

Micorrizas y rhizobios: un diálogo molecular con el huésped vegetal

Mycorrhizae and rhizobacteria: a molecular dialogue with plant host

RESUMEN

Los rhizobios (Rhs) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microsimbiontes edáficos que se encuentran asociados a raíces de cultivos. Para los Rhs la mayoría de ellos son leguminosas y para los HMA hay un rango de hospedantes más amplio; sin embargo, hay cultivos que desarrollan la colonización por parte de ambos simbios. En cualquiera de las relaciones simbióticas, los beneficios que reciben los cultivos al ser colonizados por estos microorganismos son variados y contribuyen al empleo de alternativas para la agricultura sostenible. El mecanismo por el cual ambos simbios penetran en su huésped vegetal ha sido estudiado a nivel molecular y se han identificado genes comunes, así como las vías en las que intervienen. Algunos de estos genes se relacionan con la recepción de la señal mediada por los factores Nod, en el caso de los Rhs y por los factores Myc, en el caso de los HMA, otros están relacionados con el mecanismo de penetración y finalmente con la ruta por la cual se comunican el simbiote y la planta. En la presente revisión se realiza un listado de estudios referentes a los microsimbios, a nivel de pre-colonización, colonización y mecanismo compartido. Se presenta una propuesta de posibles genes candidatos comunes para Rhs y HMA para aplicar ingeniería genética, de tal forma que se explora un campo de investigación que se denomina: optimización de genes. Por la similitud por la cual estos simbios penetran en su huésped y por el potencial de modificación genética que esto supone, se describe una estrecha relación molecular, metabólica y fisiológica.

Palabras clave: rhizobio micorrizas arbusculares, ingeniería genética, simbiosis, genes

ABSTRACT

Rhizobacteria (Rhs) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are edaphic microsymbionts that are associated with crop roots. For the Rhs most of them are legumes and for the AMF there is a wider host range; however, there are crops that develop colonization by both symbionts. In any of the symbiotic relationships, the benefits that crops receive when colonized by these microorganisms are varied and contribute to the use of alternatives for sustainable agriculture. The mechanism by which both symbionts penetrate their plant host has been studied at the molecular level and common genes have been identified, as well as the pathways in which they intervene. Some of these genes are related to the reception of the signal mediated by Nod factors, in the case of Rhs and by Myc factors, in the case of AMF, others are related to the mechanism of penetration and finally to the pathway by which the symbiote and the plant communicate. In this review, a list of studies referring to microsymbionts is made, at the level of pre-colonization, colonization and shared mechanism. A proposal of possible common candidate genes for Rhs and HMA to apply

genetic engineering is presented, in such a way that a research field called: gene optimization is explored. Due to the similarity by which these symbionts penetrate their host and due to the potential for genetic modification that this implies, a close molecular, metabolic and physiological relationship is described.

Key words: rhizobium, arbuscular mycorrhizae, genetic engineering, symbiosis, genes

INTRODUCCIÓN

La creación de bioeconomías sustentables enmarcadas en el concepto de economía circular, demanda la optimización de recursos biológicos para mejorar la productividad agrícola. Los hallazgos encontrados durante los últimos 30 años, en cuanto a la simbiosis, el uso de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rhizobios (Rhs), ha sido de gran interés por el impacto que tienen en la agricultura (1-3). La simbiosis es la relación mutualista estrecha entre dos organismos, que tiene un efecto benéfico en la adaptación, ecología y evolución para ambas partes (4-6). Entre las relaciones simbióticas mutualistas más interesantes se encuentran las que se establecen entre hongos, bacterias y células vegetales (7). Los HMA y Rhs se originaron aproximadamente hace 400 y 100 millones de años respectivamente (8-12). Los HMA pertenecen al phyla *Glomeromycota* y son organismos que colonizan entre el 70-90 % de las especies vegetales, algunos autores mencionan que colonizan todas las gimnospermas, 83% de dicotiledóneas y 79% de monocotiledóneas (12, 13); mientras los Rhs son más restringidas al clado FaFaCuRo (Fabales, Fagales, Cucurbitales y Rosales) (14-16).

Los HMA han recibido especial atención desde el punto de vista agrícola por los beneficios que proveen para las plantas; tales como, mayor resistencia a estreses bióticos y abióticos, aumento en la superficie de absorción de agua y nutrientes (11, 15), así como su uso en la bioremediación (17), entre otros. Por su parte, los rhizobios también son muy importantes por la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico, incluso hay estudios que mencionan que podrían fijar la cantidad anual producida de amonio sintético (1, 18). En la actualidad, se ha promovido el uso natural de la simbiosis de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas leguminosas para disminuir la cantidad de nitrógeno aplicado a través de fertilizantes químicos, los cuales, pueden ocasionar eutroficación y disminuir la diversidad de microorganismos del suelo (3, 19).

Los HMA penetran en el hospedante por el córtex del parénquima de las raíces más finas y en el interior de las células forman estructuras ramificadas llamadas arbuscúlos (20); mientras que los Rhs, penetran su hospedero a través de los pelos radiculares, realizan un plegamiento de los mismos hasta que se forma un tubo de infección en el que se desarrolla, en el extremo interno, el simbiosoma (21, 22). Los mecanismos de colonización de HMA y Rhs tienen gran similitud, incluso al grado de activar y/o desactivar genes comunes. Para su estudio, se han utilizado especies de la familia de las leguminosas, las cuales pueden hospedar ambos microsimbiontes y como resultado acumulan mayor masa seca y tienen mayor superficie radical para la absorción de nutrientes (23). Hay evidencia clara de la existencia de un mecanismo compartido en la colonización compartida que induce un tipo de autoregulación entre los microsimbiontes y que ocurre en una constante comunicación con la planta (24).

Por medio de estudios de la composición de comunidades de microorganismos se ha comprobado que diversos hábitats son capaces de albergar una gran diversidad biológica de HMA y Rhs (25), los cuales tienen aplicaciones en la agricultura. Además, recientemente se ha logrado un gran avance en cuanto a la secuenciación y los perfiles de expresión

génica, lo que ha permitido dilucidar aspectos comunes que posee la colonización compartida entre HMA y Rhs (26-30).

Teniendo en cuenta los criterios escritos anteriormente, este artículo constituye una recopilación de una serie de evidencias científicas que reflejan la similitud del comportamiento en el proceso de colonización que realizan los HMA y los Rhs, ante las señales del huésped vegetal. De esta forma se considera esta recopilación de información un puente para definir nuevas líneas de investigación en ingeniería genética, por lo tanto contribuir al estado del conocimiento en cuanto a genes candidatos que podrían modificarse a futuro haciendo más eficiente la relación entre a los Rhs y HMA con sus huéspedes vegetales.

EL MICROSIMBIONTE: LOS RHIZOBIOS

Las bacterias que forman parte de la microbiota del suelo están incluidas, principalmente, en los siguientes phyla: Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi (Chlorobacteria), Firmicutes y Proteobacteria (31, 32). Las raíces, al crecer, incorporan depósitos orgánicos (células muertas + compuestos orgánicos) a nivel de la rizosfera, lo cual resulta en una rizodeposición que modifica la estructura y la composición poblacional de las bacterias. Consecuentemente, se reduce la diversidad, principalmente, de los phyla Acidobacterias, Proteobacterias y Actinobacterias (32).

Las bacterias son atraídas hacia su huésped por células de la rizodermis, rizodepósitos y el mucílago que es exudado en el extremo de las raíces. Ese mucílago está compuesto por ácidos orgánicos e inorgánicos, sideróforos, vitaminas, aminoácidos, purinas y nucleósidos, pero especialmente hay unos compuestos en particular: los flavonoides e isoflavonoides, que son los principales encargados de atraer a las bacterias hacia la planta (33, 34). Los Rhs al percibir la señal comienzan a secretar un lipo-chito-oligosacárido (LCO) mediado por los factores Nod (NF, por sus siglas en inglés) (35, 36 y 37). En el caso de los Rhs, el LCO interactúa con las hidrolasas NFH1 y CHIT5 emitidas por el huésped para preparar así el contacto con la membrana celular vegetal (38).

Por su parte, los Rhs colonizan a la planta, principalmente, por una infección tubular que se forma después de que los pelos radicales se pliegan en forma de bucle, aunque en menor medida, pueden acceder también por heridas, o a través de espacios intercelulares de forma independiente a los factores Nod (31).

Por lo tanto, el proceso de colonización de los Rhs en su huésped transcurre por varias etapas progresivas, que van desde la señalización inicial, la restricción del rango del hospedante, la colonización bacteriana, la autoregulación del número de nódulos (AON por sus siglas en inglés), la maduración bacteriana, la formación del simbiosoma, el desarrollo del metabolismo del nódulo y el transporte hasta que comienza la fase final de senescencia (18, 38).

La correcta comunicación química entre bacteria-huésped depende de los factores Nod y de un acoplamiento adecuado con los receptores de la membrana vegetal. Este proceso es clave para desencadenar la colonización, la cual resulta, posteriormente, en un cambio en el gradiente de calcio en la membrana nuclear de la célula vegetal, lo cual será explicado más adelante.

EL MICROSIMBIONTE: LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Los HMA son organismos que inician su ciclo de vida a partir de un propágulo que puede ser una espora, un fragmento de hifa o de raíz colonizada. El propágulo germina estimulado por señales derivadas del hospedante potencial, aunque también puede germinar en ausencia de estas. Se produce una hifa de germinación que comienza a crecer en busca de un huésped y al encontrarlo se adhiere a las paredes del córtex de las raíces más finas (secundarias o terciarias) produciendo una estructura de sostén denominada apresorio. Posteriormente, penetra al interior del córtex sin atravesar el cilindro central y coloniza la planta intracelular y extracelularmente. Al acceder a las células atraviesa la pared celular, no así la membrana plasmática, ocurre una retracción del citoplasma y la hifa comienza a ramificarse para formar los arbuscúlos, que son las estructuras de intercambio entre el hongo y su huésped. En la mayoría de especies de HMA se producen vesículas que son estructuras de reserva (39), sin embargo, las vesículas no están presentes en todas las especies de HMA, algunas como las pertenecientes a la familia *Gigasporaceae* pueden formar en su lugar estructuras denominadas células auxiliares, pero en el micelio externo y se reconoce que tienen similar función a las vesículas.

Los HMA tienen la particularidad de que son simbioses obligados por lo que requieren un hospedante para completar su ciclo de vida. Cuando encuentran uno, se reproducen aceleradamente e incluso se conoce que comparten varios hospedantes al mismo tiempo a través de una red conectiva de micelio extrarradical, por lo cual su diversidad funcional es alta y le permite tener gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (40, 41). El hongo invagina las células corticales internas, donde produce una ramificación extensa convirtiéndose en una estructura que llena enteramente las células corticales (42). En consecuencia, la arquitectura de la célula hospedante cambia: el núcleo se mueve de una posición periférica a una central, la vacuola comienza a fragmentarse y una extensa membrana periarbuscular se sintetiza de forma continua a la membrana plasmática (43). A pesar de la intensa actividad de ambos simbioses que permite la formación de arbuscúlos en las células, éstos colapsan después de varios días, dejando la célula cortical intacta y lista para hospedar un nuevo arbuscúlo (42).

Existen varias situaciones que se presentan en la relación simbiote-planta, una de ellas es cuando el huésped tiene suficiente disponibilidad de nutrientes, en este caso, las vesículas, almacenan estructuras carbonadas como medio de sobrevivencia siendo muy similar en función a los gránulos de polihidroxibutirato que se presentan en los Rhs (44, 45). Tal es el caso del fósforo, puesto que la planta inactiva genes transportadores de este elemento cuando se presenta alta disponibilidad de éste nutriente (46).

Por otra parte, se ha encontrado que los arbuscúlos proveen de mayor cantidad de fósforo a los tejidos que le proveen mayor cantidad de carbono. Lo descrito anteriormente indica que puede existir un mecanismo de autoregulación por parte de la planta. Se ha encontrado que moléculas como lisofosfatidilcolina (LPC) podrían ayudar al huésped a percibir la concentración de fósforo en el suelo; sin embargo, se necesita profundizar en nuevas investigaciones al respecto, pues no está bien descrito en comparación a lo que sucede con los Rhs (47).

Otra de las características menos exploradas de los HMA es que tienen la capacidad de proteger las raíces del huésped de hifas patógenas, ya que, crecen cerca de 100 veces más rápido que los pelos radicales, lo que les permite una colonización más rápida del área de la raíz. Tal es el caso de la familia *Glomeraceae*, cuyas especies han mostrado alta tolerancia a *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. (46), también es posible que exista un mecanismo molecular de interacción simbiótica aún inexplorado. Lo anterior se suma a muchos otros estudios enfocados en cuantificar la tolerancia a diversos patógenos como: *Alternaria*,

Fusarium, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*, bacterias como *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas syringae*, nemátodos de los géneros *Pratylenchus* y *Meloidogyne*) e incluso insectos como *Otiorynchus sulcatus* (48, 49, 50, 51, 52).

En cuanto a la colonización de los HMA en su huésped es importante señalar que sus propágulos se ven estimulados por flavonoides e isoflavonoides procedentes de las plantas, al igual que como sucede con los Rhs; sin embargo, los HMA se estimulan también por sesquiterpenos como es el caso de las estrigolactonas, las cuales estimulan la ramificación de las hifas germinantes (53). Los flavonoides e isoflavonoides secretados por las plantas activan el proceso de germinación y el crecimiento hifal; y por su parte, los HMA secretan un lipo-chito-oligosacárido (LCO) mediado por los factores Myc (35,36,37) y un oligómero de quitina de cadena corta o quitooligosacárido (COS) (54).

En respuesta a los factores Myc se ha registrado en las plantas el gen ENOD11 como responsable de codificar proteínas ricas en lisina en la membrana, por lo cual, de cierta forma, las plantas también se preparan para recibir a los HMA (55). Además, como se profundizará más adelante, el gen ENOD tiene cierta relación con los Rhs.

Otros genes han sido identificados como necesarios para inducir la formación del apresorio de la membrana perihaustral tal es el caso de los genes DMI2 y DMI3 (18). De manera similar, se ha encontrado en hongos patógenos (*Magnaphora oryzae* y *Colletotrichum inemuthianum*) un gen ortólogo relacionado con la penetración, denominado STE12 (56).

Finalmente, se conocen genes vegetales que codifican para transportadores de fósforo (PT3 y PT4), como responsables de asociarse con las hifas, además de un gen llamado Gmar-CuZnSOD que codifica para la superóxido dismutasa, que le brinda a la planta tolerancia a estrés oxidativo (57).

EL MACROSIMBIOTE: EL HUÉSPED VEGETAL Y EL MECANISMO DE COLONIZACIÓN

En esta sección se realizará un recuento general de lo descrito para el mecanismo de colonización por Rhs, pues, aunque para los HMA ha sido descrito, aún faltan estudios relacionados con los genes involucrados y su regulación. No obstante, en la siguiente sección, se abordarán las similitudes entre ambas vías de colonización.

El papel que juega el huésped vegetal es trascendental en la atracción de Rhs y HMA, así como en la aceptación y en el mantenimiento de los microorganismos, ya que los simbiotes se ven beneficiados por fuentes de carbono producidas por la planta, principalmente sacarosa, hexosas y almidón, en una especie de “comercio mutuo” entre Rhs-HMA-planta (38, 39, 42, 58).

Primeramente, es importante describir cómo la planta realiza el proceso de atracción de las bacterias, dando paso a la pre-colonización o fase presimbiótica; en este paso están relacionados los genes CHS, CHR, FNS y IFS, que son responsables de producir los flavonoides e isoflavonoides, por parte de la planta (59, 60, 61). Algunos investigadores muestran evidencias de que las isoflavonas genisteína y diadzeína producidas por *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris*, inducen la activación de los genes Nod en bacterias simbiotes muy específicas de su especie, como son *Bradyrhizobium japonicum* y *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli (62).

Una vez que la planta percibe los factores Nod en la membrana, se activan genes que inducen la degradación de la pared celular y el plegamiento de los pelos radiculares para

que los Rhs se alojen y se forme el tubo de colonización, en este proceso se han identificado los siguientes genes: NPL, FLOT2, FLOT4 y SYMREM1 (63, 64, 65).

Posterior al estímulo de los genes Nod y al plegamiento de los pelos radiculares, el huésped vegetal, percibe en los receptores de membrana la señal, estos receptores están codificados por los genes de pares ortólogos LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP, los cuales son receptores quinasas con tres dominios extracelulares de lisina (LysM) en el que forman un complejo homo y heteromérico entre la membrana celular y la de colonización (66, 67, 68). De acuerdo a lo anterior, se realiza la comunicación con los factores provenientes de las bacterias, a través del complejo LCO, además de la unión con las hidrolasas NFH1/CHIT5; esa interacción es el punto de entrada para desencadenar en el huésped un complejo de señalización interna, que da comienzo a la infección de los Rhs y en un segundo paso a la organogénesis.

Además, relacionado con la percepción de la señal, se ha registrado que las hormonas vegetales tienen un papel importante, ya que interactúan con los factores Nod y los procesos subsiguientes, tal es el caso de los brasinoesteroides con el gen BRI1 y las estrigolactonas con el gen CCD7, quienes colaboran en la progresión de la colonización por rhizobios, así como citoquininas y auxinas que inician el proceso de organogénesis. Las citoquininas se relacionan directamente con el TF NSP2 y las auxinas con el gen ARF16a, responsable de la regulación positiva en el proceso de colonización (69, 70, 71, 72). Otros genes muy importantes y que se ha comprobado que silenciados reducen la colonización y la cantidad de nódulos, son los relacionados con giberelinas, estos genes codifican para las proteínas DELLA y estas proteínas, a su vez, interactúan con los TF IPD3 y NSP2, necesarios para la transcripción de NIN (iniciación del nódulo) (69).

Posterior a la recepción de la señal en la membrana vegetal, se induce un gradiente de calcio en la membrana nuclear, lo cual reduce el potencial de ingreso del catión. Se ha registrado que existe afectación en los canales de calcio (LjCASTOR, LjPOLLUX/MtDMI1), MtCNGC a/b/c y su ortólogo LjBRUSH, así también como en nucleoporinas (LjNUP85 y LjNUP133), esto propicia que la quinasa MtDMI3/CCaMK y los factores de transcripción LjCYCLOPS/MtIPD3 regulen la expresión positiva del gen NIN, en conjunto con otros dos factores de transcripción llamados NSP1 y NSP2, encontrados en *M. truncatula* (22, 73, 74). NIN, en conjunto con los genes NF-YA y NF-YB, son de gran importancia porque son la señal de partida para que comience la organogénesis y la proliferación de los nódulos (38).

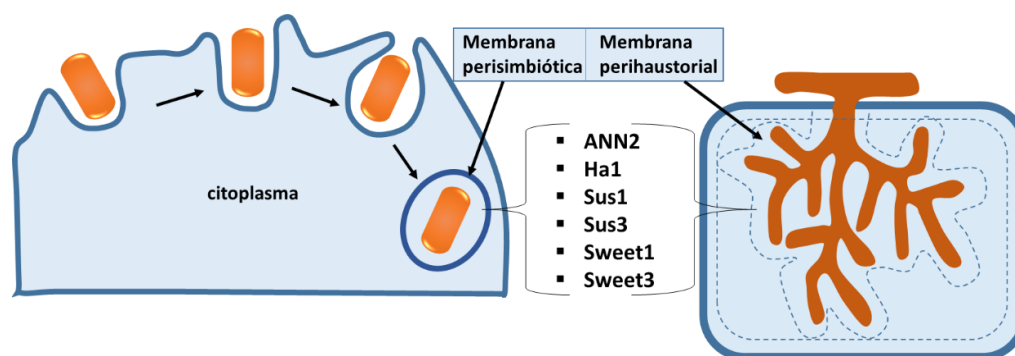
La planta tiene mecanismos para aceptar a los simbios, pero también emite una leve reacción de defensa intentando rechazar a los mismos (75), esta reacción se ha encontrado que es muy similar a la que se produce ante una afectación patogénica y, en consecuencia, se activan muchos genes comunes. Tal es el caso de *Sinorhizobium meliloti* que tiene la capacidad de inducir genes en el hospedante, similares a los que activa la planta cuando es atacada por *Pseudomonas syringae* (26). Lo que sucede a nivel molecular es que los complejos de receptores quinasas de defensa, tales como LRR-RLKs y LysM-RLKs, reconocen las moléculas de Rhs, al tiempo que producen proteínas de tipo NBS-LRR para neutralizar a las bacterias (76). Algunos genes del grupo NBS-LRR, tales como Rj2, Rfg1 y Rj4 están asociados con la restricción del hospedante a un rango de bacterias, debido a que codifican para la familia cinco de proteínas asociadas con patogénesis (77, 78).

En el caso de los Rhs, los nódulos no pueden crecer indefinidamente, es por esta razón, que el hospedante trata de regular la cantidad y el momento de la colonización. Se han logrado identificar al menos cinco factores endógenos y exógenos principales que controlan la nodulación, los cuales, de una manera u otra, se encuentran relacionados. En primera instancia se presenta un mecanismo propio del huésped denominado "sistema de

autorregulación (AON)", mediado por un complejo de señalización inducido por las bacterias, también la cantidad de nitrógeno disponible en el suelo puede influir, la presencia del etileno en la rizosfera, el pH del suelo (principalmente ácido) y varios factores bióticos/abióticos, que pueden ocasionar estrés para la planta huésped y, en consecuencia, producir menos nódulos por un efecto de reducción de las fuentes carbonadas en el sumidero (58). Para el caso del mecanismo AON, los péptidos CLE1 y CLE2 en *M. truncatula*, sus homólogos RIC 1 y RIC 2 en *G. max* y *P. vulgaris* o los CLE-RS1 y CLE-RS2 en *Lotus japonicus*, son los responsables de enviar una señal al tallo de la planta para que se regule la cantidad de nódulos y, en consecuencia, en este órgano vegetal, se forme un complejo de receptores con el péptido para desencadenar una señal que vuelve a ser enviada a las raíces, para frenar el número de nódulos simbióticos (79, 80, 81, 82).

EL MECANISMO DE COLONIZACIÓN COMPARTIDO

Para entender el proceso de colonización, desarrollo y reproducción de los Rhs, inicialmente se trabajó con mutantes que nodulaban poco o no lo hacían. En estos experimentos la idea fue evaluar el comportamiento del huésped vegetal en ausencia o expresión de uno o varios genes (83). En este tipo de experimento se observó una afectación en cuanto a la actividad y capacidad colonizativa de los HMA. Lo anterior llevó a pensar a los investigadores que, de alguna manera, el mecanismo por el cual se abrían paso los microsimbiontes, era más que anatómico-fisiológico y se podría encontrar su origen a nivel molecular (83, 84, 85). Era de esperar encontrar genes comunes ya que estos microorganismos simbioses comparten un mecanismo de entrada en la planta muy similar en el estado previo a ingresar en su huésped, el cual se encuentra separado por una membrana perisimbiótica altamente especializada (86). En los Rhs se forma una estructura llamada simbiosoma (87) y en los HMA se conoce como membrana perihaustral, que es la que rodea los arbúsculos (18). Es a través de esas membranas donde ocurre el intercambio de nutrientes con el huésped (88, 89) y se ha encontrado a los genes HA1 y ANN2 en la planta modelo *Medicago truncatula*, como responsables de acidificar la membrana perisimbiótica y perihaustral, probablemente para facilitar el transporte cruzado entre huésped-simbionte en el caso de HA1 y ANN2 como un inductor del primordio de nodulación, así como de células que contienen arbúsculos (90) (Figura 1).



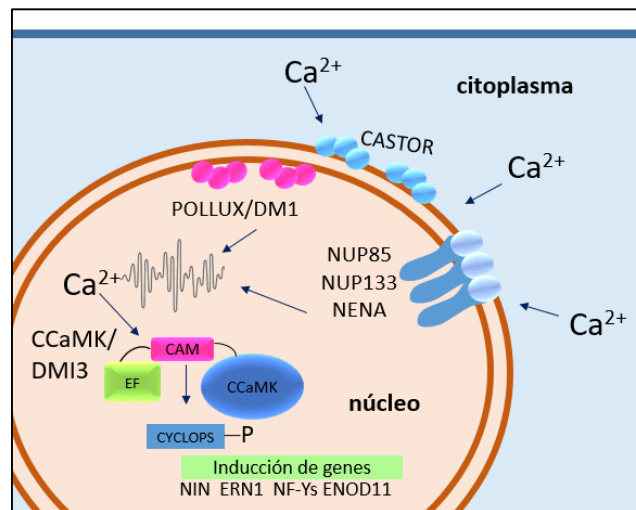
Fuente propia

Figura 1. Genes responsables de acidificar la membrana perisimbiótica y perihaustral (ANN2 y Ha1) y genes responsables de transportar glucosa (Sweet1 y Sweet3) e hidrolizar sacarosa (Sus1 y Sus3)

En cuanto al transporte de fuentes de carbono desde el huésped hacia los simbiontes se ha encontrado en *Medicago truncatula* que Sus1 y Sus3 son genes presentes, tanto en HMA como en Rhs, los cuales codifican para la sacarosa sintasa, cuya responsabilidad es hidrolizar fuentes como sacarosa y almidón (91). En el caso de los HMA se expresa el gen SWEET1b que codifica para un transportador de glucosa desde el huésped a la membrana periarbuscular, lo que se convierte en un factor importante para el crecimiento intraradical del micelio, así como la proliferación de bacterias (Figura 1). Los genes SWEET incluso han sido identificados en hongos y bacterias patogénicas (92).

Aunque el mecanismo por el cual se desarrollan las estructuras de los HMA y Rhs son distintos, en el proceso inicial de la percepción, colonización y el posterior complejo de traducción de señales que da inicio a la nodulación y la micorrización en leguminosas, son muy similares y se pueden incluso solapar. Los genes que se comparten a nivel del proceso de colonización son denominados genes comunes SYM (18), haciendo alusión al proceso de simbiosis. Algunos investigadores han realizado un resumen de al menos siete genes SYM (SYMRK, CASTOR, POLLUX, SYM3, SYM6, SYM15 y SYM24), entre ellos quinasas receptoras, canales putativos de proteínas y nucleoporinas, los cuales son necesarios para la entrada en la epidermis vegetal en ambos simbiontes (93, 94, 95). NUP85 y CYCLOPS también han sido informados (16). En otros cultivos diferentes a las leguminosas, como es el caso de arroz (*Oryza sativa* L.), se ha reportado también genes comunes para Rhs y HMA, tales como CASTOR, POLLUX, DMI3/CCaMK y CYCLOPS (96) (Figura 2).

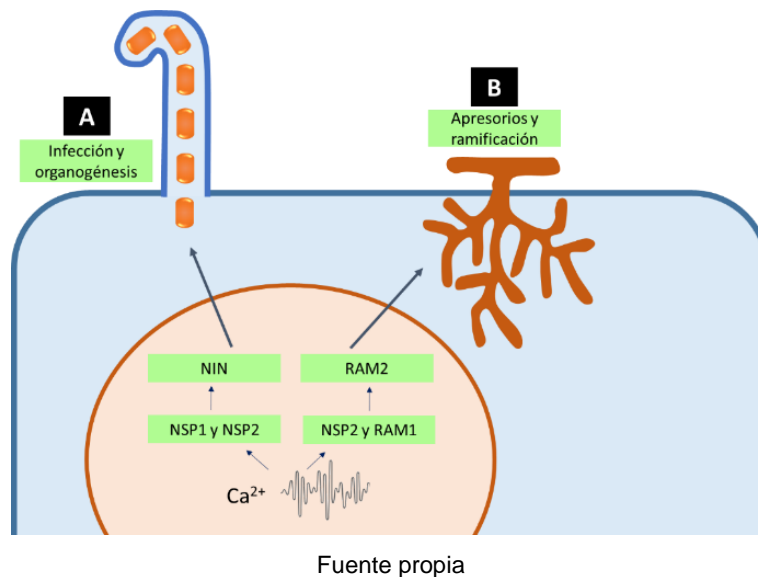
A pesar de que hay genes SYM que comparten los Rhs y los HMA, es importante destacar que ambos simbiontes desarrollaron formas diferentes para colonizar en su huésped. En el caso de los Rhs, forman un tubo que va penetrando las células y en el caso de los HMA un aparato de pre-penetración o apresorio. Algunos investigadores sugieren que el apresorio está relacionado con factores transcripcionales de los genes ENOD11 y ENOD12 que, a su vez, son inducidos por los Rhs (97). Posteriormente otros investigadores encontraron que los ENOD son claves para la colonización y la organogénesis en Rhs y son regulados por ERN1 (Factor de respuesta de etileno requerido para la nodulación 1) (55).



Fuente propia

Figura 2. Genes que codifican para los transportadores de calcio (CASTOR, POLLUX/DM1, NUP85, NUP133, NENA) dentro del núcleo celular vegetal e inducción de una gradiente del catión. Ruta compartida por la colonización de Rhs y HMA

Por otra parte, ambos simbios, tal como se mencionó anteriormente, requieren comunicarse con las raíces del huésped para poder desarrollar el proceso simbiótico. En esta comunicación se mencionó que se activan los genes Nod (en Rhs) y Myc (en HMA), los cuales logran producir un LCOs y LCOs+COS, respectivamente. Algunos hongos formadores de micorrizas como *Rhizophagus irregularis* producen LCOs sulfatados muy similares a los LCOs emitidos por los factores Nod de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* en la planta *M. truncatula*. Esto provoca, en paralelo, que la planta “crea” que será colonizada por Rhs, cuando en realidad será por un HMA, ocasionando así la curvatura de los pelos radicales y la proliferación de raíces laterales (36). A nivel molecular, este acontecimiento desencadena que la leguminosa active el factor de transcripción NSP1 (Ruta de señalización para la nodulación 1) requerido para la nodulación y el gen RAM1 (Requerido para la micorrización arbuscular 1) requerido para la colonización por HMA (98, 99) (Figura 3).

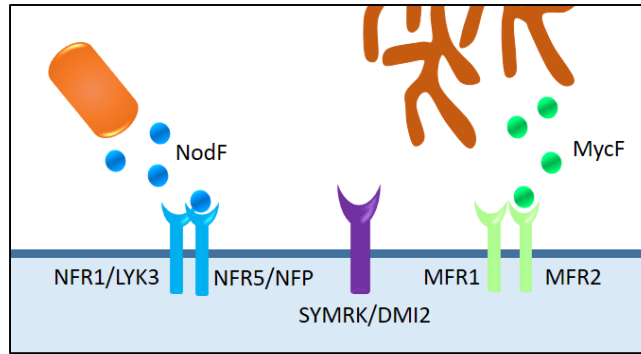


A: en el primer caso, se dispone la activación de NIN para continuar con la colonización y la organogénesis de los nódulos **B:** en el segundo caso se promueve la ramificación de las hifas.

Figura 3. Inducción del mecanismo de aceptación del huésped vegetal al exponerse a Rhs y HMA

Otro mecanismo de percepción de la señal externa y que, además, interactúa con los factores Nod/Myc es llevado a cabo por hormonas, tal es el caso de los brasinoesteroides, con el gen BRI1 y las estrigolactonas con el gen CCD7, los cuales están implicados en la señalización de la simbiosis entre Rhs/HMA (69, 70). Las proteínas DELLA, relacionadas con las giberelinas, también participan en la regulación de la expresión negativa de genes inducidos por los factores Nod para Rhs/MA y esto se manifiesta en la relación estrecha que presentan con los TF IPD3 y NSP2 (100).

A nivel de receptores del huésped, los receptores LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP de la membrana vegetal, perciben el estímulo de los factores Nod. Sin embargo, existe un tercer gen que codifica para un tipo de receptor similar llamado LjSYMRK y su ortólogo MtDMI2. Estos últimos cumplen la misma función, puesto que son del tipo SYM, lo que quiere decir que logran percibir el estímulo, tanto de los HMA, como de los Rhs (Figura 4) (101, 102). El gen LjSYMRK/MtDMI2 fue el primero encontrado como común para la simbiosis de HMA y Rhs. También los receptores MFR1 y MFR2 son específicos de los HMA.



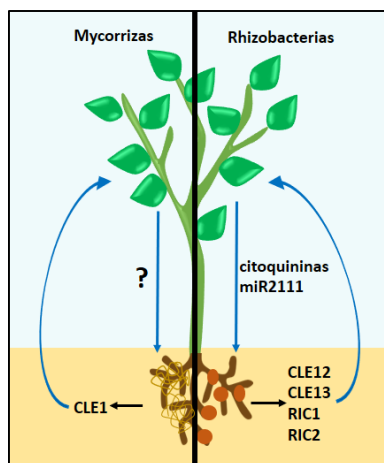
Fuente propia

Figura 4. Genes que codifican para los receptores vegetales involucrados con el reconocimiento de los factores de nodulación y colonización en Rhs y HMA

Una vez percibido el estímulo y dentro del núcleo celular del huésped, se induce una despolarización de la membrana celular y un cambio en el flujo de iones, especialmente de calcio en la membrana nuclear. Este proceso fue descrito anteriormente y, de acuerdo a lo mencionado, quedó demostrada la similitud entre Rhs y HMA, pues el calcio es modulado por los genes DMI1 y NENA, que son compartidos entre Rhs y HMA. DMI1 está relacionado con un canal transportador de Ca^{2+} y NENA con una proteína transportadora por nucleoporinas, ambos afectan en igual medida la infección de los simbiontes (74). Posterior a la despolarización de Ca^{2+} en Rhs, se produce en paralelo una formación de complejos entre proteínas GRAS como factores de transcripción (NSP1, NSP2), en conjunto con los RAM1 y RAM2, los cuales inducen la biosíntesis de monómeros de cutina y están relacionados con la formación de apresorios en HMA (Figura 3).

Otro hecho relevante y que es compartido por los Rhs y HMA es la presencia de hormonas específicas como las proteínas CLE, las cuales actúan como mediadores de la comunicación entre célula-célula en las plantas y están claramente identificadas en *M. truncatula*, así como sus homólogos en otras especies de leguminosas. Específicamente, son las moléculas que le comunican a los brotes para que envíen una señal a las raíces, indicando detener la colonización por bacterias (80, 81) (Figura 5). Sin embargo, estos péptidos también son incorporados en las raíces, a través de los HMA, para modular la arquitectura radicular, favoreciendo el crecimiento lateral e inhibiendo el apical (103). Lo anterior, de alguna manera, hace pensar que pueda haber una implicación directa o indirecta en la regulación de la infección por Rhs, mediada por los HMA, ya que en condiciones de una colonización dual, los péptidos CLE activarán el mecanismo de regulación en las plantas para no permitir más colonización.

Algunos investigadores reportan disminución en la presencia de Rhs por inoculación de HMA (104). En otros estudios, por el contrario, se ha realizado y cuantificado la infección dual por inoculación con Rhs/HMA *versus* inoculación individual y se ha encontrado que, a pesar de que los HMA pueden activar el mecanismo AON por medio de los péptidos CLE, no son suficientes para reducir la infección por Rhs; de hecho, se han visto incluso reducidas en cuanto a la cantidad de hifas en el tejido de su huésped y son más eficientes cuando se inoculan en conjunto con Rhs (23, 105, 106, 107). Lo descrito anteriormente expone cómo no solamente existe una regulación de los simbiontes por parte de la planta; sino que también se da a nivel de los propios microorganismos; sin embargo, no tiene la magnitud suficiente y más bien conviven con su huésped.



Fuente propia

Figura 5. Péptidos CLE enviados desde los nódulos a los brotes y estos, a su vez, activan el mecanismo AON para regular la cantidad de los mismos. CLE1 también es incorporado por HMA, resultando en ramificación de las raíces secundarias

Por otra parte, los Rhs tienen un compuesto característico y abundante: las leghemoglobinas, cuya función es proteger a las bacterias de la entrada de oxígeno para que la nitrogenasa pueda realizar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (21). El gen *VfLb29* es el responsable de producir las proteínas necesarias para la leghemoglobina. Este gen se expresa de igual manera cuando hay infección por HMA, debido a que la expresión del promotor de un gen que codifica para un transportador de fósforo (*StPt3*), activa la expresión de *VfLb29* (18, 108).

Con la llegada de nuevas tecnologías, como los estudios de expresión génica, a través del transcriptoma, se han logrado dilucidar los genes que se activan o silencian cuando una planta es colonizada por HMA, Rhs o ambos. Los primeros estudios en esta temática encontraron 75 genes regulados “corriente arriba” (hacia el extremo 5’) durante el evento de colonización dual (90).

Posteriormente, otros investigadores compararon perfiles diferenciados de expresión de genes (DEGs), y se encontró expresión génica “corriente arriba/corriente abajo” (hacia el extremo 5’/hacia el extremo 3’), siendo 288/233 genes comunes para HMA y Rhs (27). En este estudio se encontraron perfiles de expresión cuantitativa de genes en tres etapas: procesos biológicos (PB), función molecular (FM) y componentes celulares (CC). De acuerdo a lo anterior, en PB se obtuvo alta frecuencia de genes relacionados con procesos metabólicos, rutas energéticas, traducción de señales, transporte y respuesta al estrés; para la etapa FM genes relacionados con enzimas de actividad catalítica como la hidrolasa, oxidoreductasa, proteínas quinasas y actividad transferasa y, finalmente, para la etapa CC, se encontraron genes para la pared celular y la membrana plasmática. En resumen, los genes se agruparon en tres conglomerados de expresión, según los procesos involucrados y se determinó que, tanto los HMA como los Rhs, comparten genes involucrados en los procesos de defensa, la estructura de la pared celular y el metabolismo de N y P (27).

En otro estudio de transcriptómica se realizó un perfil de expresión de genes, pero esta vez en dos plantas distintas (*M. truncatula* y *Casuarina glauca*) colonizadas con HMA y Rhs para evaluar el grado de similitud en la expresión. Se encontraron 24 genes con secuencias homólogas significativas co-expresados “corriente arriba” en las dos especies vegetales,

debido a la colonización dual. Esto sugiere un mecanismo evolutivo conservado que está relacionado con los primeros pasos de la colonización compartida entre ambos simbioses y revelan, posiblemente, los genes que la originaron. Además de lo anterior, 10 de los 24 genes se agruparon en un conglomerado relacionado con proteasas y el resto con genes que codifican para transportadores (28), por lo cual son resultados similares a los encontrados por otros autores (27).

Finalmente, los estudios aquí presentados no necesariamente describen la totalidad de la diversidad de expresión de genes, pues se han realizado en especies modelo y cada huésped vegetal interactúa de forma singular con su(s) simbiote(s). En algunos casos se han inoculado varias especies vegetales con un mismo HMA y se han obtenido respuestas metabólicas similares, a este mecanismo se le conoce como especie-independiente. Por ejemplo, al inocular varias especies vegetales con el hongo *Rhizophagus irregularis* se observó un cambio en el metaboloma de entre 18 - 45 % en todas las especies inoculadas (109, 110). También se ha registrado una asociación especie-dependiente, es decir, al inocular con un hongo varias especies vegetales se ha obtenido un cambio en el metaboloma de una sola especie (111).

El proceso de colonización de los HMA a nivel molecular aún no está esclarecido, por lo cual es necesario profundizar al respecto. En perspectivas futuras, los estudios de expresión de genes y edición de genomas serán clave para dilucidar el mecanismo de la simbiosis dual, a nivel de señalización temprana y colonización temprana, los cuales permitirán a su vez en el caso de los HMA, aclarar cada proceso a nivel molecular.

LA INGENIERÍA GENÉTICA COMO PROA DEL DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO DE LOS HMA Y los Rhs

Con el advenimiento de nuevas tecnologías y herramientas en el campo de la ingeniería genética, existe una tendencia a desarrollar proyectos en esta línea, debido a que cada vez que un estudio se publica, se abren más interrogantes y posibilidades de realizar modificaciones en numerosos campos. En cuanto a los Rhs es importante destacar el potencial que existe en cuanto a la modificación de la aceptación de una bacteria por parte del huésped vegetal.

Según lo mencionado y de acuerdo a lo descrito durante este documento, se han registraron genes del grupo NBS-LRR, tales como Rj2, Rfg1 y Rj4 que están asociados a la restricción del hospedero a un rango de bacterias, debido a que codifican para la familia 5 de proteínas asociadas con patogénesis (77, 78) y esto es motivo de atención para una posible modificación de estos genes. Un grupo de investigadores realizaron las primeras aproximaciones, utilizando CRISPR/Cas9 para aumentar la colonización de cepas incompatibles con soya (*Glycine max*) (78).

Otra investigación (112), en la que se realizó la modificación de los péptidos NCR (nódulo rico en cisteína) fue informada. Estas moléculas tienen un papel importante en la restricción de Rhs y esto le permitió a *M. truncatula* ser colonizada por una cepa de Rhs poco infectiva hasta entonces (103). Finalmente, existe también la posibilidad de modificar los receptores LjNFR1/MtLYK3 y LjNFR5/MtNFP, ya que alteran el grado y la especificidad en que una especie de Rhs logra colonizar al huésped vegetal (113).

Los criterios señalados indican que existe la posibilidad de que diferentes especies vegetales puedan ser colonizadas por más de una cepa de Rhs, aunque puede existir cierta especificidad entre el genoma vegetal y bacteriano, contribuyendo a optimizar la expresión de cada gen. A pesar de lo anterior, también debe asumirse una posición cautelosa para

que el balance hacia la planta o el ecosistema sea siempre positivo, sin embargo, constituye una línea de investigación interesante.

Otro aspecto a considerar es el uso de la transformación genética con el propósito de transferir genes de unas especies de Rhs a otras, en la búsqueda de mejorar la eficiencia de la colonización del huésped. Se ha registrado transferencia de genes Nod de unas bacterias a otras; por ejemplo, de *Rhizobium leguminosarum* a *Rhizobium phaseoli* para que estas últimas colonicen arvejas (*Pisum sativum*), además de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) (114). Por medio de esta tecnología también se abre la posibilidad de transferir genes Nif (fijación de nitrógeno).

La transformación genética puede llevarse a cabo por métodos directos o indirectos. En este caso utilizar métodos indirectos por medio de *Agrobacterium* sería lo indicado, debido a que comparte mucha similitud con los Rhs de leguminosas.

Además de la transformación genética a nivel de bacteria, podría considerarse la transformación a nivel de huésped. Los genes candidatos para este fin son: Rj2, Rfg1 y Rj4 del grupo de los NBS-LRR y los relacionados con los receptores NFR1/LYK3 y NFR5/NFP (alteran el grado y la especificidad en que una especie de Rh logra colonizar al huésped vegetal).

Siguiendo la línea de los Rhs, existe la posibilidad de modificar la enzima nitrogenasa (NifH, NifD, NifK, NifE y NifN), la cual está constituida de una subunidad larga compuesta por Molibdeno-Hierro y una pequeña compuesta por una proteína férrica o reductasa dinitrogenasa. Esta última, se acopla a un complejo de Mg-ATP que entrega energía y dona electrones para la reducción de nitrógeno (114). Esta enzima se ha identificado en la mayoría de las especies de leguminosas infectadas por Rhs, razón por la cual puede ser de especial atención para su modificación genética. El principal objetivo sería hacerla más eficiente mejorando el acoplamiento con Mg-ATP e incrementando la reducción de nitrógeno. Lo anterior provocaría una mayor entrega de amonio (principalmente) a la planta.

Por otra parte, el molibdeno, así como el hierro y el azufre son importantes para la nitrogenasa. Un grupo de investigadores identificaron que los genes MOT1.2/1.3 están relacionados con transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de las células endodermiales los cuales encierran las ramificaciones vasculares del nódulo y estas modulan la entrada, así como la distribución de Mo en las células (115). Aún falta por determinar cómo el Mo es transportado al simbiosoma (38), pero esos genes son candidatos para ser estudiados y descifrar la posibilidad de hacer la subunidad Mo-Fe de la nitrogenasa más eficiente.

Los transportadores de calcio (NENA, CASTOR, POLLUX, NUP85, NUP133, DMI3 y DMI1) también son susceptibles de ser modificados, de tal forma que el gradiente de calcio que se produzca en el núcleo sea motivo de una mayor transcripción de respuesta de la colonización. Resulta importante destacar que, independientemente del transportador que se elija modificar, lo que debe buscarse es la optimización del proceso; es decir, no exceder los límites que la planta pueda tolerar para no causar un desequilibrio en términos de balance energético.

En cuanto a los HMA el uso más común es la extracción de sus propágulos del suelo para inocular *ex-situ* y de esta forma incrementar la cantidad de este tipo de hongo en suelos agrícolas, esto se lleva a cabo debido a que los HMA son poco específicos y pueden colonizar varios hospederos, registrándose así muchos estudios al respecto (116). La identificación de especies nuevas a través de la metagenómica puede apoyar la típica inoculación *ex-situ*; recientemente se encontró especies nuevas en ambientes tan inhóspitos como desiertos y podrían ser utilizados en diversos cultivos para incrementar sus

rendimientos (117). Además, la secuenciación de los HMA podría brindar nuevos descubrimientos en cuanto a genómica y transcriptómica referentes al mecanismo de infección que comparten con los Rhs.

El uso de la ingeniería genética tiene un gran potencial para la agricultura, pero se necesita la secuenciación de especies para identificar y modificar la expresión de genes de interés. Sin embargo, este aspecto ha sido poco investigado y solamente se ha secuenciado *R. irregularis*, en un estudio, donde se realiza una recopilación de genes de interés que pueden ser modificados en esta especie (25). Por su parte, algunos investigadores sugieren utilizar, inicialmente, la información obtenida en otros hongos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* en cuanto a promotores y factores de transcripción (118).

Debido a que la mayoría de HMA no se reproducen sexualmente, convierte a estos organismos en altamente prometedores al utilizar ingeniería genética y biología sintética, ya que los genes que se introduzcan difícilmente se incorporarán de forma cruzada en otras especies (119). Además, este tipo de hongos tiene gran importancia en la fitoremediación de suelos contaminados con metales pesados, puesto que hay registros científicos de la posibilidad de mejorar la expresión de genes que codifican para proteínas quelatantes como fitoquelatinas y metalotioneínas, así como metabolitos como oxalato, los cuales desactivan la toxicidad por metales pesados (25, 120).

A pesar de los beneficios brindados por los HMA mencionados en esta revisión, no es suficiente la investigación que se ha realizado en genética molecular para incrementar los efectos benéficos de estos hongos. Primeramente, la investigación futura debe enfocarse en temas básicos como identificación y expresión de genes que puedan afectar el crecimiento y el metabolismo de las plantas. Por otra parte, con estudios de metagenómica, caracterizar la diversidad que existe en el ambiente edáfico, para de esta forma contar con una amplia variedad de opciones en cuanto a futuras aplicaciones que podrían ser provechosas para el ser humano y los diferentes ecosistemas.

CONCLUSIONES

- Los microsimbiontes (Rhs y HMA) se orientan a su huésped por la señal emitida por las raíces del mismo. Al percibir la señal, ambos microsimbiontes comienzan a activar genes que secretan compuestos que se ligan con la membrana de su huésped para, a su vez, activar el mecanismo de aceptación y acoplamiento por parte de la planta.
- La planta configura su anatomía, expresando genes que le permiten a los microsimbiontes colonizar e intercambiar compuestos químicos en un proceso de comunicación continuo, a través de la membrana perisimbótica y periaustorial para el caso de Rhs y HMA, respectivamente.
- Los genes comunes tienen gran potencial para ser candidatos de modificación genética y de esta forma hacer más eficiente la colonización, ya sea por una o varias especies de microsimbiontes. Es importante evaluar cuando la eficiencia máxima se alcanza de forma individual o con un conjunto de especies/cepas.
- A pesar de que la mayoría de los HMA son complejos de secuenciar por su dificultad de cultivo a nivel de laboratorio, es necesario llevar a cabo este tipo de estudios, así como aprovechar tecnologías actuales, como la metagenómica, para identificar especies y los genes relacionados con las vías de colonización, regulación y expresión. Una vez esclarecidos, se podrán identificar nuevos genes comunes a ambos simbioses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gruber N, Galloway JN. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 2008;451,293-296.
2. Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T. Involvement of autoregulation in the interaction between rhizobial nodulation and AM fungal colonization in soybean roots. *Biol Fertil Soils*. 2013;49:1141-1152
3. Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KH, Varshney RK, Colmer TD, et al. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nat Plants*. 2016;2(2):16112. doi: 10.1038/nplants.2016.112.
4. Wade MJ. The co-evolutionary genetics of ecological communities. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8,185-195. doi: 10.1038/nrg2031.
5. Gilbert SF, Bosch TCG, Ledón-Rettig C. Eco-Evo-Devo: developmental symbiosis and developmental plasticity as evolutionary agents. *Nat. Rev. Genet.* 2015;16,611–622. doi: 10.1038/nrg3982.
6. Kiers ET, West S. Evolving new organisms via symbiosis. *Evolutionary Biology*. 2015;348(6233):392-394.
7. McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG, Carey HV, Domazet-Lošo T, Douglas AE, et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110:3229-3236. doi: 10.1073/pnas.1218525110
8. Simon L, Bousquet J, Lovesque RC, Lalonde M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. 1993;363:67-69.
9. Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. Four hundred million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:11841-11843.
10. Doyle J. F. Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011;24(11):1289-95. doi: 10.1094/MPMI-05-11-0114.
11. Lum MR, Hirsch AM. Roots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient limiting environment. *J Plant Growth Regul*. 2003;21:368-382.
12. Kennedy AC, de Luna LZ. Rhizosphere: Mycorrhizal Associations. In: *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier Ed. 2005. p. 399-406
13. Schüssler A, Schwarzott D, Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*. 2011;105:1413-1421.
14. Kistner C, Parniske M. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends Plant Sci*. 2002;7:511-518.
15. Vessey JK, Pawlowski K, Bergman B. Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. In: *Root physiology: from gene to function*. Springer Ed. 2005 p. 51-78.
16. Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol*. 2008;6,763-775. doi: 10.1038/nrmicro1987
17. Solís-Ramos L, Coto-López C, Andrade-Torres A. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in remediation of anthropogenic soil pollution. *Symbiosis*. 2021. doi: 10.1007/s13199-021-00774-4
18. Manchada G, Garg G. Endomycorrhizal and rhizobial symbiosis: How much do they share? *Journal of Plant Interactions*. 2007;2(2):79-88.
19. Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*. 1997; 277: 504–509. doi: 10.1126/science.277.5325.504.
20. Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun*. 2010;48:1-11 doi: 10.1038/ncomms1046

21. Li X, Feng H, Wen J, Dong J, Wang T. MtCAS31 aids symbiotic nitrogen fixation by protecting the leghemoglobin MtLb120-1 under drought stress in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 2018;9:633. doi: 10.3389/fpls.2018.00633
22. Kim G-B, Son S-U, Yu H-J, Mun J-H. MtGA2ox10 encoding C20-GA2-oxidase regulates rhizobial infection and nodule development in *Medicago truncatula*. *Sci. Rep.* 2019;9(1):5952. doi: 10.1038/s41598-019-42407-3
23. Sakamoto K, Ogiwara N, Kaji T, Sugimoto Y, Ueno M, Sonoda M, et al. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in rhizobial, arbuscular mycorrhizal, and dual symbiosis. *Journ. Plant. Research.* 2019;132:541-568.
24. Sakamoto K, Nohara Y. Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) shoots systemically control arbuscule formation in mycorrhizal symbiosis. *Soil Sci Plant Nutr.* 2009;55:252–257.
25. French KE. Engineering Mycorrhizal Symbioses to Alter Plant Metabolism and Improve Crop Health. *Front. Microbiol.* 2017;8:1403. doi: 10.3389/fmicb.2017.01403
26. Bozsó Z, Maunoury N, Szatmari A, Mergaert P, Ott P, et al. Transcriptome analysis of a bacterially induced basal and hypersensitive response of *Medicago truncatula*. *Plant Mol Biol.* 2009;70:627-646. doi: 10.1007/s11103-009-9496-8
27. Nanjareddy K, Manoj-Kumar A, Gómez B-M, Blanco L, Lara M. Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PLoS ONE.* 2017;12(8): e0182328. doi: 10.1371/journal.pone.0182328
28. Perlick AM, Ku"ster H. Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Mol Plant Microbe Interact.* 2004;17:1063-1077.
29. Tromas A, Parizot B, Diagne N, Champion A, Hoher V, Cissoko M, et al. Heart of Endosymbioses: Transcriptomics Reveals a Conserved Genetic Program among Arbuscular Mycorrhizal, Actinorrhizal and Legume-Rhizobial Symbioses. *PLoS ONE.* 2012;7(9): e44742. doi: 10.1371/journal.pone.0044742
30. Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón, R. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil plant systems. In: Gange AC, Brown C, editors. *Multi trophic interactions in terrestrial systems.* Blackwell Science Press; 1997. p. 65-77.
31. Sprent JI, James EK. Legume evolution: Where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiol.* 2007;144:575-581.
32. Zgadzaj R, Garrido-Oter R, Jensen DB, Koprivova A, Schulze-Lefert P, Radutiou, S. Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *PNAs.* 2016;113(49):7996-8005. doi: 10.1073/pnas.1616564113.
33. Ferguson B, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, et al. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology,* 2010;52:61-76.
34. Sprent JI, Ardley J, James EK. Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist.* 2017;215,40-56.
35. Dénarié J, Debellé F, Promé J-C. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:503-535.
36. Maillat F, Poinso V, André O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, et al. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature.* 2011;469:58-63. doi: 10.1038/nature09622

37. Persson T, Battenberg K, Demina IV et al (2014) Candidatus Frankia Datiscae Dg1, the actinobacterial microsymbiont of *Datisca glomerata*, expresses the canonical nod genes nodABC in symbiosis with its host plant. PLoS ONE 10:e0127630–e0127630
38. Roy S, Liu W, Sekhar R, Crook A, Mysore K, Pislariu C, et al. Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell. 2020;32:15-41. doi:10.1105/tpc.19.00279
39. Solís-Ramos LY, Andrade-Torres A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Tropical Ecosystems Towards its Management? Agri Res & Tech: Open Access J. 2020, 24(4): 556279.
40. Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, et al. Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytol. 2009;181,924-937.
41. den Bakker HC, VanKuren NW, Morton JB, Pawlowska TE. Clonality and recombination in the life history of an asexual arbuscular mycorrhizal fungus. Mol. Biol. Evol. 2010;27:2474-2486.
42. Paszkowski, U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. New Phytol. 2006; 172(1):35-46.
43. Harrison, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol. 1999 50:1:361-389
44. Johnson NC, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen E.B. Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five mesic to semiarid grasslands. Ecology. 2003;84: 1895-1908.
45. Johnson N.C. Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. New Phytol. 2010;185: 631-647.
46. Maherali H, Klironomos JN. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. Science. 2007;316:1746–1748.
47. Ford E, Toby K. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. Current Biology. 2011;21, 775-785. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.018
48. Garcia-Garrido JM, Ocampo JA. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. Soil Biol. Biochem. 1989;21,165-167. doi: 10.1016/0038-0717(89)90027-8
49. de la Peña E, Echeverría SR, van der Putten WH, Freitas H, Moens M. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. New Phytol. 2006;169, 829-840. doi: 10.1111/ j.1469-8137.2005.01602.x
50. Fritz M, Jakobsen I, Lyngkjaer MF, Thordal-Christensen H, Pons- Kühnemann J. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza. 2006;16,413-419. doi: 10.1007/s00572-006-0051-z
51. Pozo, MJ, Azcón-Aguilar, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 2007;10, 393-398. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.004
52. Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. J. Chem. Ecol. 2012;38:651-664. doi: 10.1007/s10886-012-0134-6
53. Akiyama K, Matsuoka H, Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. Nature- 2005;435:750-751.
54. Genre A, Chabaud M, Balergue C, Puech-Pagès V, Novero M, Rey T, et al. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. New Phytol. 2013;198:179-189.
55. Andrianakaja A, Boisson-Dernier A, Frances L, Sauviac L, Jauneau A, Barker DG, et al. AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. Plant Cell. 2007;19:2866-2885.

56. Heupel S, Roser B, Kuhn H, Lebrun M, Villalba F, Requena N. Er1, a novel era-like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2010;23:67–81.
57. Lanfranco L, Novero M, Bonfante P. The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiol.* 2005;137:1319-1330
58. Ferguson B, Mens C, Hastwell A, Zhang M, Su H, Jones C, et al. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell. Environ.* 2018;42:41-51.
59. Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell.* 2006;18:1617-1629.
60. Zhang J, Subramanian S, Stacey G, Yu O. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant J.* 2009;57:171-183.
61. Subramanian S, Stacey G, Yu O. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant J.* 2006;48:261-273.
62. Bolaños-Vásquez MC, Werner D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. phaseoli on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1997;10:339-346.
63. Xie F, Murray JD, Kim J, Heckmann AB, Edwards A, Oldroyd GE. et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:633-638.
64. Haney CH, Long SR. Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:478–483.
65. Lefebvre B, Timmers T, Mbenghe M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, et al. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:2343-2348. doi: 10.1073/pnas.0913320107
66. Haney CH, Riely BK, Tricoli DM, Cook DR, Ehrhardt DW, Long SR. Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3. *Plant Cell.* 2011; 23:2774-2787.
67. Broghammer A, Krusell L, Blaise M., Sauer J, Sullivan J., Maolanon N, et al. Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109(34):13859-13864. doi: 10.1073/pnas.1205171109
68. Moling S, Pietraszewska-Bogiel A, Postma M, Fedorova E, Hink MA, Limpens E. Nod factor receptors form heteromeric complexes and are essential for intracellular infection in *Medicago* nodules. *Plant Cell.* 2014;26:4188–4199.
69. Liu H, Zhang C, Yang J, Yu N, Wang E. Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* 2018;60: 632-648.
70. Cheng X, Gou X, Yin H, Mysore KS, Li J, Wen J. Functional characterisation of brassinosteroid receptor MtBRI1 in *Medicago truncatula*. *Sci. Rep.* 2017;7:9327. doi: :10.1038/s41598-017-09297-9
71. Grunewald W, van Noorden G, Van Isterdael G, Beeckman T, Gheysen G, Mathesius U. Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *Plant Cell.* 2009;21: 2553-2562.
72. Ariel F, Brault-Hernandez M, Laffont C, Huault E, Brault M, et al. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell.* 2012;24:3838–3852.

73. Charpentier M, Bredemeier R, Wanner G, Takeda N, Schleiff E, Parniske M. *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *Plant Cell* 2008;20:3467-3479.
74. Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, et al. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *Plant Cell*. 2010;22:2509-2526.
75. Bapaume L, Reinhardt D. How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front Plant Sci*. 2012;3:223. doi: 10.3389/fpls.2012.00223
76. Cao Y, Halane MK, Gassmann W, Stacey G. The role of plant innate immunity in the legume-rhizobium symbiosis. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2017;68:535-561.
77. Yang S, Tang F, Gao M, Krishnan HB, Zhu H. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:18735-18740.
78. Tang F, Yang S, Liu J, Zhu H. Rj4, a gene controlling nodulation specificity in soybeans, encodes a thaumatin-like protein but not the one previously reported. *Plant Physiol*. 2016;170: 26-32.
79. Ferguson B, Li D, Hastwell AH, Reid DE, Li Y, Jackson SA, et al. The soybean (*Glycine max*) nodulationsuppressive CLE peptide, GmRIC1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor PvNARK. *Plant Biotechnology Journal*. 2014;12, 1085-1097.
80. Mortier V, Den Herder G, Whitford R, Van de Velde W, Rombauts S, D'haeseleer K, et al. CLE peptides control *Medicago truncatula* nodulation locally and systemically. *Plant Physiology*. 2010;153:222-237.
81. Okamoto S, Ohnishi E, Sato S, Takahashi H, Nakazono M, Tabata S, et al. Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant Cell Physiology*. 2009;50:67-77.
82. Reid DE, Ferguson BJ, Gresshoff, PM. Inoculation- and nitrate-induced CLE peptides of soybean control NARK-dependent nodule formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2011;24,606-618.
83. Harrison MJ. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann Rev Microbiol*. 2005;59:19-42.
84. Catoira R, Galera C, De Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, et al. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell*. 2000;12(9):1647-1666.
85. Senoo K, Solaiman MZ, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Akao S, Tanaka A, et al. Isolation of two different phenotypes of mycorrhizal mutants in the model legume plant *Lotus japonicus* after EMS-treatment. *Plant Cell Physiol*. 2000;41:726-732
86. Provorov NA, Borisov AY, Tikhonovich IA. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogenfixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J Theor Biol*. 2002;214:215-232.
87. Roth LE, Stacey G. Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: The symbiosome membrane comes from three sources. *Eur. J. Cell Biol*. 1989;49:13-23.
88. Day DA, Kaiser BN, Thomson R, Udvardi MK, Moreau S, Puppo A. Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules. *Austr J Plant Physiol*. 2001;28:667-674.
89. Parniske M. Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol*. 2000;3:320-328.

90. Manthey K, Krajinski F, Hohnjec N, Firnhaber C, Pühler A, Perlik AM, et al. Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2004;10:1063-1077.
91. Hohnjec N, Perlick AM, Puhler A, Kuster H. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2003;16:903-915.
92. Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, et al. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature.* 2010;468:527-532.
93. Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Charpentier M, Perry J, Miwa H, Umehara Y, et al. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature.* 2005;433:527-531.
94. Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, et al. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell.* 2005;17:2217-2229.
95. Kanamori, N., et al. A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:359-364.
96. Gutjahr C, Banba M, Croset V, An K, Miyao A, An G, et al. Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell.* 2008;20:2989-3005
97. Genre A, Bonfante P. Building a mycorrhizal cell: How to reach compatibility between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *J Plant Interact.* 2005;1:3-13.
98. Gobbato E, Marsh JF, Vernié T, Wang E, Maillet F, Kim J, Benjamin J, et al. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr. Biol.* 2012;22:2236-2241.
99. Charpentier M, Sun J, Vaz Martins T, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, et al. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science.* 2016;352: 1102-1105.
100. Jin Y, Liu H, Luo D, Yu N, Dong W, Wang C, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signaling pathways. *Nat. Commun.* 2016;7:12433. doi: 10.1038/ncomms12433
101. Endre G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kaló P, Kiss GB. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 2002;417: 962-966.
102. Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulde, L., Sato S, Kaneko T. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 2002;417:959-962.
103. Wang G, Zhang G, Wu M. CLE peptide signaling and crosstalk with phytohormones and environmental stimuli. *Frontiers in Plant Sciences.* 2016;6:1211. doi: 10.3389/fpls.2015.01211.
104. Almanza-Ballesteros L, Altamirano-Hernandez J, Peña-Cabriaes JJ, Santoyo G, Sanchez-Yañez JM, Valencia-Cantero E, et al. Effect of Co-Inoculation with Mycorrhiza and Rhizobia on the Nodule Trehalose Content of Different Bean Genotypes. *Open Microbiol. J.* 2010;4:83-92.
105. Liriano R, Núñez D, Barceló R. Effect of the application of Rhizobium and Mycorrhiza in the growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L), dark CC-25-9 variety. *Centro Agrícola.* 2012;39(4):17-20.
106. Ojeda LJ, Herrera R, Furrázola E, Hernandez C. Effect of combined inoculations of Rhizobium-Arbuscular Mycorrhiza in *Leucaena leucocephala* CV: Perú. *Centro Agrícola.* 2014;41(3):17-21.

107. Tajini R, Trabelsi M, Drevon JJ. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Saudi Journal of Biological Sciences. 2012;19(2):157-163. doi: 10.1016/j.sjbs.2011.11.003
108. Fehlberg V, Vieweg MF, Dohmann EMN, Hohnjec N, Puhler A, Perlick AM, et al. The promoter of the leghaemoglobin gene Vflb29: Functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. J Exp Bot. 2005;56:799-806.
109. Fench K. Engineering Mycorrhizal Symbioses to Alter Plant Metabolism and Improve Crop Health. Front. Microbiol. 2017;8:1403. doi: 10.3389/fmicb.2017.01403
110. Schweiger R, Baier MC, Persicke M, Müller C. High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. Nat. Commun. 2014;5:3886.
111. Rivero J, Gamir J, Aroca R, Pozo MJ, Flors V. Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. Front. Microbiol. 2015;6:598. doi: 10.3389/fmicb.2015.00598
112. Wang Q, Yang S, Liu J, Tercskei K, Ábrahám E, Gombár A, Domonkos A, et al. Host-secreted antimicrobial peptide enforces symbiotic selectivity in *Medicago truncatula*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017;114:6854-6859.
113. Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, et al. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature. 2003;425:585-592.
114. Moniish SA, Prasanth R, Vivek P, Saravanan D. Role of Nitrogen Fixers as Biofertilizers in Future Perspective: A Review. Research J. Pharm. and Tech. 2020;13(5):2459-2467.
115. Gil-Díez P, Tejada-Jiménez M, León-Mediavilla J, Wen J, Mysore KS, Imperial J, et al. MtMOT1.2 is responsible for molybdate supply to *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell Environ. 2019;42:310–320.
116. Torrez V, Ceulemans T, Mergeay J, de Meester L, Honnay O. Effects of adding an arbuscular mycorrhizal fungi inoculum and of distance to donor sites on plant species recolonization following topsoil removal. Appl. Veg. Sci. 2016;9,7-19. doi: 10.1111/avsc.12193
117. Symanczik S, Błaszczkowski J, Chwat G, Boller T, Wiemken A, Al-Yahya'ei, MN. Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniana*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. Mycologia. 2014;106,243-259. doi: 10.3852/106.2.243
118. Polli F, Meijrink B, Bovenberg RAL, Driessen AJM. New promoters for strain engineering of *Penicillium chrysogenum*. Fungal Genet. Biol. 2016;89:62-71. doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.003
119. Pawlowska TE. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Lett. 2005;251:185-192. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.007
120. Sayer JA, Gadd GM. Solubilization and transformation of insoluble inorganic metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger*. Mycol. Res. 1997;101:653-661. doi: 10.1017/S0953756296003140