

¿CÓMO CONTROLAN LAS LEGUMINOSAS EL NÚMERO DE NÓDULOS PARA EVITAR COMPROMETER SU CRECIMIENTO Y DESARROLLO?*

Maríel C. Isidra-Arellano^{1, 2} y Oswaldo Valdés-López^{1**}

¹Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, 54090, México

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México, 04510, México. **Autor de correspondencia correo E: oswaldovaldesl@unam.mx

RESUMEN

Las leguminosas tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con bacterias fijadoras de nitrógeno (rizobios). El establecimiento de esta simbiosis no sólo permite a las leguminosas crecer en suelos deficientes de nitrógeno, sino que también permite incorporar nitrógeno asimilable (e.g., amonio) para los posteriores cultivos a través de cultivos rotatorios. Obtener nitrógeno asimilable a través de la simbiosis con rizobios, implica un gran gasto energético para la leguminosa. Para evitar comprometer su desarrollo, las leguminosas han desarrollado programas genéticos que les permiten continuar esta simbiosis sin comprometer sus necesidades metabólicas. En esta revisión, se discuten los avances que se han hecho para entender los mecanismos genéticos que permiten a las leguminosas realizar simbiosis con rizobios sin comprometer su desarrollo. Asimismo, proponemos perspectivas que fomentan el pensamiento crítico y que conllevarán al planteamiento de experimentos que ayuden a comprender de forma integral las adaptaciones que han tenido las leguminosas para mantener la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno a través del tiempo.

PALABRAS

CLAVE:

Autorregulación de la Nodulación, rizobios, simbiosis, péptidos CLE.

ABSTRACT

Legumes can engage in symbiosis with nitrogen-fixing bacteria. This symbiosis allows legumes to grow with little to no nitrogen fertilizers inputs and replenishes the soil with fixed nitrogen (e.g., ammonium) for subsequent crops through crop rotation. Symbiotic nitrogen fixation is an energy-demanding process for the legume host. Because of the high carbon demand, legumes tightly regulate the number of rhizobial infections and the number of nodules per plant. Here, we review the state-of-the-art of genetic programs underlying the fine regulation of the number of nodules in legumes. We also raise different questions that must be experimentally validated to understand better how legumes have retained through their evolution the ability to engage in symbiosis with nitrogen-fixing bacteria without hampering their growth and development.

KEY WORDS:

Autoregulation of Nodulation, rhizobia, symbiosis, CLE peptides.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos ha tomado gran relevancia desde la década pasada. Lo anterior se debe a que muchas de estas relaciones mutualistas optimizan diversos procesos fisiológicos de la planta y contribuyen a su adaptación al ambiente (1). Debido a su importancia ecológica, la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) es una de las simbiosis que se ha

estudiado detalladamente. La FSN se lleva a cabo entre plantas leguminosas [e.g., frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), chícharo (*Pisum sativum*) y alfalfa (*Medicago sativa*)] y bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobios, pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre otros. Esta simbiosis se caracteriza por la formación de órganos especializados en las raíces denominados nódulos (2). En estos órganos, los rizobios fijan el nitrógeno

atmosférico en formas asimilables (e.g., amonio y aminoácidos) que pueden ser incorporadas al metabolismo de la leguminosa hospedera, la cual, a su vez, les provee un ambiente hipóxico y fuentes de carbono (2). Gracias a esta simbiosis, las leguminosas son capaces de crecer en suelos deficientes de nitrógeno sin necesidad de agregar fertilizantes sintéticos. Además, a través de esta simbiosis, el nitrógeno atmosférico es incorporado en formas asimilables al suelo, y en consecuencia a la cadena alimentaria. Por lo anterior, la manipulación de esta simbiosis ha sido considerada como una estrategia para reducir el uso de fertilizantes sintéticos y la emisión de gases de efecto invernadero que se generan durante su manufactura (3-5).

¿Cómo las leguminosas establecen simbiosis con rizobios?

El principal requisito para que las leguminosas establezcan simbiosis con rizobios es que la disponibilidad de nitrógeno asimilable en el suelo sea baja o nula. Ante este escenario, la leguminosa "solicita" ayuda a los rizobios que se encuentran en la rizósfera, lo cual lo hace a través de un diálogo molecular. Esta comunicación se da a través del intercambio de moléculas señales difusibles generadas por ambos simbioses (Figura 1a). A través de estudios genéticos en las leguminosas modelo *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*, se ha demostrado que este diálogo

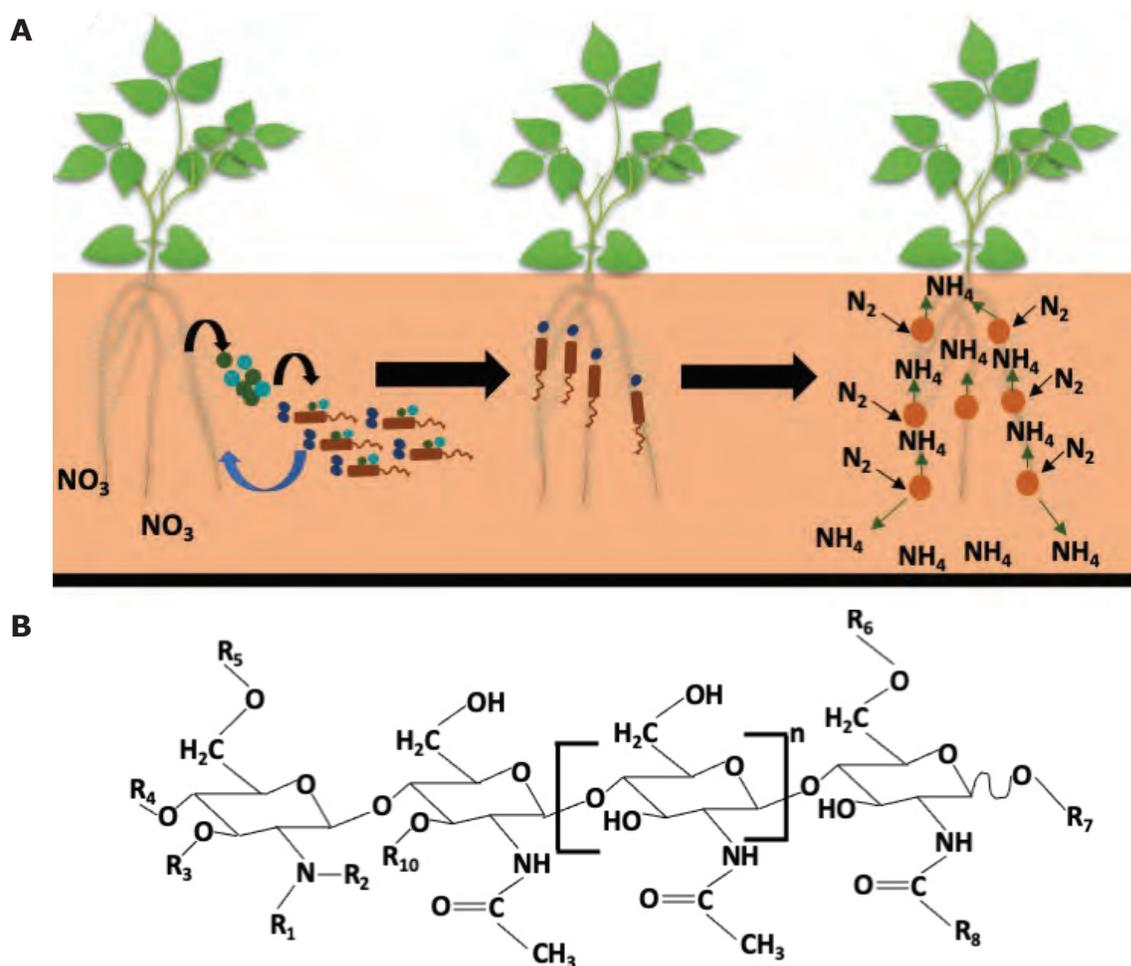


Figura 1. Comunicación molecular entre leguminosas y rizobios. (A) Ante una deficiencia de nitrógeno, las leguminosas secretan flavonoides e isoflavonoides (círculos verdes) a la rizósfera. Estas moléculas señal son detectados por los rizobios, quienes, en respuesta, secretan lipoquitooligosacaridos con diferentes decoraciones químicas, los cuales se denominan Factores de Nodulación (círculos en azul marino). En este primer paso, los rizobios son quimioatraídos a los pelos radicales en donde los Factores de Nodulación son detectados por la leguminosa. La decodificación de esta señal bacteriana activa en la planta diversos programas genéticos que permiten el establecimiento de una simbiosis. El producto final de esta simbiosis es la formación de nódulos, en donde los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico (e.g., NH_4) a cambios de fuentes de carbono. El nitrógeno fijado es incorporado al metabolismo de la leguminosa y al suelo. (B) Estructura general de los Factores de Nodulación. La identidad química de sus grupos funcionales ($\text{R}_1\text{-R}_{10}$) y su grado de oligomerización (n) es determinado por la especie del rizobio.

molecular es indispensable para activar programas genéticos en la leguminosa hospedera, los cuales son requeridos para coordinar el proceso de infección/colonización rizobial y el desarrollo de los nódulos (6-7). El diálogo molecular inicia cuando la leguminosa secreta flavonoides a la rizósfera. Estas moléculas quimio-atraen a los rizobios hacia la parte apical de los pelos radicales (Figura 1a) (6-7). En respuesta, el rizobio sintetiza y secreta lipo-quitoooligosacáridos químicamente decorados, denominados Factores de Nodulación (FNs) (Figura 1b) (8). Los FNs son detectados en los pelos radicales a través receptores heterodiméricos tipo cinasa, tales como NFR5 (siglas en inglés de "Nod Factor Receptor 5), NFR1 (siglas en inglés de Nod Factor Receptor 1), así como por el receptor NFR_e (siglas en inglés de Nod Factor Receptor epidermal) (Tabla 1) (9). Una vez detectados los FNs, se activa una serie de eventos moleculares, entre los que destacan oscilaciones en las concentraciones de Ca²⁺ en el núcleo, fosforilación de proteínas y activación de la expresión de genes simbióticos (e.g.,

CYCLOPS, NIN, NF-YA, ERN1) (Figura 2a) (9).

Las respuestas moleculares anteriormente descritas forman parte del primer programa genético, el cual controla las etapas iniciales de esta simbiosis, incluyendo el proceso de colonización/infección rizobial. Este programa regula principalmente la reorganización del citoesqueleto del pelo radical, lo cual permite que éstos se deformen y atrapen al rizobio (Figura 2b). Subsecuentemente, ocurre la invaginación de la pared celular y membrana plasmática del pelo radical, lo cual da paso a la formación de una estructura tubular denominada hilo de infección (Figura 2b). A través del hilo de infección, los rizobios son guiados y liberados en las células del córtex de la raíz. En paralelo, estas células corticales se activan y empiezan a dividirse formando un nuevo meristemo, el meristemo nodular, a partir del cual se formará el nódulo (Figura 2b) (9). Estas divisiones celulares están coordinadas por un segundo programa genético que permite la formación y desarrollo de nódulos (Figura 2b).

TABLA 1. Genes de plantas con función en la simbiosis leguminosa-rizobio

| Gen | Nombre | Función en la simbiosis |
|------------------------|---|---|
| <i>NFR5</i> | Nod Factor Receptor 5 | Receptor de los Factores de Nodulación |
| <i>NFR1</i> | Nod Factor Receptor 1 | Receptor de los Factores de Nodulación |
| <i>NFR_e</i> | Nod Factor Receptor epidermal | Receptor de los Factores de Nodulación |
| <i>CYCLOPS</i> | CYCLOPS | Activa el proceso de infección rizobial |
| <i>NIN</i> | Nodule Inception | Controla cada etapa de la simbiosis |
| <i>NF-YA</i> | Nuclear transcription factor Y subunit A | Activa el proceso de infección rizobial y desarrollo de nódulos |
| <i>ERN1</i> | "Ethylene Response Factor Required for Nodulation1" | Activa el proceso de infección rizobial |
| <i>LHK1</i> | Lotus Histidine Kinase 1 | Activa el proceso de formación de nódulos |
| <i>NIC1</i> | Nitrogen Induced CLE peptide 1 | Péptido señal |
| <i>NRSYM1</i> | Nitrate Unresponsive Symbiosis 1 | Regula el número de nódulos |
| <i>CLE35</i> | CLAVATA3-Endosperm Surrounding Region35 | Péptido móvil que activa la AON en condiciones óptimas de nitrógeno |
| <i>CEP1</i> | C-Terminally Encoded Peptide 1 | Péptido móvil que activa el proceso de formación de nódulos |
| <i>CRA2</i> | Compact Root Architecture 2 | Receptor que percibe al péptido CEP1 |
| <i>RIC1</i> | Rhizobia Induced CLE peptide 1 | Péptido móvil que activa la AON |
| <i>RIC2</i> | Rhizobia Induced CLE peptide 2 | Péptido móvil que activa la AON |
| <i>NARK</i> | Nodulation Autoregulation Receptor Kinase | Receptor los péptidos RIC1 y RIC2 |
| <i>PHR1</i> | Phosphate Starvation Response1 | Factor de transcripción que regula el número de nódulos en condiciones deficientes de fósforo |

La información mostrada en esta tabla fue extraída de las referencias 9 y 36 de este artículo.

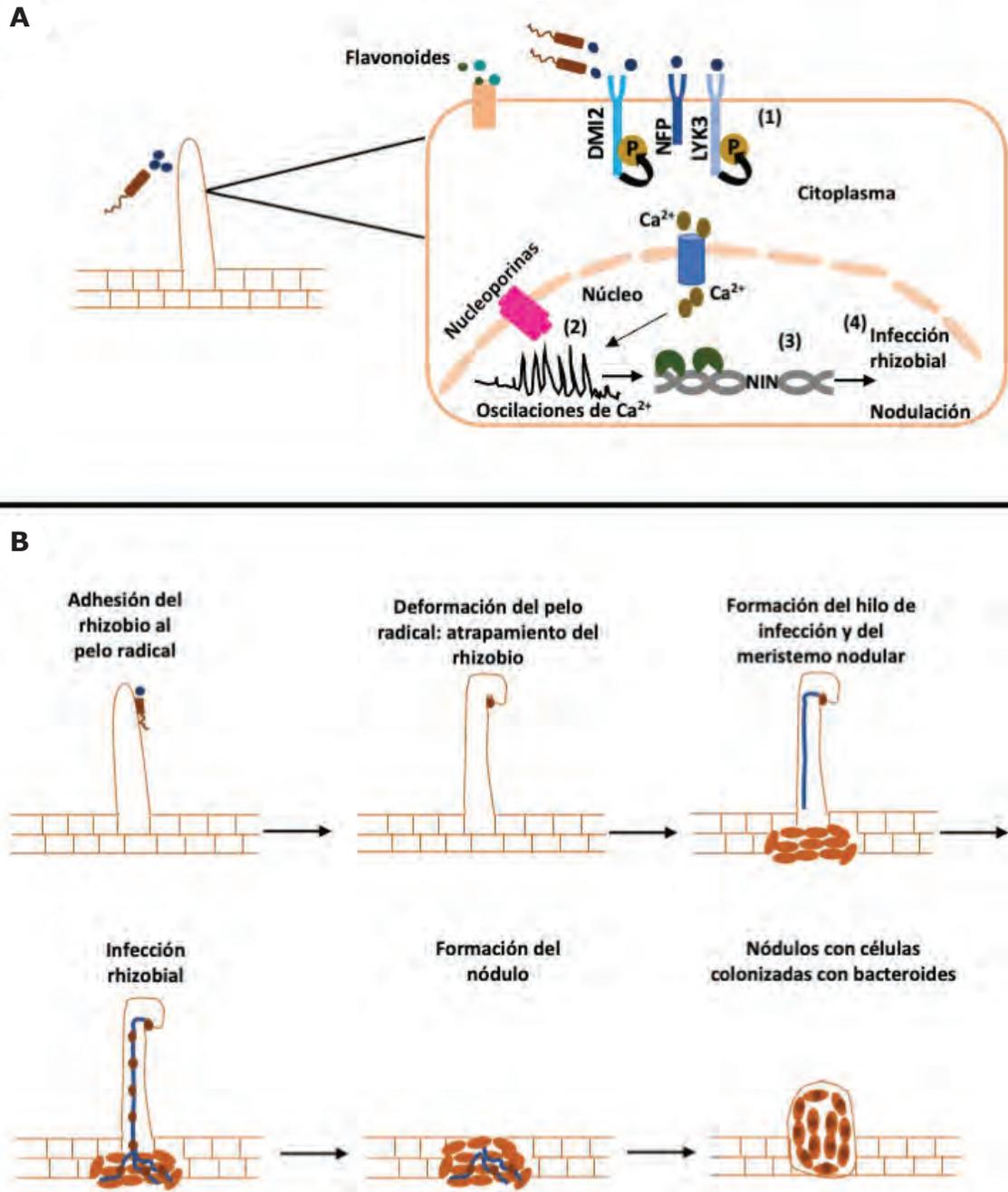


Figura 2. Decodificación de la señal emitido por los rizobios a través de los Factores de Nodulación. (A) Uno de los primeros eventos del dialogo molecular entre leguminosas y rizobios es la detección de los Factores de Nodulación a través de receptores (NFP y LYK3) y co-receptores (DMI2) membranales. La detección de los Factores de Nodulación activa una serie de eventos moleculares, que incluye la fosforilación de proteínas y oscilaciones de calcio nuclear (Ca^{2+}). La decodificación de las oscilaciones de Ca^{2+} es necesaria para la activación de diversos factores de transcripción (e.g., NIN) que, a su vez, son necesarios para activar los programas de infección rizobial y desarrollo de los nódulos. (B) Uno de los programas genéticos que se activa después de decodificar las oscilaciones de Ca^{2+} es el que está relacionado con el proceso de infección rizobial. Este proceso inicia cuando el rizobio es adherido al pelo radical. Posteriormente, el pelo radical se deforma para dar paso a la formación de una cámara de infección, en donde el rizobio es "atrapado". En seguida, en la cámara de infección se forma una invaginación que prolonga a través del interior celular del pelo radical hasta llegar a la primera capa de la epidermis de la raíz. Esta invaginación de la pared celular y la membrana plasmática del pelo radical se le denomina hilo de infección. A la par de la formación del hilo de infección, las células corticales de la raíz experimentan mitosis y dediferenciación celular, lo cual permite la formación del meristemo nodular. A través del hilo de infección, el cual se ramifica al llegar a las células del meristemo nodular, los rizobios viajan hasta las células que darán origen al nódulo y en donde serán albergadas para fijar nitrógeno atmosférico.

¿Cómo se forman los nódulos?

El desarrollo del nódulo está coordinado por tres procesos que ocurren simultáneamente: infección rizobial, organogénesis, y autorregulación del número de nódulos. Basados en la persistencia del meristemo nodular, existen dos tipos de nódulos, el primero es el tipo indeterminado, el cual mantiene su meristemo durante toda la simbiosis. Los

nódulos indeterminados son característicos de leguminosas de climas templados como la alfalfa, *M. truncatula*, y los chícharos (Figura 3). El segundo tipo de nódulos son los determinados, en los cuales el meristemo es transitorio y desaparece en nódulos maduros. Los nódulos determinados tienen una forma esférica, y son característicos de leguminosas de climas cálidos, como el frijol, soya y *L. japonicus* (Figura 3).

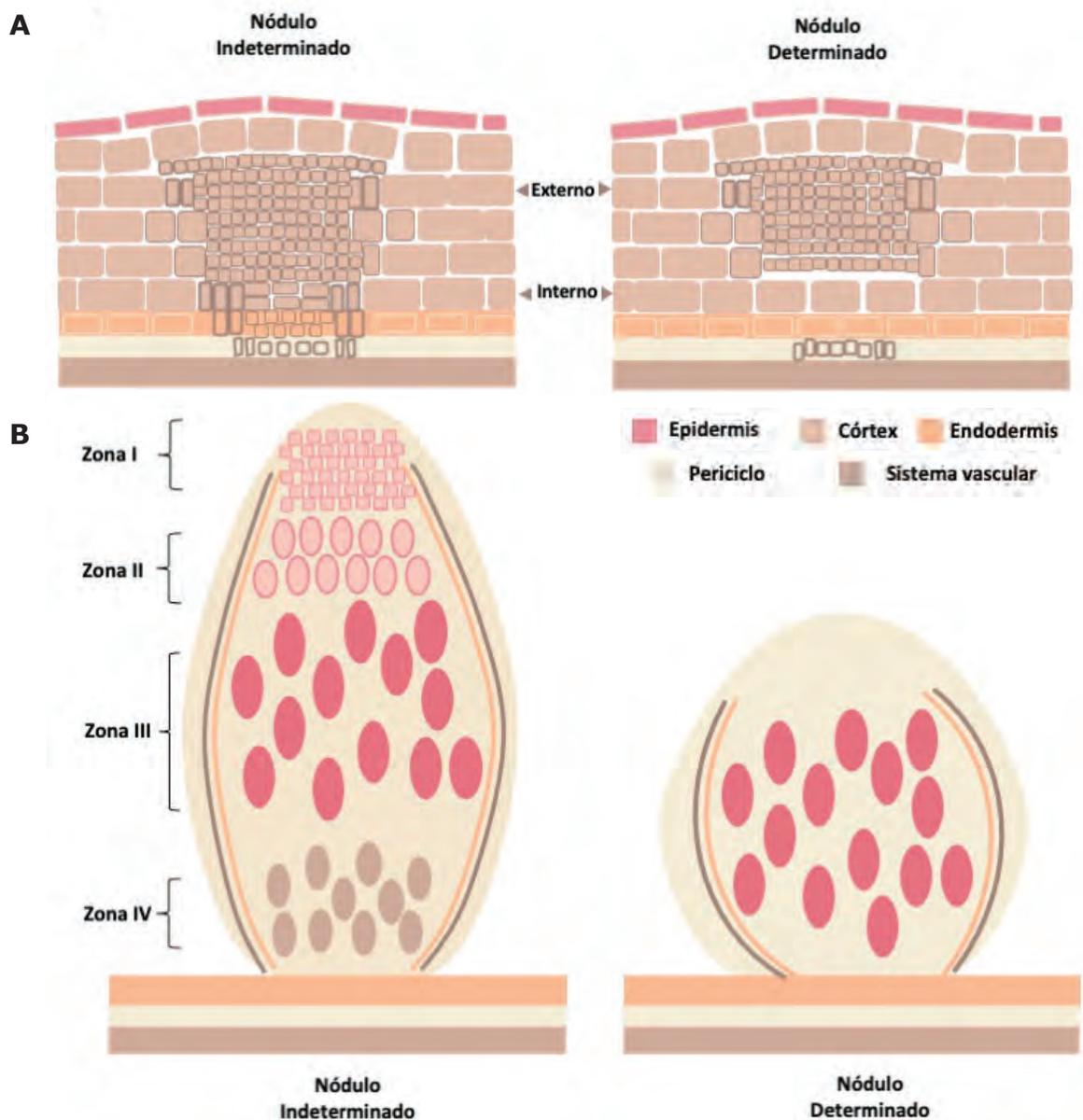


Figura 3. Formación y tipos de nódulos. (A) El desarrollo de nódulos inicia con divisiones de las células del periciclo y se extienden a las células del córtex. De acuerdo con la persistencia del meristemo nodular, existen dos tipos de nódulos: indeterminados, los cuales se forman a partir de células del córtex interno, y se caracterizan por mantener su meristemo durante toda la simbiosis. El segundo tipo de nódulos es el determinado, los cuales se desarrollan a partir del córtex medio y externo, y además carecen de meristemo en su etapa funcional. (B) Adicionalmente, los nódulos indeterminados maduros poseen una forma alargada y diferentes zonas bien diferenciadas: meristemo (zona I), zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV). En comparación los nódulos determinados maduros poseen una forma predominantemente esférica y se componen de una sola zona donde ocurre la fijación de nitrógeno.

El programa genético encargado del desarrollo y formación de los nódulos se activa simultáneamente a la formación del hilo de infección. El desarrollo de este órgano simbiótico se da mediante el reclutamiento de una parte del programa genético que participa en el desarrollo de las raíces laterales. Por lo anterior, los nódulos son considerados como modificaciones de las raíces laterales en plantas leguminosas. De acuerdo con estudios en *M. truncatula* y *L. japonicus*, al igual que las raíces laterales, la organogénesis del nódulo inicia con divisiones mitóticas en el periciclo de la raíz (Figura 3a). Posteriormente, se llevan a cabo subsecuentes planos de divisiones celulares en el córtex, las cuales son limitadas en la formación de las raíces laterales. Aunque este proceso celular es requerido para la formación de los dos tipos de nódulos, los indeterminados son formados a partir de células del córtex interno, mientras que los nódulos determinados lo hacen a partir del córtex medio y externo. Los tejidos de los nódulos se componen de córtex externo, endodermis cortical, haces vasculares, y córtex interno, este último es colonizado por los rizobios que son transportados en el hilo de infección (Figura 3a).

En nódulos indeterminados maduros, el córtex interno se divide en cuatro zonas de desarrollo: meristemo (zona I), zona de infección (zona II), zona de fijación de nitrógeno (zona III), y zona de senescencia (zona IV) (Figura 3b). En el caso de nódulos determinados maduros, el córtex interno se compone de una sola zona, la de fijación de nitrógeno, la cual eventualmente se convierte en la zona de senescencia (Figura 3b). Para que cada uno de los tejidos y zonas del nódulo se formen, las células del periciclo, endodermis y las capas C5 y C3 del córtex experimentan sucesivas divisiones anticlinales y periclinales.

Para poder albergar a los rizobios, las células que formarán parte de la zona de infección pasan por un proceso denominado endorreduplicación, en el cual el DNA se replica sin la necesidad de activar la división celular, y se convierten en células poliploides alargadas. A la par de este proceso, las células poliploides son colonizadas por rizobios que provienen del hilo de infección. Conforme los rizobios son liberados en las células poliploides, los rizobios son recubiertos por una membrana de origen vegetal y son internalizados en estructuras denominadas simbiosomas. Subsecuentemente, los rizobios pierden su pared celular, endorreduplican su material genético, y experimentan cambios en su morfología para formar células largas e irregulares denominadas bacteroides (9).

Para que los bacteroides fijen nitrógeno, es necesario que activen la expresión de los genes

de fijación de nitrógeno, comúnmente conocidos como genes *nif*, que codifican para el complejo nitrogenasa (Figura 4a) (Tabla 2). Este complejo metaloenzimático se compone de la proteína catalítica denominada dinitrogenasa, y de la proteína donadora de electrones dependiente de ATP denominada dinitrogenasa reductasa (Figura 4b). El dominio catalítico de la dinitrogenasa contiene un cofactor molibdeno-hierro (Mo-Fe), el cual es fácilmente dissociado por oxígeno. Por lo anterior, para que el complejo nitrogenasa fije el nitrógeno atmosférico, es necesario que en los nódulos existan bajas concentraciones de oxígeno para evitar la inactivación de esta metaloenzima. Este ambiente hipóxico se genera cuando en el nódulo se activan genes que codifican para hemoglobinas vegetales denominadas leghemoglobinas. Estas proteínas, al igual que las hemoglobinas de animales, transportan oxígeno y permiten que la nitrogenasa funcione.

Costo energético de la simbiosis con rizobios

Durante la simbiosis leguminosa-rizobio se ejerce un constante intercambio de nutrientes y fuentes de carbono. La eficiencia de este intercambio es crítica para mantener la simbiosis. Por ejemplo, el aporte de diferentes nutrimentos minerales (e.g., fósforo: P; hierro: Fe; y molibdeno: Mo) y de fuentes de carbono, principalmente en forma de fotosintatos, es fundamental para que los bacteroides obtengan la energía necesaria para la síntesis y ensamblaje del complejo nitrogenasa, así como para que este ensamble enzimático pueda reducir el N₂ atmosférico en formas asimilables (10). Al garantizar estos beneficios energéticos y nutrimentales, los bacteroides fijan el N₂ atmosférico en amonio o ureidos (Figura 5). Estas moléculas nitrogenadas son transportadas al citoplasma de las células vegetales y a través del ciclo Glutamino sintetasa-Glutamato sintetasa son incorporados a aminoácidos. Finalmente, estos aminoácidos son exportados hacia los diferentes órganos de la planta (9).

Si se considera cada uno de los eventos moleculares que se requieren para mantener funcional la FSN, esta forma de obtener nitrógeno asimilable resulta altamente costosa para las leguminosas. Por ejemplo, para fijar una molécula de N₂ atmosférico se requiere la inversión de 16 moléculas de ATP (10). Sin embargo, existen otros procesos asociados a la FSN que demandan energía, como el ensamblaje del complejo nitrogenasa, el aporte de poder reductor, y el reciclado de los residuos tóxicos de dihidrógeno resultantes del proceso de fijación de nitrógeno. En consecuencia, el costo energético total de la FSN asciende a 30 ATPs

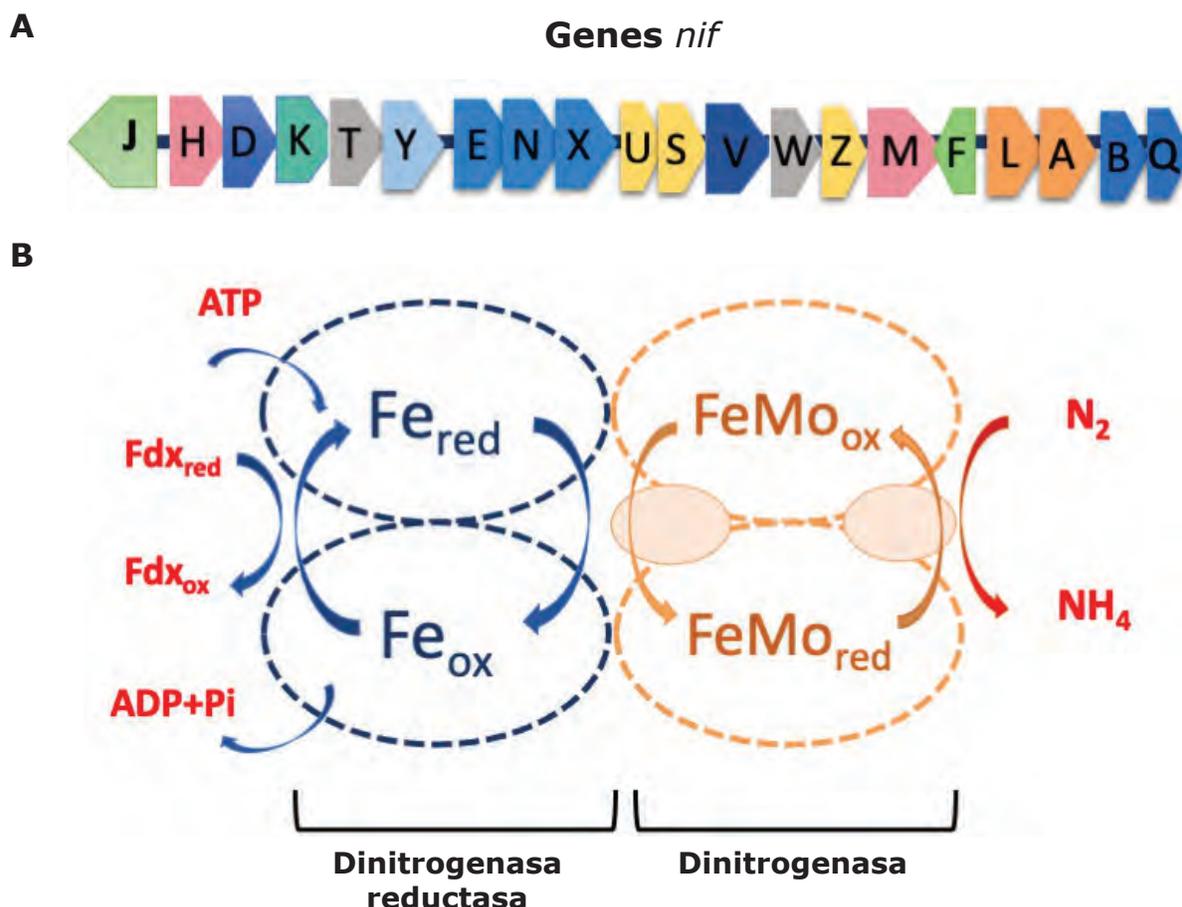


Figura 4. Genes *nif* importantes para definir la estructura y función del complejo nitrogenasa. (A) El complejo nitrogenasa es codificado por 20 genes de fijación de nitrógeno (*nif*, de las siglas en inglés) del genoma bacteriano. La expresión de estos genes se induce una vez que el rizobio se localiza dentro de las células vegetales y se diferencia a bacteroide. Estos 20 genes *nif* codifican para cada uno de los componentes de la nitrogenasa, así como reguladores de su función. (B) La enzima nitrogenasa es un complejo metaloenzimático que se compone de la proteína catalítica denominada dinitrogenasa, y de la proteína donadora de electrones dependiente de ATP denominada dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa, también conocida como proteína MoFe o componente I, es un tetrámero de 220 a 240 kilodaltones (kDa) codificada por los genes *NifD* y *NifK*. Este tetrámero contiene un complejo metálico compuesto de los cofactores Fe y Mo. La dinitrogenasa reductasa, también conocida como proteína Fe o componente II, es un dímero de 60-KDa codificada por el operón *nifHDK*. Este dímero contiene un solo complejo 4Fe-4S y dos sitios de unión a Mg-ATP. Esta subunidad dona electrones a la dinitrogenasa para fijar el nitrógeno atmosférico en amonio. En la tabla 2 de este artículo se resume la función de cada uno de los genes *nif*.

para fijar una molécula de N_2 atmosférico (10). Este alto gasto energético obliga a la leguminosa a controlar el número de nódulos para evitar un excesivo gasto energético que comprometa su óptimo desarrollo y, de ser el caso, la productividad agrícola (11). Esta regulación se realiza a través de la vía de señalización denominada Autorregulación de la Nodulación (AON, siglas en inglés), la cual restringe el número de nódulos formados (11).

A pesar de que en los últimos años se han descrito algunos de los componentes genéticos de la AON, aún se desconoce parte de los genes que son regulados en esta vía y los cuales son determinantes para controlar el número de nódulos. En los siguientes apartados de esta revisión, se analizan

los avances más significativos de los últimos años relacionados con el control del número de nódulos desarrollados durante la simbiosis, así como los modelos que explican este fenómeno y que se han propuesto hasta el momento.

¿Cómo se activa la AON?

La AON no solo restringe la formación de nódulos, sino que también es fundamental para controlar el aporte energético destinado a la FSN. Esta vía de señalización se activa a la par del proceso de infección rizobial y cuando las células corticales de la raíz se dividen para formar el meristemo nodular. El inicio de la AON se caracteriza por la producción

TABLA 2. Genes de plantas con función en la simbiosis leguminosa-rizobio

| Gen | Función |
|-------------|--|
| <i>nifH</i> | Participa en la biosíntesis del cofactor FeMo y en la maduración de la Dinitrogenasa |
| <i>nifD</i> | Codifica par la subunidad α de la Dinitrogenasa |
| <i>nifK</i> | Codifica par la subunidad β de la Dinitrogenasa |
| <i>nifT</i> | Función desconocida |
| <i>nifY</i> | Inserta el cofactor FeMo en la Dinitrogenasa |
| <i>nifE</i> | Forma el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de la Dinitrogenasa |
| <i>nifN</i> | Junto con NifE Forma el tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de la Dinitrogenasa |
| <i>nifX</i> | Participa en la biosíntesis del cofactor FeMo |
| <i>nifU</i> | Participa en la biosíntesis del cluster Fe-S de la Dinitrogenasa reductasa |
| <i>nifS</i> | Participa en la movilización de S al cluster Fe-S |
| <i>nifV</i> | Homocitrato involucrada en la biosíntesis del cofactor FeMo |
| <i>nifW</i> | Estabiliza la Dinitrogenasa reductasa |
| <i>nifZ</i> | Función desconocida |
| <i>nifM</i> | Participa en la maduración de NifH |
| <i>nifF</i> | Flavodoxina que dona electrones a la Dinitrogenasa reductasa |
| <i>nifL</i> | Regulador negativo del complejo nitrogenasa |
| <i>nifA</i> | Regulador positivo del complejo nitrogenasa |
| <i>nifB</i> | Dona Fe y S al cofactor FeMo |
| <i>nifQ</i> | Participa en la biosíntesis del complejo FeMo |
| <i>nifJ</i> | Flavoredoxina oxireductasa que dona electrones |

Fe: Hierro; S: Azufre; Mo: Molibdeno. Información detallada acerca del ensamblaje del complejo nitrogenasa puede encontrarse en las referencias 37, y 38 de este artículo.

en la raíz de moléculas señales móviles que permiten una comunicación constante con el vástago (tallo y hojas), la cual es necesaria para coordinar los eventos moleculares que conllevan a la inhibición de la formación del nódulo (Figura 6) (11). En esta primera etapa, el factor de transcripción NIN (siglas en inglés de Nodule Inception) juega un papel determinante en la activación de la AON (12). Se ha demostrado que, en esta etapa, *NIN* se expresa en el periciclo de la raíz, en donde promueve la transcripción de dos genes que codifican para péptidos de la familia CLE (siglas en inglés de "CLAVATA3-Endosperm Surrounding Region": CLE) (11, 13). Puesto que la activación transcripcional de estos dos genes se da en respuesta a rizobio, éstos son denominados como *RIC1* y *RIC2* (siglas en inglés de *Rhizobia Induced CLE peptide 1 y 2*) en frijol y soya, *CLE-RS1/CLE-RS2* en *L. japonicus* y *CLE12/CLE13* en *M. truncatula* (11) (Figura 6). Estos péptidos derivan de precursores de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud y mediante un procesamiento proteolítico surgen cadenas de péptidos de 12-13 aminoácidos (14-16). Los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*

maduros son transportados vía xilema hacia la parte aérea de la planta y son percibidos por un receptor tipo cinasa conocido en frijol y soya como "Nodulation Autoregulation Receptor Kinase" (NARK), "Hypernodulation and Aberrant Root Formation1" (HAR1) en *L. japonicus* y "Super Numeric Nodules" (SUNN) en *M. truncatula* (Figura 6) (11,17,18). La importancia de la percepción y decodificación del mensaje de los péptidos *RIC1/2* en la AON ha sido demostrada en las mutantes *nark/har1/sunn* las cuales exhiben fenotipos de supernodulación debido a que no pueden restringir el número de nódulos (11).

Con base a estudios de injertos entre el tallo de una leguminosa silvestre (capaz de detectar los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*) y raíces de mutantes *nark/har1/sunn*, y viceversa, se ha sugerido que la percepción de estos péptidos activa la biosíntesis de una señal regulatoria. Sin embargo, la identidad química de esta molécula señal derivada del tallo aún es cuestión de debate (11). Se ha especulado que esta molécula señal producida en el tallo viaja vía floema hacia la raíz de la leguminosa, en donde

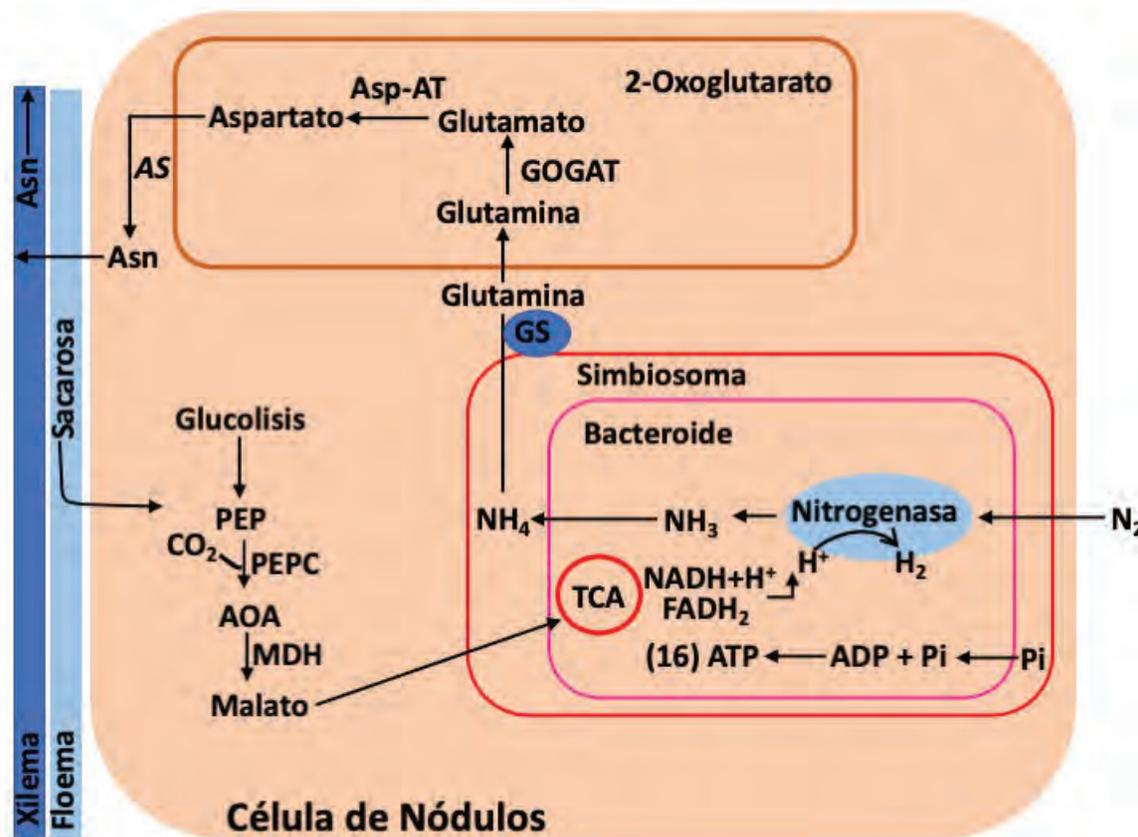


Figura 5. Fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico. Una vez ensamblado el complejo nitrogenasa, se requiere la inversión de la cual de 16 moléculas de ATP y poder reductor en forma de NADH y FADH₂ para fijar una molécula de nitrógeno atmosférico en formas asimilables para la leguminosa (e.g., NH₄). El nitrógeno fijado es translocado a células del nódulo no infectadas, en donde es incorporado al ciclo metabólico Glutamina Sintetasa (GS) – Glutamato Sintetasa (GOGAT). Los productos derivados de este ciclo metabólico (e.g., Asn) son translocados al xilema para ser transportados a los diferentes órganos de la leguminosa.

activa un programa genético que inhibe la formación de nódulos (11). En los últimos años se han realizado diversos esfuerzos para descubrir la identidad química de la señal inhibitoria que viaja de la parte aérea hacia la raíz. Al respecto, se ha propuesto que esta molécula señal puede ser la fitohormona citocinina 6-bencilaminopurina ó transzeatina, de las cuales se ha observado que en altas concentraciones inhiben la actividad meristemática en las raíces. Además, en *L. japonicus* también se demostró que un aumento en la producción de estas citocininas inhibe la formación de nódulos (19-20). Por lo anterior, se ha propuesto que este grupo de fitohormonas puede jugar un papel en la AON. Además de la citocininas, también se ha propuesto que el microRNA (miRNA) miR2111 podría ser la señal derivada del tallo y que inhibe la formación de nódulos. En respuesta a la baja disponibilidad de nitrógeno y, en cierto nivel, a la inoculación con rizobios, este miRNA se sintetiza y madura en las células acompañantes del floema y

de allí viaja a las raíces. Sin embargo, evidencias recientes indican que la producción de miR2111 es necesaria para activar el proceso de formación y desarrollo de nódulos y no para inhibirla (Figura 6) (21-22). Inclusive, existen evidencias que indican que una vez que los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13 son detectados por el receptor NARK/HAR1/SUNN la producción y exportación de miR2111 se inhibe (21-22). Por lo anterior, miR2111 no puede ser considerado como la molécula señal producida en el tallo para inhibir la nodulación (Figura 6).

A pesar de que se desconoce la identidad química de la molécula señal generada en el tallo, evidencias en diferentes leguminosas indican que esta señal activa la transcripción del gen "Too Much Love" (*TML*). *TML* codifica para una ubiquitina E3 ligasa de la familia proteica "Kelch repeat-containing F-box" con dos péptidos señal para localización nuclear. En respuesta a rizobios, se induce la expresión de *TML* en meristemos nodulares y en

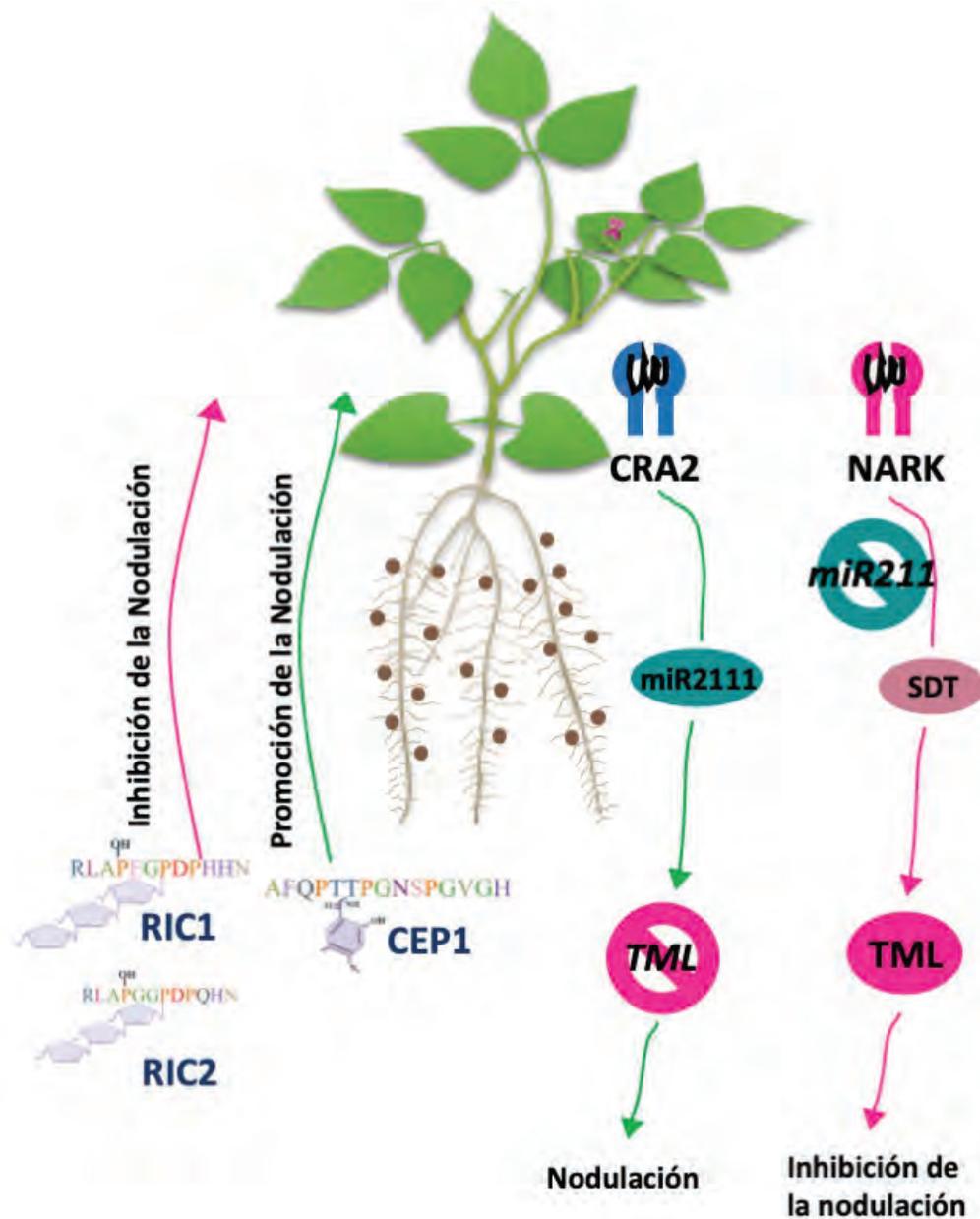


Figura 6. Vías de señalización que controlan la formación de nódulos en leguminosas. Ante una deficiencia de nitrógeno, las leguminosas sintetizan en la raíz los péptidos CEP1, los cuales son transportados vía xilema a la parte aérea de la planta y son detectados por el receptor CRA2. Una vez detectados, inducen la expresión del microRNA miR2111, el cual es transportado vía floema a la raíz, donde provoca el corte y posterior degradación del RNAm de TML. Como resultado, la leguminosa puede iniciar la formación de nódulos. Para evitar que la fijación simbiótica de nitrógeno comprometa el crecimiento y desarrollo de la leguminosa, a la par de las primeras divisiones celulares en el córtex de la raíz, en ella se sintetizan los péptidos RIC1 y RIC2, los cuales son transportados vía xilema a la parte aérea y en donde son censados por el receptor NARK. En respuesta, se genera una molécula señal de identidad química desconocida (SDT: Señal Derivada del Tallo). La SDT es transportada vía floema a la raíz, en donde de alguna forma se evita que TML sea degradado en el RISC. De alguna forma que aún no se ha determinado, TML inhibe la formación de nódulos.

nódulos maduros (23). Interesantemente, leguminosas mutantes *tml* desarrollan un fenotipo de supernodulación (23). Por lo anterior, se ha propuesto que TML es un regulador negativo de la formación de nódulos y un componente esencial de la AON (Figura 6). Puesto que miembros de la

familia proteica "Kelch repeat-containing F-box" participan en la ubiquitinación de proteínas y que TML se localiza en el núcleo, se ha propuesto que TML puede regular factores de transcripción relacionados con la formación de nódulos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce que proteínas son

poliubicuitinadas por TML. Por lo anterior, aún se requiere experimentación adicional, orientada a determinar el mecanismo preciso que juega TML en la regulación negativa en la formación de nódulos mediada por la AON.

Evidencias recientes han demostrado que el gen *TML* es regulado postranscripcionalmente por miR2111 (21-22). Al respecto, se ha demostrado que cuando las leguminosas experimentan bajos niveles intracelulares de nitrógeno, y están interactuando con rizobios, en la raíz se sintetiza el péptido "C-Terminally Encoded Peptide 1" (CEP1). CEP1 viaja vía xilema a la parte aérea de la planta donde es detectado por el receptor "Compact Root Architecture 2" (CRA2) (Figura 6) (24-25). Posterior a la detección de CEP1 se genera una señal sistémica que viaja vía floema a las raíces para activar la formación de nódulos (24-25). Diversas evidencias indican que esta señal es miR2111, por lo que se ha propuesto que CRA2 activa la biosíntesis de miR2111 (Figura 6). Además, la sobreexpresión de miR2111 causa una disminución significativa de los niveles de TML y un fenotipo de supernodulación en *L. japonicus* y *M. truncatula* (21-22). Por lo anterior, se ha propuesto que una vez en las células corticales de la raíz, miR2111 interactúa con el mRNA de *TML* y promueve su degradación en el complejo de silenciamiento inducido por RNAs (RISC). Se ha especulado que la ausencia de la proteína TML permite que diversos factores de transcripción activen la expresión de genes involucrados en la formación de nódulos. Estas evidencias no sólo confirman el papel que juega TML en la AON, sino que también confirman que miR2111 es una señal sistémica promotora de la nodulación.

Autorregulación de la infección (AOI)

La formación excesiva de nódulos es el fenotipo que caracteriza a las mutantes *nark1/har1/sunn* y *tml* (11). Sin embargo, análisis detallados revelan que estas dos mutantes también muestran una excesiva formación de hilos de infección (11). Esta observación indica que la AON inhibe dos procesos genéticos altamente coordinados que ocurren en tiempos y en tipos celulares (epidermis y córtex) diferentes. Por lo anterior, la AON no sólo regula negativamente el programa genético encargado de la formación de nódulos, sino que también inactiva el programa genético que promueve la infección rizobial.

El análisis detallado de las mutantes *nark1/har1/sunn* y *tml* también reveló la existencia de una vía de señalización encargada de regular el número de infecciones a la cual se le ha denominado Autorre-

gulación de la Infección (AOI, siglas en inglés) por rizobios (26). De acuerdo con las observaciones hechas en estas mutantes, se ha planteado que la AOI es regulada por la AON. Hasta el momento se conocen pocos componentes genéticos de la vía AOI. Por ejemplo, se ha demostrado que el receptor de citocininas "Lotus Histidine Kinase 1" (LHK1), el cual se localiza tanto en células epidérmicas, como en el córtex de la raíz, actúa de forma cooperativa con el receptor NARK1/HAR1/SUNN para coordinar las infecciones rizobiales en *L. japonicus* (27). Al respecto, se observó que la doble mutante *lhk1 har1* en *L. japonicus* desarrolla 50% más hilos de infección que las mutantes sencillas y seis veces más que las plantas silvestres. Adicionalmente, el análisis de *lhk1 har1* también reveló que la ausencia de estos dos receptores disminuye considerablemente la expresión de *TML* (27). Estos datos indican que la acción cooperativa de LHK1 y HAR1 es fundamental para restringir la infección rizobial. Evidencias adicionales que apoyan la cooperatividad de la vía AON con la AOI fueron recientemente generadas en *L. japonicus*, donde se demostró que el módulo HAR1-CLE-RS1/2 es necesario para restringir el número de infecciones rizobiales (28).

El hecho de que el receptor LHK1 juegue un papel en la AOI indica que la hormona citocinina también es un elemento clave para regular tanto el proceso de infección como el de formación de nódulos. Sin embargo, estudios recientes en *M. truncatula* indican que el rizobio también juega un papel en la AOI (29). Particularmente en este estudio se demostró que *Sinorhizobium meliloti*, simbionte de *M. truncatula*, una vez dentro de las células del nódulo activa una vía de señalización dependiente de Adenosin 3',5' Monofosfato cíclico (cAMP) que consiste en tres receptores Adenilato Ciclasas (CyaD1, CyaD2, y CyaK), del regulador transcripcional Crp-like dependiente de cAMP y de diferentes genes blanco (29). La activación de esta vía de señalización rizobial conlleva a la producción de un compuesto volátil en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* y evita futuras infecciones rizobiales (29). Estudios farmacológicos y con plantas mutantes permitieron concluir que este compuesto volátil era etileno, del cual se sabe que en altas concentraciones inhibe la simbiosis entre leguminosas y rizobios (29). Todos estos datos indican que la acción coordinada de las hormonas citocininas y etileno, así como del receptor NARK1/HAR1/SUNN, de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13, así como de TML es fundamental para inactivar el proceso de infección rizobial (Figura 6).

Regulación de la nodulación por disponibilidad de nitrato (NO₃)

Como ya se mencionó anteriormente, la FSN permite a las leguminosas crecer en suelos deficientes de nitrógeno. Sin embargo, el costo energético para la leguminosa por obtener este nutrimento mineral de forma simbiótica es alto. Inclusive, si a través de la actividad de "forrajeo del sistema radical" - concepto usado para describir la actividad del sistema radicular para explorar zonas del suelo que contengan nutrimentos - encuentran en el suelo zonas ricas en nitrógeno asimilable, las leguminosas prefieren obtener este nutrimento por una vía no simbiótica. Ante este escenario, las leguminosas "deciden" no establecer simbiosis con rizobios y evitar un gasto energético innecesario. Estudios en diferentes leguminosas han permitido demostrar que la AON también es necesaria para inhibir la simbiosis con rizobios en condiciones óptimas de nitrógeno. Por ejemplo, en soya se ha demostrado que la alta disponibilidad de NO₃ activa en la raíz la producción del péptido CLE denominado "Nitrogen Induced CLE peptide 1" (NIC1) y CLE35 en *M. truncatula* (30-31). Además, se ha demostrado que el péptido CLE-RS2 se produce en respuesta no solamente a rizobios, sino que también a la disponibilidad de NO₃ en *L. japonicus* (32). A diferencia de los péptidos RIC1/CLE-RS1/CLE12 y RIC2/CLE-RS2/CLE13, el péptido NIC1/CLE-RS2/CLE35 actúa de forma local y es detectado por el receptor NARK que también se expresa en la raíz (30-31). Inclusive, mutantes *nark* en soya son capaces de formar nódulos en presencia de NO₃, demostrando que la percepción de NIC1/CLE-RS2/CLE35 por NARK es determinante para inhibir la nodulación en condiciones óptimas de nitrógeno. Estudios en *L. japonicus* y *M. truncatula* han demostrado que la activación transcripcional de CLERS2/CLE35 es mediada por el factor transcripcional denominado "Nitrate Unresponsive Symbiosis1" (NRSYM1) o "NIN-like Protein1", respectivamente (32). Interesantemente, la sobreexpresión de CLE35 o el tratamiento con NO₃ disminuye significativamente la producción de miR2111 y la formación de nódulos en *M. truncatula* (33). Estas observaciones indican que las leguminosas activan la AON cuando hay disponibilidad de nitrógeno mineral y evaden la simbiosis con rizobios para evitar un gasto energético innecesario.

Regulación de la nodulación por disponibilidad de fósforo

Es bien sabido que la baja disponibilidad de fósforo, el segundo nutrimento mineral más importante

para todos los seres vivos, también conlleva a una disminución en la formación de nódulos y en la FSN en diferentes leguminosas. En los últimos diez años se han hecho avances significativos para entender cómo los nódulos se adaptan a la deficiencia de fósforo. Por ejemplo, se ha documentado que la mayoría de las respuestas metabólicas y transcripcionales de nódulos de frijol, soya y *M. truncatula* están orientadas a la captación, uso eficiente y mantenimiento de la homeostasis del fosfato, única forma molecular en la que las plantas toman el fósforo del suelo (34). Inclusive, se han identificado los componentes moleculares que permiten un aporte constante de fosfato de otros órganos de la planta al nódulo.

Con el propósito de entender los mecanismos genéticos que controlan la simbiosis entre leguminosas y rizobios en condiciones deficientes de fosfato, realizamos estudios fisiológicos (i.e., deformación de pelos radicales, número de nódulos y comunicación sistémica) y transcripcionales en plantas de frijol (35). Estos análisis permitieron demostrar que la deficiencia de fósforo reduce el proceso de infección rizobial, probablemente a través de la activación de genes involucrados en la biosíntesis y percepción de las fitohormonas etileno, ácidos abscísico y jasmonato, de las cuales se sabe que inhiben esta simbiosis (35). Además, se observó que la deficiencia de fosfato *per se* activa la expresión de los genes *RIC1* y *RIC2* (35-36). Esta observación sugiere que la deficiencia de fosfato activa la AON en ausencia de rizobios, lo cual fue confirmado mediante estudios genéticos y fisiológicos en mutantes *nark* de frijol y soya. Además, también se demostró que el factor de transcripción "Phosphate Starvation Response1" (*PHR1*), el cual es un regulador maestro de las respuestas moleculares que permiten a las plantas adaptarse a la deficiencia de fosfato, juega un papel muy importante en la regulación de componentes de la AON. (36). Esto debido a que el silenciamiento de *PHR1* causa la disminución de la expresión de *NIN*, *RIC1*, *RIC2*, y *TML*, lo que conduce a la formación del mismo número de nódulos tanto en condiciones óptimas como deficientes de fosfato (36). En general, estos datos indican que la AON es una vía de señalización que permite que las leguminosas formen el número óptimo de nódulos acorde a su estado nutricional.

Conclusión y perspectivas

A través de su proceso evolutivo, las leguminosas han reclutado programas genéticos que les permiten establecer simbiosis con rizobios. Mediante esta simbiosis, las leguminosas pueden crecer en suelos

deficientes de nitrógeno y, además, incorporar formas asimilables de este elemento esencial a la cadena alimenticia. Dado el costo energético que representa la FSN para las leguminosas, también durante su evolución han desarrollado mecanismos genéticos que le permiten tener un balance energético y continuar estableciendo esta simbiosis sin comprometer su desarrollo y crecimiento. Aunque las investigaciones realizadas en las últimas tres décadas han permitido identificar y caracterizar los componentes de la AON y AOI, aún estamos lejos de comprender como las leguminosas regulan el número nódulos e infecciones rizobiales. Por ejemplo, a pesar de que se sabe que la comunicación raíz-vástago-raíz es crucial para regular el número de nódulos, aún queda pendiente identificar la molécula señal que se produce en el tallo y que en la raíz activa la transcripción de *TML*, regulador negativo de la formación de nódulos, en las raíces. En este respecto, es necesario determinar el mecanismo de acción de *TML*, así como las proteínas que son poliubiquitinadas por esta proteína de la familia "Kelch repeat-containing F-box". Puesto que *miR2111* es necesario para regular los niveles de RNAm de *TML*, también es importante entender cómo se regula la biogénesis de este miRNA y cómo la activación de la AON inhibe la acción de este miRNA. Al respecto, ¿la AON inhibe la transcripción del gen *miR2111*?; si es el caso, ¿cuáles serían los mecanismos moleculares de esta inhibición? Otra alternativa para explicar la regulación de la actividad de *miR2111* es que exista un pseudo-blanco que secuestre a este miRNA; si es el caso, ¿cuál es el pseudo-blanco que secuestra a *miR2111*?

Diversas evidencias experimentales indican que la AON juega un papel importante para que las leguminosas ajusten el número de nódulos acorde a su estado nutrimental. Por ejemplo, se ha demostrado que la AON permite que las leguminosas continúen fijando nitrógeno atmosférico en condiciones deficientes de fósforo, pero con una reducción en el número de nódulos y en su actividad metabólica. A pesar de que este conocimiento es de gran importancia para diseñar estrategias experimentales que permitan hacer eficiente la FSN en condiciones deficientes de

fósforo, aún no es claro como la AON se activa en estas condiciones nutrimentales. Por ejemplo, se cuenta con evidencias de que el factor transcripcional *PHR1* juega un papel importante en la activación de la AON en deficiencia de fósforo, pero ¿cuál es su mecanismo de acción? ¿*PHR1* activa la transcripción de *NIN* y a su vez la expresión de los péptidos *RIC1/CLE-RS1/CLE12* y *RIC2/CLE-RS2/CLE13*? O ¿*PHR1* y *NIN* actúan de forma sinérgica para activar la AON en condiciones deficientes de fósforo? Responder experimentalmente estas preguntas generarán conocimiento que permita entender cómo las leguminosas ajustan la FSN ante diferentes condiciones ambientales, particularmente en condiciones de deficiencia de fósforo.

Finalmente, se ha demostrado que regular el número de infecciones rizobiales también es necesario para que la leguminosa alcance un balance energético durante la FSN. A pesar de que se conocen algunos componentes genéticos de la AOI y de que en ciertas leguminosas el rizobio también participa en la AOI, aún se desconoce como se activa la AOI. Al respecto, es necesario determinar en que momento de la infección rizobial se activa la AOI. ¿Se activa al mismo tiempo que la AON? ¿Qué otros componentes genéticos son necesarios para activar y mantener la AOI? Responder experimentalmente estas preguntas nos permitirá comprender de forma integral los mecanismos que usan las leguminosas para mantener un balance energético durante la FSN en cualquier condición ambiental. 

Agradecimientos

M.C.I-A es una estudiante de Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM, y recibe una beca del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) (CVU: 919676). La investigación realizada en el Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas es financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM. Proyecto Número: IN201320) y por el CONACyT (Proyecto Número: A1-S-9454) otorgados a O.V.-L.

REFERENCIAS

1. Ke J, Wang B, and Yoshikuni Y. (2021) Microbiome engineering; synthetic biology of plant-associate microbiomes in sustainable agriculture. *Trends Biotechnol.* 39: 244-261.
2. Murray JD, Liu, C W, Chen Y, Miller AJ (2017) Nitrogen sensing in legumes. *J Exp Bot.* 68: 1919-1926.
3. Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG, Valdés-López O (2016) Common Bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Front Plant Sci.* 7:600.
4. Crews TE, Peoples MB (2004) Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst Environ.* 102: 279-297.
5. Jensen ES, Peoples MB, Boddey RM, Gresshoff PM, Hauggaard-Nielsen H, Alves BJ, Morrison MJ (2012) Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron Sustain Dev.* 32: 329-364.
6. Venkateshwaran M, Volkening JD, Sussman MR, Ane JM (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Curr Opin Plant Biol.* 16:118-127.
7. Oldroyd G (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol.* 11: 252-263.
8. Dénarié J, Debelle F, Promé JC (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.* 65: 503-535.
9. Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R, Udvardi MK, (2020) Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 32: 15-41.
10. DiCenzo GC, Tesi M, Pfau T, Mengoni A, and Fondi M (2020) Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nat Commun* 11: 2574.
11. Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ.* 42: 41-51.
12. Soyano T, Hirakawa H, Sato S, Hayashi M, Kawaguchi M (2014) NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 111:14607- 1461.
13. Hastwell AH, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2015) The structure and activity of nodulation-suppressing CLE peptide hormones of legumes. *Funct Plant Biol.* 42: 229-238.
14. Yoro E, Nishida H, Ogawa-Ohnishi M, Yoshoda C, Suzuki T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M (2019). PLENTY, a hydroxyproline *O*-arabinosyltransferase, negatively regulates root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *J Exp Bot.* 70: 507-517.
15. Kassaw T, Nowark S, Schnabel E, Frugoli J (2017) ROOT DETERMINED NODULATION1 is required for *M. truncatula* CLE12, but not CLE13, peptide signaling through the SUNN receptor kinase. *Plant Physiol.* 174: 2445-2456.
16. Corcilius L, Hastwell AH, Zhang M, Williams J, Mackay JP, Gresshoff PM, Ferguson BJ, Payne RJ (2017) Arabinosylation modulates the growth-regulating activity of the peptide hormone CLE40a from soybean. *Cell Chem Biol.* 24:1347-1355.e7.
17. Miyazawa H, Oka-Kira E, Sato N, Takahashi H, Wu GJ, Sato S, Hayashi M, Betsuyaku S, Nakazono M, Tabata S, Harada K, Sawa S, Fukuda H, Kawaguchi M. (2010) The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development.* 137:4317-25.
18. Crook AD, Schnabel EL, Frugoli JA (2016) The systemic nodule number regulation kinase SUNN in *Medicago truncatula* interacts with MtCLV2 and MtCRN. *Plant J.* 88: 108-119.
19. Sasaki T, Suzuki T, Soyano T, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun.* 5:4983.
20. Mens C, Li D, Haaima LE, Gresshoff PM, Ferguson BJ (2018) Local and Systemic Effect of Cytokinins on Soybean Nodulation and Regulation of Their *Isopentenyl Transferase* (IPT) Biosynthesis Genes Following Rhizobia Inoculation. *Front Plant Sci.* 9:1150.

21. Tsikou D, Yan Z, Holt DB, Abel NB, Reid DE, Madsen LH, Bhasin H, Sexauer M, Stougaard J, Markmann K (2018) Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*. 362: 233-236.
22. Okuma N, Soyano T, Suzaki T, Kawaguchi M. (2020) MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*.11:5192.
23. Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T, Kawaguchi M (2013) Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol*. 54:433-47.
24. Mohd-Radzman NA, Laffont C, Ivanovici A, Patel N, Reid D, Stougaard J, Frugier F, Imin N, Djordjevic MA (2016) Different pathways act downstream of the CEP1 peptide receptor CRA2 to regulate lateral root and nodule development. *Plant Physiol*. 171: 2536–2548.
25. Gautrat P, Laffont C, Frugier F (2020) Compact Root Architecture 2 Promotes Root Competence for Nodulation through the miR2111 Systemic Effector. *Curr Biol*. 30:1339-1345.e3.
26. Sorroche F, Walch M, Zou L, Rengel D, Maillet F, Gibelin-Viala C, Poinso V, Chervin C, Masson-Boivin C, Gough C, Batut J, Garnerone AM (2019) Endosymbiotic *Sinorhizobium meliloti* modulate *Medicago* root susceptibility to secondary infection via ethylene. *New Phytol*. 223:1505-1515.
27. Miri M, Janakirama P, Huebert T, Ross L, McDowell T, Orosz K, Markmann K, Szczyglowski K. (2019) Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytol*. 222:1523-1537.
28. Yoro E, Suzaki T, and Kawaguchi M. (2019) CLE-HAR1 systemic signaling and NIN-mediated local signaling suppress the increased rhizobial infection in the daphne mutant of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Molecular Int*. 33: 320-327.
29. Garnerone AM, Sorroche F, Zou L, Mathieu-Demazière C, Tian C F, Masson-Boivin C, Batut J. (2018). NsrA, a predicted β -Barrel outer membrane protein involved in plant signal perception and the control of secondary infection in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 200: e00019-18.
30. Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff PM. (2011) Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Mol. Plant Microbe Interact*. 24: 606–618.
31. Mens C, Hastwell AH, Su H, Gresshoff PM, Mathesius U, Ferguson BJ (2021) Characterization of *Medicago truncatula* CLE34 and CLE35 in nitrate and rhizobia regulation of nodulation. *New Phytol*. 229:2525-2534.
32. Nishida H, Tanaka S, Handa Y, Ito M, Sakamoto Y, Matsunaga S, Betsuyaku S, Miura K, Soyano T, Kawaguchi M, Suzaki T (2018) A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat Commun*.9:499.
33. Moreau C, Gautrat P, abd Frugier F. (2021) Nitrate-induced CLE35 signaling peptides inhibit nodulation through the SUNN receptor and miR2111 perception. *Plant Physiol*. 185:1216-1228.
34. Hernández G, Valdés-López O, Ramírez M, Goffard N, Weiller G, Aparicio-Fabre R, Fuentes SI, Erban A, Kopka J, Udvardi MK, Vance CP (2009) Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants. *Plant Physiol*. 151: 1221-1238.
35. Isidra-Arellano MC, Reyero-Saavedra MDR, Sánchez-Correa MDS, Pingault L, Sen S, Joshi T, Girard L, Castro-Guerrero NA, Mendoza-Cozatl DG, Libault M, Valdés-López O (2018) Phosphate deficiency negatively affects early steps of the symbiosis between common bean and rhizobia. *Genes (Basel)*. 9:498.
36. Isidra-Arellano MC, Pozas-Rodríguez EA, Reyero-Saavedra MDR, Arroyo-Canales J, Ferrer-Orgaz S, Correa-Sánchez MDS, Cardenas L, Covarrubias AA, Valdés-López O (2020) Inhibition of legume nodulation by Pi deficiency is dependent on the autoregulation of nodulation (AON) pathway. *Plant J*. 103:1125-1139.
37. Rubio LM, Ludden PW. (2005) Maturation of Nitrogensase: a Biochemical puzzle. *J Bacteriol*. 187: 405-414.
38. Dixon R, Kahn D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol*. 2: 621-631.