6 (root hair defective 6)-like 2* (*RSL2*), *YUCCA* and *CAPRICE*, which regulate the growth and elongation of root hairs, were analyzed. The subsequent qPCR results showed that *ARF7*, *RSL2*, *YUCCA* and *CAPRICE* transcripts increased significantly in the *CRK12*-OE roots relative to the *CRK12*-RNAi and control roots (Figure 5J). Together, these results suggested that the overexpression of *CRK12* increased root hair length and the expression of root hair regulatory genes.

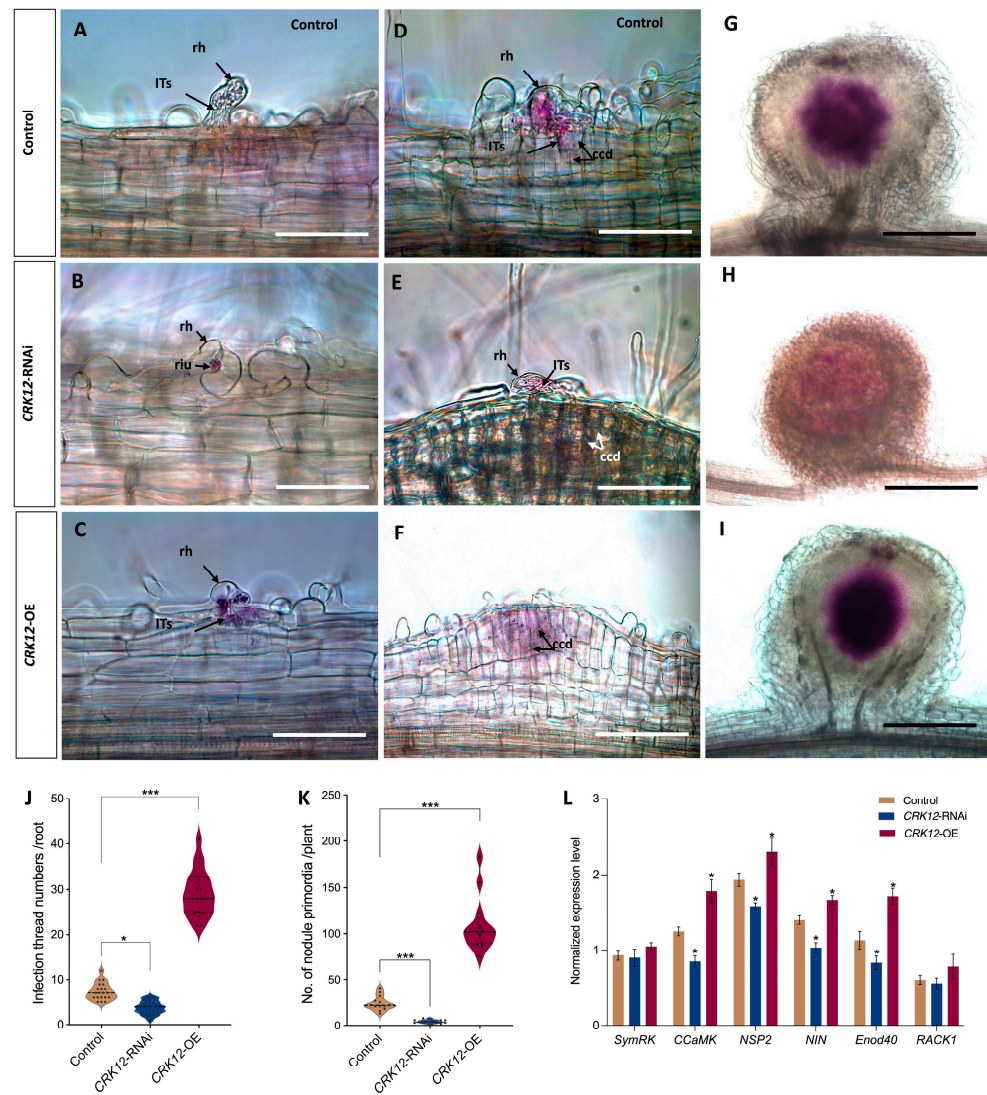


**Figure 5.** Qualitative and quantitative analysis of root hair morphology of transgenic roots. Root hair morphology in the (A–C) RH elongation zone and (D–F) RH mature zone in the control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE transgenic hairy roots at 10 dpe. Quantitative analysis of root hair length at the (G) RH elongation zone and (H) RH mature zone in *CRK12*-OE, *CRK12*-RNAi and control hairy roots. (I) Quantitative analysis of root hair density in the RH mature zone. (J) Expression levels of genes that regulate the growth and elongation of root hairs, viz., *ARF5*, *ARF7*, *RSL2*, *YUCCA* and *CAPRICE*, in *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE and control hairy roots, as measured by quantitative RT-PCR. The statistical significance of differences between control group and *CRK12*-RNAi or *CRK12*-OE group was determined using an unpaired two-tailed Student's *t* test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). The error bars represent the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM). The data shown were obtained from three biological replications ( $n > 27$  for (E–G);  $n > 9$  for (H)). Bars = 500  $\mu$ m.

#### 2.4. *CRK12* Regulates Nodule Numbers and Infection Units in *P. vulgaris*

To assess the *CRK12* overexpression and down-regulation effect on nodulation, we first inoculated the composite transgenic plants with *R. tropici* CIAT 899 expressing a *GUS* reporter [33]. Periodically, the roots were assayed for *GUS* and analyzed to determine the symbiosis phenotype. After one week of CIAT 899 inoculation, the frequency of infection events on the *CRK12*-RNAi revealed to be lower (3.8/plant) and *CRK12*-OE roots was higher (29/plant) than that on the control roots (7.4/plant; Figure 6A–C,J). Light microscopy observations in *CRK12*-OE and *CRK12*-RNAi revealed that the phenotype of early nodule development processes, such as the root hair infection thread progression and cortical cell division of nodule primordium, were like those of the control roots (Figure 6C–F).





**Figure 6.** Response to rhizobia infection of *CRK12* transgenic roots. The control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE transgenic roots were inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899 expressing the GUS reporter, and observations were recorded. GUS-assayed roots showing rhizobial infection units at 7 dpi on (A) control, (B) *CRK12*-RNAi and (C) *CRK12*-OE transgenic roots. The roots showing characteristic (D–F) infection threads and dividing cortical cells in control and *CRK12*-OE transgenic roots. Similarly, GUS-stained young nodules in (G) control, (H) *CRK12*-RNAi and (I) *CRK12*-OE transgenic roots. The data depicted in the violin plot shows (J) infection thread numbers per transgenic root and (K) the average number of nodule primordia per plant. (L) Expression levels of key early signaling genes viz., *SymRK*, *CCaMK*, *NIN*, *Nsp2*, *Enod40* and *RACK1*, in *CRK12*-RNAi, *CRK12*-OE and control hairy roots, as measured by quantitative RT-PCR. The statistical significance of differences between control group and *CRK12*-RNAi or *CRK12*-OE group was determined using an unpaired two-tailed Student's *t* test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). The error bars represent the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM). The data shown were obtained from three biological replications ( $n > 30$ ). dpi, days post-inoculation; riu, rhizobium infection unit; rh, root hair; IT, infection thread; ccd, cortical cell division. Bars: (A–D) 20  $\mu$ m; (E,F) 50  $\mu$ m; and (G–I) 200  $\mu$ m.

Next, we compared the number of nodule primordia in the *CRK12*-RNAi and *CRK12*-overexpression to that of control roots. Significantly higher number of nodule primordia (108/plant) were observed in the *CRK12*-OE roots than in the control roots (24/plant) at 10 days post-inoculation in the contrary, *CRK12* downregulation led to a highly significant reduction in nodule primordia (5/plant; Figure 6K). All the young nodules of the control

and *CRK12*-OE roots were colonized successfully with rhizobia, whereas the *CRK12*-RNAi show poor rhizobia density (Figure 6G–I).

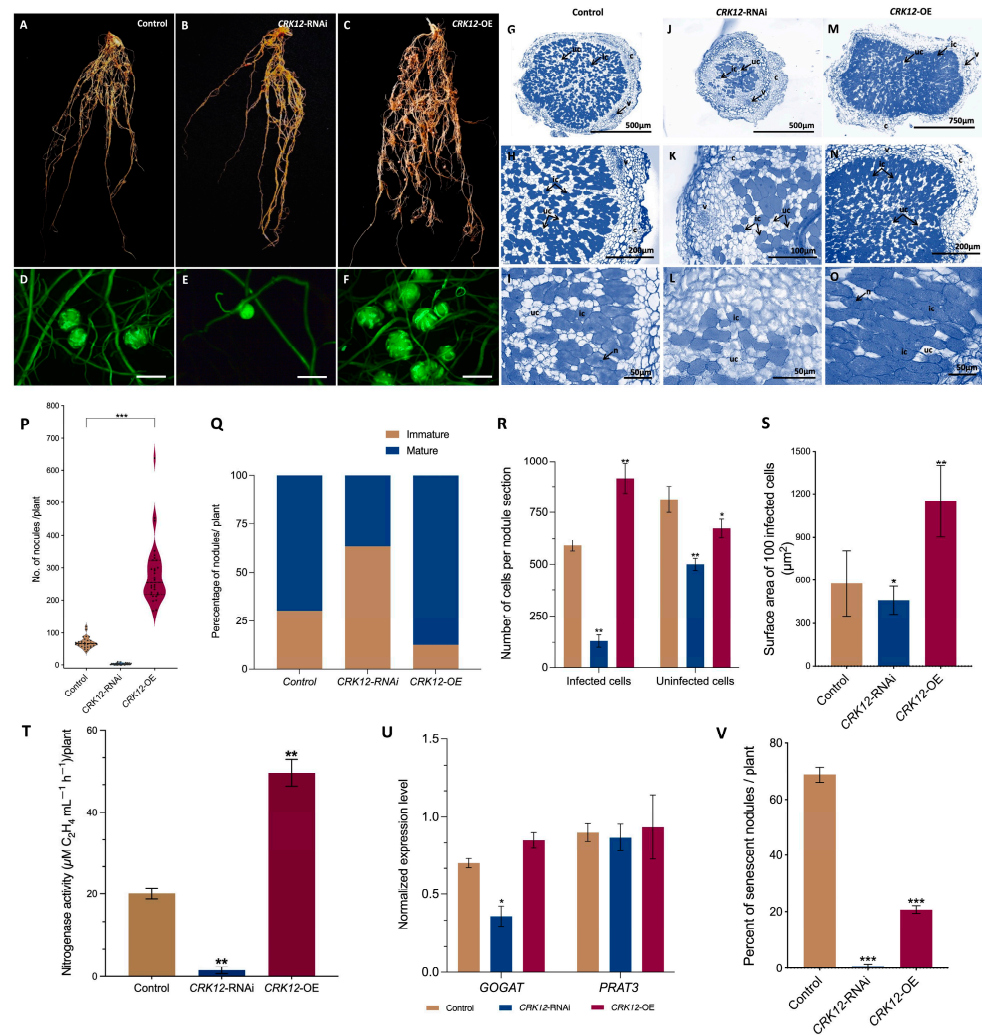
To determine whether this phenotype is associated with changes in the expression of genes involved in early rhizobial signaling, we measured the expression levels of some of the key early signaling genes, such as *SymRK* (*symbiosis receptor kinase*), *CCaMK* (*calcium-calmodulin kinase*), *NIN* (*nodule inception*), *Nsp2* (*nodule signaling pathway 2*), *Enod40* (*early nodulin 40*) and *RACK1* (*receptor for activated C kinase 1*). Based on the quantitative RT-PCR results, *CCaMK*, *NIN*, *Nsp2* and *Enod40* showed a significant surge in transcript levels in the *CRK12*-OE transgenic roots compared with the *CRK12*-RNAi and control roots, whereas *SymRK* and *RACK1* showed slightly higher expression in the *CRK12*-OE roots relative to controls (Figure 6L). Together, our data indicate that *CRK12* functions during the early stages of nodule formation and development, which is reflected in terms of increased rhizobial infection units, nodule primordial numbers and increased expression of early signaling genes in *P. vulgaris*.

### 2.5. *CRK12* Overexpression Results in Hypernodulation in *P. vulgaris* Transgenic Roots

While we were trying to identify the impact of the *CRK12* transcript down-regulation on root nodule symbiosis, at 21-day post inoculation we found that the nodule numbers remained critically low. The *CRK12*-RNAi transgenic roots exhibited fewer number of nodules and were remained to be juvenile/primordial implying their failure to reach to mature nodule stage. In addition, the transgenic *CRK12*-OE roots shows increased nodule numbers compared to control transgenic roots (Figure 7A–F). Furthermore, the quantitative data revealed a 4-fold higher number of nodules in the *CRK12*-OE roots than in the control roots. The average number of nodules was 71.7 per control plant, 4 per RNAi and 289.3 per *CRK12*-OE plant (Figure 7P). Among them, 87.1 percent of the nodules were mature pink at 21 dpi, and the remaining were immature white nodules in the *CRK12*-OE roots. In control 69.7 percent of the nodules were pink, and 30.3 percent were white. Nevertheless, the *CRK12*-RNAi roots show 36.8 and 63.2 percent pink and white nodules, respectively (Figure 7Q).

The transverse section of mature control nodules (Figure 7G–I) depicted typical histological characteristics of a determinate nodule, such as the outer and inner cortex, nodule vasculature, and nodule core [34]. The nodule core tissue was comprised of infected cells harboring *R. tropici* CIAT 899 and uninfected cells (Figure 7I). On the other hand, the *CRK12*-RNAi nodules were smaller in size. However, the nodule structural details remained comparable to controls (Figure 7J–O). The most interesting detail was in the highly reduced number of infected cells in the *CRK12*-RNAi nodules (Figure 7L). The *CRK12*-OE nodules displayed characteristics similar to control (Figure 7G,H,M,N) except the nodule core showing a significant increase in infected cell density compared to the control and *CRK12*-RNAi (Figure 7R). On the contrary, the uninfected cells numbers were fewer than the control. Additionally, the infected cell area in the *CRK12* overexpressed nodules were significantly larger ( $1151 \mu\text{m}^2/100$  cells) than the control ( $577 \mu\text{m}^2/100$  cells) and *CRK12*-RNAi ( $460 \mu\text{m}^2/100$  cells) (Figure 7S).

Subsequently, at 21 dpi, we estimated the nitrogen fixation rate in control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE transgenic roots and results showed a significant increase of nitrogen fixation in the *CRK12*-OE nodules compared to controls; at the same time, *CRK12*-RNAi demonstrated highly reduced abilities to fix nitrogen (Figure 7T). Next, we measured key organic nitrogen export-related genes, such as *Gln synthetase* and *glutamate synthase* (*GOGAT*), and *glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase 3* (*PRAT3*) in the mature nodules. The quantitative RT-PCR results showed similar expression patterns for both *GOGAT* and *PRAT3* in the *CRK12*-OE and control nodules at 21 dpi, in *CRK12*-RNAi roots the *GOGAT* significantly decreased compared to control (Figure 7U). At 35 dpi, the nodule morphology showed that 70% of control root nodules were senescent, and only 21% of the *CRK12*-overexpressing nodules were senescent. These results indicate the prolonged nitrogen fixing capabilities of the *CRK12*-overexpressing root nodules (Figure 7V).



**Figure 7.** Nodule phenotype and RT-qPCR analysis of *CRK12* transgenic roots. Representative images of transgenic whole root system of (A) control, (B) *CRK12*-RNAi and (C) *CRK12*-OE showing nodules numbers at 21 days post inoculation with *Rhizobium tropici* CIAT899. GFP expression of the nodulated transgenic roots of the (D) control, (E) *CRK12*-RNAi and (F) *CRK12*-OE under a fluorescence stereomicroscope. Toluidine blue-stained transverse sections of (G–I) control and (J–L) *CRK12*-RNAi, (M–O) *CRK12*-OE nodules revealing structural features as shown in light micrographs. (P) Quantitative analysis showing the average number of mature nodules per plant. (Q) Percentage of nodules per control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE composite plants at 21 days post inoculation. (R) Average number of infected and uninfected cells, and (S) Infected cell-surface area of transgenic nodules. (T) Nitrogenase activity in control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE nodulated transgenic roots inoculated with at 21 dpi, as determined by an acetylene reduction assay. (U) Expression levels of *GOGAT* and *PRAT3* genes in the control and *CRK12* transgenic nodules. Quantitative RT-PCR was performed using freshly isolated RNA from 21-day old mature nodules of control and *CRK12*-OE. Error bars represent the means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). (V) Percentage of senescent nodules per control and *CRK12*-OE composite plants at 35 days post inoculation. The statistical significance of differences between control group and *CRK12*-RNAi or *CRK12*-OE group was determined using an unpaired two-tailed Student's *t* test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). The error bars represent the means  $\pm$  standard errors of the means (SEM). The data shown were obtained from three biological replicates ( $n > 30$ ). dpi, days post-inoculation; uc, uninfected cell; ic, infected cell; c, cortex; n, nucleus; v, vascular bundles. Bars: (D–F) 2 mm.

Together, these data suggest that the transgenic roots that expressed the *CRK12*-RNAi vector severely affected root nodule numbers and their nitrogen fixing abilities.

On the contrary, overexpression of *CRK12* showed a phenotype with increased nodules numbers and infected cell density and size. Furthermore, these overexpressed nodules fixed more nitrogen and the presence of key nitrogen export genes in these nodules confirmed the function of these nodules.

### 3. Discussion

Receptor-like kinases (RLKs) possess distinct extracellular domains that enable the recognition of different ligands and facilitate the transduction of various extracellular signals, including those involved in symbiosis [35,36]. Symbiosis is initiated by legumes and rhizobia exchanging signaling molecules as part of a bidirectional communication process. In response to host-secreted flavones or isoflavones, rhizobia synthesize and discharge nod factors, also known as lipo-chitooligosaccharides (LCOs) [37]. These LCOs are perceived by LysM-type plasma membrane receptors such as *NFR1*, *NFR5*, and *NFRε* in *Lotus japonicus*; among them, both *NFR1* and *NFR5* were essential for the nod factor signaling [38,39], whereas *NFRε* may increase signaling in root epidermal cells [40]. Downstream of LysM-type receptors, a cascade of symbiotic signaling genes and transcription factors (TFs) function in triggering infection thread formation, nodule organogenesis and other processes in legume roots [41].

The largest group of plant RLKs consists of cysteine-rich receptor kinases or proteins that possess the DUF26 domain. However, the biological functions of these RLKs in plant symbiotic interactions have been relatively understudied. Earlier investigations in *Medicago truncatula* have demonstrated that mutations in *symCRK* result in the formation of nodules exhibiting defense-like reactions, bacterial death, and ultimately an inability to fix nitrogen [26,42,43]. In a previous study focused on *P. vulgaris*, it was indicated that potential *PvCRK* genes may play a role in regulating these diverse symbiotic interactions [10]. Additionally, more recent research had discovered that *AeCRK* is crucial for initiating root and stem nodulation in *Aeschynomene evenia* [30].

The main outcome of our preliminary investigations in *P. vulgaris* led us to perform a functional characterization of *CRK12* in the current study. This investigation aimed to elucidate the specific role of *CRK12* in the interactions between *P. vulgaris* and *Rhizobium tropici*. *CRK12* in *Phaseolus* is characterized by two DUF26 domains that contain a C-X(8)-C-X(2)-C motif similar to other CRKs [10]. Although the precise function of this domain remained unknown, previous reports suggested its potential involvement in redox regulation and protein–protein interactions [44,45]. Interestingly, the temporal expression patterns of *CRK12* in plants inoculated with *Rhizobium* symbionts showed an increase in transcript levels at all stages of symbiosis. The analysis of *cis*-elements in the regulatory region of *CRK12* indicated the absence of symbiosis-specific transcription factors [10]. However, an abundance of transcription factors involved in phytohormone regulation was identified, suggesting the presence of a potential signaling mechanism [46,47] (Lin et al., 2020; Li et al., 2022). To further investigate this, we examined the expression of the *CRK12* gene promoter, which yielded intriguing results. The *CRK12* promoter exhibited expression in *Rhizobium* infection units, infection threads, dividing cortical cells, inner cortex, and vasculature of mature nodules.

The roles of *CRKs* in growth and developmental aspects of plants have been previously characterized [6]. Herein, the overexpression of *CRK12* resulted in an increased density of lateral roots as well as root hairs, and root hairs grew longer both in the root hair elongation and in the maturation zones in comparison to the controls. Conversely, when *CRK12* expression was suppressed using RNA interference (RNAi), we observed a contrasting phenotype in the roots and root hairs, thereby reinforcing the significance of this gene in the development of roots and root hairs. Interestingly, our findings differ from previous studies on *Arabidopsis* *CRK28*, *CRK29*, and *CRK42* mutants, where mutations in *CRK* genes resulted in longer primary roots and denser lateral roots [6,13].

To gain insights into the underlying mechanism behind the altered root phenotype, we conducted transcript analysis of key genes involved in regulating root hair length, including

auxin responsive factors (*ARF5*, *ARF7*) [48] and the auxin biosynthesis gene *YUCCA* [49]. We found significantly higher expression levels of these genes in *CRK12*-overexpressing (*CRK12*-OE) roots compared to the *CRK12*-RNAi and control roots. Additionally, transcripts related to root growth regulation, such as *RGF6*, *RGF9* [50], *RbohB* [51], and *BPS1.1* [52], were also induced in *CRK12*-OE roots. These findings suggested a potential mechanism underlying the observed root and root hair phenotypes. It is important to note that root hairs serve as entry points for rhizobia, and an increased density of root hairs could enhance the opportunity for symbiotic interactions with these microorganisms.

Previous studies have demonstrated the involvement of CRKs in immune responses during plant–pathogen interactions [17,53]. These CRKs perceive signals through extracellular, transmembrane, and intracellular domains, leading to the activation of MAPK pathways and subsequent gene transcription [54]. In *Medicago truncatula*, the participation of SymCRK, a cysteine-rich receptor-like kinase, has been reported in mutualistic interactions, such as symbiosis [43]. In this study, we focused on investigating the effects of the silencing and overexpression of *CRK12* on rhizobial nodule symbiosis (RNS). In *Phaseolus* plants, overexpression of *CRK12* resulted in a remarkable rise in the occurrence of infection events, with 108 events per plant, which was significantly higher compared to the controls with only 24 events per plant. This increase was also observed in the number of nodules, as *CRK12*-OE led to 289.3 nodules in the roots, representing a fourfold increase compared to the control group which had 71.7 nodules. Conversely, the silencing of *CRK12* resulted in a notable decrease in both infection events (5 events per plant) and nodule numbers (4 nodules per plant). Furthermore, the few nodules observed in the *CRK12*-RNAi plants displayed similar anatomical characteristics to the control but had very few infected cells. In contrast, histological observations of *CRK12*-overexpressing (*CRK12*-OE) nodules revealed an increase in both the number and size of infected cells. These findings are consistent with the nitrogen-fixing abilities exhibited by both *CRK*-RNAi and *CRK*-OE nodules. Previous reports involving SymCRK in *M. truncatula* mutants did not show a significant change in nodule numbers however, most of the nodules developed were nonfunctional necrotic nodules [26]. Further, the investigation of *Aeschynomene evenia*'s stem and root nodule development indicated that *AeCRK*, in conjunction with other symbiotic pathway genes, was essential for the process.

In *Medicago*, the overexpression of a lectin-like receptor kinase (LecRK), a potential rhizobial lipochitooligosaccharide-binding RLK, has been shown to increase nodule numbers [55]. In the present study, the observed increase in infection events and nodule numbers upon overexpression of *CRK12*, as well as the contrasting effect when *CRK12* transcript was downregulated, suggest a potential role of *CRK12* as a receptor for rhizobial nod factors. Furthermore, in *Phaseolus* plants, the overexpression of *CRK12* led to the upregulation of *respiratory burst oxidative homologue B* (*RbohB*), resulting in increased levels of reactive oxygen species. Previous studies have reported the involvement of *RbohB* in maintaining symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in *Phaseolus* nodules [56]. Notably, CRKs have been implicated in direct ROS sensing due to the redox regulation possibilities within their extracellular protein domain [6]. Hence, it is plausible to propose that the crosstalk between *CRK12* and ROS signaling may contribute to the observed increase in nodule numbers.

In conclusion, our investigations provide compelling evidence of the significant influence exerted by *CRK12* on the development of root hairs and root nodules, as well as nitrogen fixation in *P. vulgaris*. These findings underscore the undeniable role played by *CRK12* in governing the mutualistic association between *R. tropici* and *P. vulgaris*, as downregulation or overexpression of *CRK12* transcripts directly impact these processes. Finally, we suggest that harnessing symbiosis-specific gene(s) like CRKs in breeding programs for genetic modification presents exciting opportunities to enhance legume crops, leading to improved nitrogen fixation and supporting more sustainable and productive agricultural practices.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Plant Material and Rhizobium Inoculation

Seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa obtained from the Instituto de Biotecnología, UNAM, Mexico, were used in this study. The seeds were surface disinfested and germinated, as described previously by Nanjareddy and colleagues [57]. The seedlings were then transplanted into sterile vermiculite in the greenhouse under a 16 h photoperiod at  $28 \pm 1$  °C. The plants were irrigated with Broughton and Dilworth (B&D) [58] nutrient media with limited amounts of nitrogen (2 mM KNO<sub>3</sub>) to promote root nodulation. For the induction of nodules, 1 mL of *Rhizobium tropici* (wild-type strain CIAT899 or that expressing RFP or a GUS reporter) at an OD<sub>600</sub> dilution of 0.6 was inoculated. Root or nodule tissues were collected at various time points, and the samples were immediately immersed in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C.

### 4.2. Gene and Protein Structure

The exon–intron structure was determined using the genomic sequence of the *CRK12* gene in Phytozome 13. *Phaseolus CRK12* protein domains were predicted by PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>, accessed on 29 April 2022), and their secondary structure was predicted using the Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org>, accessed on 29 April 2022).

### 4.3. Promoter Construction and Composite Plant Production

To analyze the spatiotemporal expression patterns of the *CRK12* promoter during nodulation, a 1044 bp promoter fragment was amplified from *P. vulgaris* genomic DNA using specific primers (Supplementary Table S1) and cloned into a pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The Gateway LR reaction was performed between the entry vector pENTR/D-TOPO-*pCRK12* and the destination vector pBGWSF7.0 according to the manufacturer's (Invitrogen) instructions. The sequence of the resultant pBGWSF7.0-*pCRK12::GUS-GFP* was verified.

To generate the *P. vulgaris* composite transgenic plants (whose hairy roots expressed the recombinant plasmid vector), 2-day-old germinated seedlings were infected with *Agrobacterium rhizogenes* K599 strains carrying the pBGWSF7.0-*pCRK12::GUS-GFP* construct. The empty pBGWSF7.0 vector was used as a control. The plasmid constructs were introduced into *A. rhizogenes* strain K599 separately. All the composite transgenic plants were generated as described by Nanjareddy et al. [57], after which they were transplanted into sterile vermiculite and inoculated with the wild-type *Rhizobium tropici* CIAT 899 or that expressing RFP markers, as previously described by Nanjareddy & colleagues [57].

### 4.4. Subcellular Localization Analysis of CRK12

The open reading frames of *CRK12* were amplified from cDNA freshly prepared from 10-day-old *P. vulgaris* seedlings using the appropriate oligonucleotides (Supplementary Table S1). The amplicon was cloned into a pENTR/D-TOPO vector. The Gateway LR reaction was performed between the entry vector pENTR/D-TOPO-*CRK12* and the destination vector pEarleyGate104 according to the manufacturer's (Invitrogen) instructions. The N-terminus of the resulting binary vector consisted of fusion of *CRK12* and yellow fluorescent protein (YFP). A pEarleyGate104 vector expressing YFP was used as a control.

### 4.5. Cloning of CRK12 Overexpression and Silencing Constructs

The primer pair used (Supplementary Table S1) was designed to amplify the open reading frame of the *CRK12* gene (Phvul.006G006800) from freshly prepared *P. vulgaris* seedling cDNA. The amplified fragment of 1271 bp (1242 bp ORF + 29 bp 3'UTR) was cloned into a pENTR/D-TOPO vector. The Gateway LR reaction was performed between the entry vector pENTR/D-TOPO-*CRK12* and the destination binary vector pH7WG2D.1, which was under the control of the constitutive 35S promoter [32] according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The sequence of the resultant pH7WG2D.1-*CRK12*-OE was verified. The empty pH7WG2D.1 vector was used as a control in the experiments.

The *CRK12*-RNAi silencing construct was created through the cloning of a non-conserved 280 bp fragment from the 3'UTR of *CRK12*. This fragment was amplified using common bean root cDNA as a template and specific primers (Supplementary Table S1). Subsequently, the fragment was inserted into the pENTR/D-TOPO vector, and the resulting construct was combined with the binary vector pK7GWIWG2D(II) using Gateway Technology (Invitrogen Gateway cloning technology). To ensure the correct orientation of the inserted fragments in the *CRK12*-RNAi construct, PCR and sequencing were conducted for verification. The empty pK7GWIWG2D(II) vector was used as a control in the experiments.

The composite transgenic plants were generated as described above. After removing the wild-type primary root from the composite transgenic plants, we selected the hairy roots under an epifluorescence microscope with a GFP filter with an excitation of 488 nm and an emission fluorescence ranging from 510 to 540 nm. At the same time, the non-transformed roots were removed, transplanted into sterile vermiculite and then inoculated with the *R. tropici* CIAT 899 strain.

#### 4.6. Expression Analysis

Total RNA was extracted from frozen tissues using a Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions. Contaminant DNA among the RNA samples was eliminated by incubating the samples with RNase-free DNase ( $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 15 min. The RNA integrity and concentration were verified via 1% agarose gel electrophoresis and via spectrometry with a NanoDrop™ 2000 instrument, respectively.

Quantitative PCR was performed using an iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green following the manufacturer's (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) recommendations in a Bio-Rad iQ™ 5 real-time PCR detection system. Each reaction had included 40 ng of RNA as a template. A control sample without reverse transcriptase was included to confirm the absence of contaminant DNA. Relative gene expression levels were calculated using the formula  $2^{-\Delta\text{CT}}$ , where the cycle threshold value ( $\Delta\text{CT}$ ) is the CT of the gene of interest minus the CT of the reference gene. The relative expression values, normalized to those of two reference genes (*Phaseolus EF1a*—'elongation factor 1-alpha' and *IDE*—'insulysin'), were calculated according to the methods of Vandesompele et al. [59]. The gene-specific oligonucleotides used in the present study are listed in Supplementary Table S1.

#### 4.7. Root Hair Measurements

The number of root hairs was determined in 1 mm long sections within the root hair elongation zone and root hair mature zone of the control, *CRK12*-OE and *CRK12*-RNAi transgenic hairy roots at 10 days post emergence. The root hair length was measured using the LAS EZ 3.4.0.272 suite, and the density was calculated according to the methods of Ma et al. [60].

#### 4.8. Nodule Phenotype and Microscopy

The uninoculated and *R. tropici* CIAT899 (wild type)-inoculated transgenic root samples in which p*CRK12*::GUS-GFP or *CRK12* was overexpressed or *CRK12* silenced were inoculated with *R. tropici* CIAT899 expressing GUS (harbouring pGUS 32) [61] or CIAT899 expressing RFP. The GUS assay was performed as described by Jefferson [62]. Root and nodule tissues were transferred to a 3 cm diameter Petri dishes containing a GUS staining solution and incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the dark until blue or magenta spots were visible (approximately 8–12 h). The GUS-stained roots were clarified using 0.5% sodium hypochlorite for 8 h and then examined for nodule symbiosis phenotype, viz., infection threads, nodule primordia, and nodules, under a light microscope (Leica, DMLB bright-field microscope, Buffalo Grove, IL, USA). The GUS-stained mature nodules were sectioned using a razor blade. The sections were mounted in 10% glycerol and observed under a light microscope. The GUS-stained transgenic roots expressing the p*CRK12*::GUS-GFP promoter were

observed under a stereomicroscope (Leica), and images of young and mature nodules were obtained.

The transgenic roots that expressed subcellular localization construct or the *CRK12* promoter construct was observed under a Zeiss LSM 710-NLO confocal microscope (Centro de Investigaciones en Optica A.C., León, Mexico) with a 25X 0.8 NA oil immersion objective. GFP was excited with an argon laser (488 nm), and the fluorescence from 510 to 540 nm was recorded. YFP was excited with the 514 nm line of the argon laser, and the fluorescence from 519 to 620 nm was recorded. RFP was excited with a solid-state laser (561 nm), and the fluorescence was filtered using a 640-/650-nm bandpass filter. The nodule cross sections were obtained by paraffin embedding and semithin sectioning following the protocol by Chen et al. [63]. The tissues were fixed in FAA fixative containing 10% formalin, 5% glacial acetic acid, 50% ethanol and 35% deionized water. Post fixation, the tissues were processed through a dehydration series of ethanol solutions (from 30% to 100%). The paraffin embedded tissues were sectioned using the Leica RM2125 RTS microtome and stained with 0.1% Toluidine blue. Acetylene reduction assay was performed following the method described by Burris [64]. 21 dpi nodulated transgenic roots of control, *CRK12*-RNAi and *CRK12*-OE were incubated in acetylene gas for 30, 60 and 90 min, and the ethylene production was measured by gas chromatography in a Hewlett Packard 5890 Series II (Wilmington, DE, USA).

#### 4.9. Statistical Analysis

All the statistical data were analyzed by Student's *t* test using Prism 9.0 software (GraphPad Software Inc., Boston, MA, USA). In the figures, single, double, and triple asterisks were used indicate differences that are significant ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ) or highly significant ( $p < 0.001$ ), respectively.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241411720/s1>.

**Author Contributions:** M.-K.A. conceived the research, designed the experiments and acquired the funding. A.M.L. performed all the experiments. K.N. assisted in methodology and bacterial cultures. L.B. isolated and cloned the overexpression construct. V.P. performed confocal microscopy. J.A.V.-N. did nitrogenase activity. A.M.L., M.L. and K.N. analyzed the results and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The authors wish to acknowledge the CONACyT: CF-MI-20191017134234199-316538 to M.K.A for funding this work, and was partially supported by the DGAPA/PAPIIT-UNAM grant no. IN216321 to K.N and IN213221 to M.K.A.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** We are grateful to the SGC-LII certified lab (ISO 9001: 2015), ENES-Unidad Leon for providing facilities during this work. We thank Gabriel X. Garcia for cloning the promoter construct piolet experiments. We thank Govindappa Melappa, Davangere University, India for the statistical analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Santoni, V.; Vinh, J.; Pflieger, D.; Sommerer, N.; Maurel, C. A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem. J.* **2003**, *373*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Alexandersson, E.; Saalbach, G.; Larsson, C.; Kjellbom, P. Arabidopsis Plasma Membrane Proteomics Identifies Components of Transport, Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 1543–1556. [[CrossRef](#)]
3. Marmagne, A.; Rouet, M.-A.; Ferro, M.; Rolland, N.; Alcon, C.; Joyard, J.; Garin, J.; Barbier-Brygoo, H.; Ephritikhine, G. Identification of New Intrinsic Proteins in Arabidopsis Plasma Membrane Proteome. *Mol. Cell. Proteom.* **2004**, *3*, 675–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Chen, Z. A Superfamily of Proteins with Novel Cysteine-Rich Repeats. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 473–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Miyakawa, T.; Hatano, K.-I.; Miyauchi, Y.; Suwa, Y.-I.; Sawano, Y.; Tanokura, M. A Secreted Protein with Plant-Specific Cysteine-Rich Motif Functions as a Mannose-Binding Lectin That Exhibits Antifungal Activity. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 766–778. [[CrossRef](#)]
6. Bourdais, G.; Burdiak, P.; Gauthier, A.; Nitsch, L.; Salojärvi, J.; Rayapuram, C.; Idänheimo, N.; Hunter, K.; Kimura, S.; Merilo, E.; et al. Large-Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to Oxidative Stress. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005373. [[CrossRef](#)]
7. Li, T.-G.; Zhang, D.-D.; Zhou, L.; Kong, Z.-Q.; Hussaini, A.S.; Wang, D.; Li, J.-J.; Short, D.P.G.; Dhar, N.; Klosterman, S.J.; et al. Genome-Wide Identification and Functional Analyses of the CRK Gene Family in Cotton Reveals GbCRK18 Confers Verticillium Wilt Resistance in *Gossypium barbadense*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1266. [[CrossRef](#)]
8. Chern, M.; Xu, Q.; Bart, R.S.; Bai, W.; Ruan, D.; Sze-To, W.H.; Canlas, P.E.; Jain, R.; Chen, X.; Ronald, P.C. A Genetic Screen Identifies a Requirement for Cysteine-Rich-Receptor-Like Kinases in Rice NH1 (OsNPR1)-Mediated Immunity. *PLoS Genet.* **2016**, *12*, e1006049. [[CrossRef](#)]
9. Burdiak, P.; Rusaczek, A.; Witoń, D.; Głow, D.; Karpiński, S. Cysteine-rich receptor-like kinase CRK5 as a regulator of growth, development, and ultraviolet radiation responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 3325–3337. [[CrossRef](#)]
10. Quezada, E.-H.; García, G.-X.; Arthikala, M.-K.; Melappa, G.; Lara, M.; Nanjareddy, K. Cysteine-Rich Receptor-Like Kinase Gene Family Identification in the Phaseolus Genome and Comparative Analysis of Their Expression Profiles Specific to Mycorrhizal and Rhizobial Symbiosis. *Genes* **2019**, *10*, 59. [[CrossRef](#)]
11. Delgado-Cerrone, L.; Alvarez, A.; Mena, E.; De León, I.P.; Montesano, M. Genome-wide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress signals triggering plant immunity. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207438. [[CrossRef](#)]
12. Yadeta, K.A.; Elmore, J.M.; Creer, A.Y.; Feng, B.; Franco, J.Y.; Rufian, J.S.; He, P.; Phinney, B.; Coaker, G. A Cysteine-Rich Protein Kinase Associates with a Membrane Immune Complex and the Cysteine Residues Are Required for Cell Death. *Plant Physiol.* **2016**, *173*, 771–787. [[CrossRef](#)]
13. Pelagio-Flores, R.; Muñoz-Parra, E.; Barrera-Ortiz, S.; Ortiz-Castro, R.; Saenz-Mata, J.; Ortega-Amaro, M.A.; Jiménez-Bremont, J.F.; López-Bucio, J. The cysteine-rich receptor-like protein kinase CRK28 modulates *Arabidopsis* growth and development and influences abscisic acid responses. *Planta* **2019**, *251*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Arellano-Villagómez, F.C.; Guevara-Olvera, L.; Zuñiga-Mayo, V.M.; Cerbantez-Bueno, V.E.; Verdugo-Perales, M.; Medina, H.R.; De Folter, S.; Acosta-García, G. *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like protein kinase CRK33 affects stomatal density and drought tolerance. *Plant Signal. Behav.* **2021**, *16*, 1905335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lee, D.S.; Kim, Y.C.; Kwon, S.J.; Ryu, C.-M.; Park, O.K. The *Arabidopsis* Cysteine-Rich Receptor-Like Kinase CRK36 Regulates Immunity through Interaction with the Cytoplasmic Kinase BIK1. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1856. [[CrossRef](#)]
16. Mou, S.; Meng, Q.; Gao, F.; Zhang, T.; He, W.; Guan, D.; He, S. A cysteine-rich receptor-like protein kinase CaCKR5 modulates immune response against *Ralstonia solanacearum* infection in pepper. *BMC Plant Biol.* **2021**, *21*, 382. [[CrossRef](#)]
17. Chen, K.; Du, L.; Chen, Z. Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2003**, *53*, 61–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, X.; Han, X.; Shi, R.; Yang, G.; Qi, L.; Wang, R.; Li, G. *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase 45 positively regulates disease resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *73*, 383–391. [[CrossRef](#)]
19. Yeh, Y.-H.; Chang, Y.-H.; Huang, P.-Y.; Huang, J.-B.; Zimmerli, L. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 322. [[CrossRef](#)]
20. Saintenac, C.; Cambon, F.; Aouini, L.; Verstappen, E.; Ghaffary, S.M.T.; Poucet, T.; Marande, W.; Berges, H.; Xu, S.; Jaouannet, M.; et al. A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 433. [[CrossRef](#)]
21. Gu, J.; Sun, J.; Liu, N.; Sun, X.; Liu, C.; Wu, L.; Liu, G.; Zeng, F.; Hou, C.; Han, S.; et al. A novel cysteine-rich receptor-like kinase gene, *TaCRK2*, contributes to leaf rust resistance in wheat. *Mol. Plant Pathol.* **2020**, *21*, 732–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wu, T.; Guo, F.; Xu, G.; Yu, J.; Zhang, L.; Wei, X.; Zhu, X.; Zhang, Z. The Receptor-like Kinase *TaCRK-7A* Inhibits *Fusarium pseudograminearum* Growth and Mediates Resistance to *Fusarium* Crown Rot in Wheat. *Biology* **2021**, *10*, 1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Peters, N.K.; Frost, J.W.; Long, S.R. A Plant Flavone, Luteolin, Induces Expression of *Rhizobium meliloti* Nodulation Genes. *Science* **1986**, *233*, 977–980. [[CrossRef](#)]
24. Redmond, J.W.; Batley, M.; Djordjevic, M.A.; Innes, R.W.; Kuempel, P.L.; Rolfe, B.G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **1986**, *323*, 632–635. [[CrossRef](#)]
25. Bourcy, M.; Brocard, L.; Pislariu, C.I.; Cosson, V.; Mergaert, P.; Tadege, M.; Mysore, K.S.; Udvardi, M.K.; Gourion, B.; Ratet, P. *Medicago truncatula* DNF2 is a PI-PLC-XD-containing protein required for bacteroid persistence and prevention of nodule early senescence and defense-like reactions. *New Phytol.* **2012**, *197*, 1250–1261. [[CrossRef](#)]
26. Berrabah, F.; Bourcy, M.; Eschstruth, A.; Cayrel, A.; Guefrachi, I.; Mergaert, P.; Wen, J.; Jean, V.; Mysore, K.; Gourion, B.; et al. A non RD receptor-like kinase prevents nodule early senescence and defense-like reactions during symbiosis. *New Phytol.* **2014**, *203*, 1305–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Wang, C.; Yu, H.; Luo, L.; Duan, L.; Cai, L.; He, X.; Wen, J.; Mysore, K.S.; Li, G.; Xiao, A.; et al. *NODULES WITH ACTIVATED DEFENSE 1* is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* **2016**, *212*, 176–191. [[CrossRef](#)]

28. Domonkos, Á.; Kovács, S.; Gombár, A.; Kiss, E.; Horváth, B.; Kovács, G.Z.; Farkas, A.; Tóth, M.T.; Ayaydin, F.; Bóka, K.; et al. NAD1 Controls Defense-Like Responses in *Medicago truncatula* Symbiotic Nitrogen Fixing Nodules Following Rhizobial Colonization in a BacA-Independent Manner. *Genes* **2017**, *8*, 387. [[CrossRef](#)]
29. Yu, H.; Xiao, A.; Dong, R.; Fan, Y.; Zhang, X.; Liu, C.; Wang, C.; Zhu, H.; Duanmu, D.; Cao, Y.; et al. Suppression of innate immunity mediated by the CDPK-Rboh complex is required for rhizobial colonization in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytol.* **2018**, *220*, 425–434. [[CrossRef](#)]
30. Quilbé, J.; Lamy, L.; Brottier, L.; Leleux, P.; Fardoux, J.; Rivallan, R.; Benichou, T.; Guyonnet, R.; Becana, M.; Villar, I.; et al. Genetics of nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the rhizobium–legume symbiosis. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 829. [[CrossRef](#)]
31. Miyakawa, T.; Miyazono, K.-I.; Sawano, Y.; Hatano, K.-I.; Tanokura, M. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2009**, *77*, 247–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Karimi, M.; Inzé, D.; Depicker, A. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 193–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vinuesa, P.; Neumann-Silkow, F.; Pacios-Bras, C.; Spaink, H.P.; Martínez-Romero, E.; Werner, D. Genetic Analysis of a pH-Regulated Operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 Involved in Acid Tolerance and Nodulation Competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interactions* **2003**, *16*, 159–168. [[CrossRef](#)]
34. Cermola, M.; Fedorova, E.; Riccio, A.; Favre, R.; Patriarca, E.J.; Cermola, E.F.M.; Sujkowska-Rybkowska, M.; Ważny, R.; Via, V.D.; Traubenik, S.; et al. Nodule Invasion and Symbiosome Differentiation During *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* Symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2000**, *13*, 733–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Consideine, M.J.; Foyer, C.H.; Zaffagnini, M.; Fermani, S.; Marchand, C.H.; Costa, A.; Sparla, F.; Rouhier, N.; Geigenberger, P.; Lemaire, S.D.; et al. Redox regulation of plant development. *Antioxidants Redox Signal.* **2014**, *21*, 1305–1326. [[CrossRef](#)]
36. He, Y.; Zhou, J.; Shan, L.; Meng, X. Plant cell surface receptor-mediated signaling—A common theme amid diversity. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs209353. [[CrossRef](#)]
37. Mulligan, J.T.; Long, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 6609–6613. [[CrossRef](#)]
38. Madsen, E.B.; Madsen, L.H.; Radutoiu, S.; Olbryt, M.; Rakwalska, M.; Szczyglowski, K.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N.; et al. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **2003**, *425*, 637–640. [[CrossRef](#)]
39. Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Madsen, E.B.; Felle, H.H.; Umehara, Y.; Grønlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal, N.; et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **2003**, *425*, 585–592. [[CrossRef](#)]
40. Murakami, E.; Cheng, J.; Gysel, K.; Bozsoki, Z.; Kawaharada, Y.; Hjuler, C.T.; Sørensen, K.K.; Tao, K.; Kelly, S.; Venice, F.; et al. Epidermal LysM receptor ensures robust symbiotic signalling in *Lotus japonicus*. *Elife* **2018**, *7*, e33506. [[CrossRef](#)]
41. Roy, S.; Liu, W.; Nandety, R.S.; Crook, A.D.; Mysore, K.S.; Pislariu, C.I.; Frugoli, J.A.; Dickstein, R.; Udvardi, M.K. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **2019**, *32*, 15–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Berrabah, F.; Ratet, P.; Gourion, B. Multiple steps control immunity during the intracellular accommodation of rhizobia. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 1977–1985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Berrabah, F.; Balliau, T.; Aït-Salem, E.H.; George, J.; Zivy, M.; Ratet, P.; Gourion, B. Control of the ethylene signaling pathway prevents plant defenses during intracellular accommodation of the rhizobia. *New Phytol.* **2018**, *219*, 310–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chen, K.; Fan, B.; Du, L.; Chen, Z. Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *56*, 271–283. [[CrossRef](#)]
45. Wrzaczek, M.; Brosché, M.; Kangasjärvi, J. ROS signaling loops—Production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2013**, *16*, 575–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lin, J.; Frank, M.; Reid, D. No Home without Hormones: How Plant Hormones Control Legume Nodule Organogenesis. *Plant Commun.* **2020**, *1*, 100104. [[CrossRef](#)]
47. Li, M.; Zhu, Y.; Li, S.; Zhang, W.; Yin, C.; Lin, Y. Regulation of Phytohormones on the Growth and Development of Plant Root Hair. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 865302. [[CrossRef](#)]
48. Mangano, S.; Denita-Juarez, S.P.; Choi, H.-S.; Marzol, E.; Hwang, Y.; Ranocha, P.; Velasquez, S.M.; Borassi, C.; Barberini, M.L.; Aptekmann, A.A.; et al. Molecular link between auxin and ROS-mediated polar growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 5289–5294. [[CrossRef](#)]
49. Yamamoto, Y.; Kamiya, N.; Morinaka, Y.; Matsuoka, M.; Sazuka, T. Auxin Biosynthesis by the YUCCA Genes in Rice. *Plant Physiol.* **2007**, *143*, 1362–1371. [[CrossRef](#)]
50. Delay, C.; Imin, N.; Djordjevic, M.A. Regulation of *Arabidopsis* root development by small signaling peptides. *Front Plant Sci.* **2013**, *6*, 352. [[CrossRef](#)]
51. Montiel, J.; Nava, N.; Cárdenas, L.; Sánchez-López, R.; Arthikala, M.-K.; Santana, O.; Sánchez, F.; Quinto, C. A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant Cell Physiol.* **2012**, *53*, 1751–1767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Arthikala, M.-K.; Nanjareddy, K.; Lara, M. In BPS1 Downregulated Roots, the BYPASS1 Signal Disrupts the Induction of Cortical Cell Divisions in Bean-Rhizobium Symbiosis. *Genes* **2018**, *9*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Zhou, H.; Li, S.; Deng, Z.; Wang, X.; Chen, T.; Zhang, J.; Chen, S.; Ling, H.; Zhang, A.; Wang, D.; et al. Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection. *Plant J.* **2007**, *52*, 420–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Smakowska-Luzan, E.; Mott, G.A.; Parys, K.; Stegmann, M.; Howton, T.C.; Layeghifard, M.; Neuhold, J.; Lehner, A.; Kong, J.; Grünwald, K.; et al. An extracellular network of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases. *Nature* **2018**, *553*, 342–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Navarro-Gochicoa, M.-T.; Camut, S.; Timmers, A.C.; Niebel, A.; Hervé, C.; Boutet, E.; Bono, J.-J.; Imberty, A.; Cullimore, J.V. Characterization of Four Lectin-Like Receptor Kinases Expressed in Roots of *Medicago truncatula*. Structure, Location, Regulation of Expression, and Potential Role in the Symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 1893–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Arthikala, M.; Sánchez-López, R.; Nava, N.; Santana, O.; Cárdenas, L.; Quinto, C. *RbohB*, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytol.* **2014**, *202*, 886–900. [[CrossRef](#)]
57. Nanjareddy, K.; Arthikala, M.-K.; Aguirre, A.-L.; Gómez, B.-M.; Lara, M. Plant Promoter Analysis: Identification and Characterization of Root Nodule Specific Promoter in the Common Bean. *J. Vis. Exp.* **2017**, *130*, e56140. [[CrossRef](#)]
58. Broughton, W.J.; Dilworth, M.J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.* **1971**, *125*, 1075–1080. [[CrossRef](#)]
59. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, RESEARCH0034. [[CrossRef](#)]
60. Ma, Z.; Bielenberg, D.G.; Brown, K.M.; Lynch, J.P. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **2001**, *24*, 459–467. [[CrossRef](#)]
61. Mercante, F.M.; Franco, A.A. Expression of nod genes in *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and bean nodulation in the presence of *Mimosa flocculosa* and *Leucaena leucocephala* seed exudates. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* **2000**, *24*, 301–310. [[CrossRef](#)]
62. Jefferson, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1987**, *5*, 387–405. [[CrossRef](#)]
63. Chen, T.-K.; Yang, H.-T.; Fang, S.-C.; Lien, Y.-C.; Yang, T.-T.; Ko, S.-S. Hybrid-Cut: An Improved Sectioning Method for Recalcitrant Plant Tissue Samples. *J. Vis. Exp.* **2016**, *117*, e54754. [[CrossRef](#)]
64. Burris, R.H. Methodology. In *Biology of Nitrogen Fixation*; Quispel, A., Ed.; North-Holland Publishing Co.: Amsterdam, The Netherlands, 1974; pp. 3–42.

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.