



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL DESARROLLO Y LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO
SOBRE EL COMPLEJO SnRK1 EN SEMILLAS DE FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris*).**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ISRAEL LARA VEGA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
FACULTAD DE QUIMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES
FACULTAD DE QUÍMICA

DR. MARIO ROCHA SOSA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. agosto, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del **Dr. Eleazar Martínez Barajas** en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El **Comité Tutorial** que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas Facultad de Química, UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química, UNAM

Dr. Mario Rocha Sosa Instituto de Biotecnología, UNAM

Durante la realización de esta tesis de maestría conté con una beca de manutención otorgada por CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas por su dirección durante el desarrollo de este proyecto y a la Dra. Lilia Bernal Lugo por sus observaciones y contribuciones para mejorar el proyecto de tesis a lo largo del posgrado.

A la UNAM por permitirme ser parte de esta gran institución.

En general a los profesores que impartieron los cursos del posgrado y de los que aprendí mucho.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	II
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Cultivo de frijol	3
2.1.1 Requerimientos nutricionales del frijol	3
2.1.2 Deficiencia de fósforo	4
2.2 Biología de <i>Phaseolus vulgaris</i>	6
2.2.1 Características de la semilla del frijol	8
2.2.2 Partes de la semilla de frijol	8
2.3 Características generales del crecimiento y desarrollo de la semilla	9
2.3.1 Control materno	13
2.3.1.1 Rol de la cubierta	13
2.3.2 Transición de un control materno a un control filial	14
2.3.3 Regulación de la maduración vía fosforilación de proteínas	15
2.4 Sucrose non-fermenting-1-related protein Kinase-1 (SnRK1)	15
2.5 Composición del complejo cinasa SnRK1	16
2.5.1 Subunidad α	18
2.5.2 Subunidad β	19
2.5.3 Subunidad γ	20
2.5.4 Subunidad $\beta\gamma$	20
2.6 Blancos de snrk1	22
2.7 Factores que regulan la actividad de SnRK1	24
2.7.1 Regulación de SnRK1 por fosforilación.	25
2.8 SnRK1 en el desarrollo de las semillas.	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPOTESIS	30
III. Objetivos	31
3.1 Objetivo general	31
3.2 Objetivos particulares	31
IV. Metodología	32
4.1 Cultivo de frijol	32
4.2 Extracción de proteína en semilla	33
4.2.1 Desalado de extractos	34

INDICE

4.3 Cromatografía de exclusión molecular	34
4.4 Determinación de proteína por el método de Bradford	34
4.5 Entrecruzamiento de proteínas con DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate])	35
4.6 Determinación de la actividad cinasa de SnRK1	35
4.7 SDS-PAGE	36
4.8 Identificación de subunidades del complejo SnRK1 por Western Blot	37
V. Resultados	39
5.1 Efectos de la deficiencia de fósforo en plantas de frijol.	39
5.2 Subunidades del complejo cinasa SnRK1 en semilla de frijol.	40
5.3 Actividad de SnRK1 en diferentes estadios de desarrollo de la semilla de frijol y en condiciones de deficiencia de fósforo	41
5.4 Actividad y subunidades de SnRK1 presentes en los diferentes compartimentos de la semilla de frijol	42
5.4.1 Efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la abundancia relativa de las subunidades de SnRK1 en los diferentes compartimentos de la semilla de frijol.	44
5.5 Evaluación de la composición del complejo SnRK1 en semilla de frijol por cromatografía de exclusión molecular.	46
5.6 Evaluación de la composición del complejo SnRK1 en semilla de frijol por entrecruzamiento con DSP.	49
VI. Discusión	54
6.1 Actividad de SnRK1 a lo largo de desarrollo de la semilla	56
6.2 Composición de SnRK1 en semillas de frijol.	60
VII. Conclusiones	63
VIII. Perspectivas	64
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada.	33
Tabla 2. Condiciones de los anticuerpos utilizados.	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Partes de la semilla en <i>Phaseolus vulgaris</i> : Cubierta y Embrión: cotiledón y eje embrionario. Vaughan, 1970; Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol Voluble, 2007	9
Figura 2. Secuencia de eventos durante la diferenciación de los órganos de almacenamiento de la semilla. Weber <i>et al.</i> 2005.	11
Figura 3. Características fisiológicas y bioquímicas del desarrollo en semilla de leguminosas. Weber <i>et al.</i> 2005.	12
Figura 4. Composición del complejo activo SNF1/AMPK.	17
Figura 5. Subunidades que componen al complejo AMPK/SNF1/SnRK1 y cinasas activadoras para AMPK/SNF1/SnRK1. Robaglia <i>et al.</i> , 2012.	18
Figura 6. Características estructurales de las subunidades de SnRK1. Biuntik <i>et al.</i> , 2003.	21
Figura 7. Vía de señalización de SnRK1.	23
Figura 8. Secuencia consenso de fosforilación para SnRK1. Dale <i>et al.</i> , 1995.	24
Figura 9. Representación del cruce de fosforilación entre SnAK1/2 y SnRK1.	26
Figura 10. DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate])	35
Figura 11. Efectos visibles de la deficiencia de fósforo.	39
Figura 12. Efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la abundancia relativa de las subunidades del complejo SnRK1 durante el desarrollo de semillas de frijol.	41
Figura 13. Actividad de SnRK1 durante el desarrollo de semillas de frijol y deficiencia de fósforo; western-blot de subunidad catalítica.	42
Figura 14. Distribución de la actividad y de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en semillas control de 20 DDA.	43
Figura 15. Tinción Comasie en geles de acrilamida SDS-PAGE para extractos de cubierta, cotiledón y eje embrionario de semillas de 20 y 25 días en condiciones control y deficientes de fósforo.	44
Figura 16. Análisis por western-blot de la distribución de las subunidades del complejo SnRK1 en cubierta (Cub), cotiledón (Cot) y eje embrionario (Eje) de semillas de 20 y 25 DDA producidas por plantas en condiciones control y deficientes de fósforo.	45
Figura 17. Distribución de la actividad de SnRK1 e identificación por western-blot de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en un extracto de embriones de semilla control de 20 DDA fraccionado en una columna de Superdex-200.	46
Figura 18. Análisis de la distribución de la actividad de SnRK1 e identificación por western-blot de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en extractos de embriones de semillas de 25 DDA provenientes de	47

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

plantas control y deficientes en fósforo y fraccionados en una columna de Superdex-200.	
Figura 19. Análisis de la distribución de la actividad de SnRK1 e identificación por western-blot de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en un extracto de eje embrionario de semillas control de 20 DDA fraccionado en una columna Sephacryl S-300.	49
Figura 20. Actividad relativa de SnRK1 en extractos de eje embrionario y cotiledón de semillas control de 20 DDA tratados con 0, 0.5, 1 y 5 mM de DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate])	50
Figura 21. Tinción con azul de Coomassie de geles SDS-PAGE donde proteínas extraídas de cotiledones control de 20 DDA y tratadas con DSP en condiciones reductoras y no reductoras.	51
Figura 22. Efecto diferentes concentraciones de DSP sobre la distribución de la subunidad catalítica (α) del complejo SnRK1 en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR) en extractos de cotiledon de semillas control de 20 DDA.	52
Figura 23. Análisis del efecto de DSP sobre las subunidades α , $\beta\gamma$ y γ presentes en cotiledones de semillas control de 20 DDA.	53

RESUMEN

Los complejos enzimáticos SNF1/AMPK/SnRK1 son sensores metabólicos que se han conservado a través de la evolución en todos los organismos eucariotes desde los unicelulares (SNF1) a los animales (AMPK) y plantas (SnRK1) (Ghillebert *et al.*, 2011). En plantas, SnRK1 se activa por condiciones de estrés como privación de nutrientes, oscuridad, etc. Al favorecer los procesos catabólicos, al mismo tiempo que limita el consumo de energía en procesos anabólicos, SnRK1 contribuye a la homeostasis energética e incrementa las probabilidades de sobrevivencia (Baena-González *et al.*, 2007). A través de la modulación de la actividad enzimática por fosforilación directa de varias enzimas metabólicas, y mediante la regulación de la expresión génica, estas cinasas influyen en el control del crecimiento y desarrollo de los organismos (Halford y Hey, 2009), lo que ha convertido a SnRK1 en un candidato cuya manipulación podría contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos en ambientes extremos.

En este trabajo se analizó el efecto del desarrollo y de la disponibilidad del fósforo sobre la actividad de SnRK1 y sobre la abundancia relativa de las subunidades que componen este complejo para observar si este tipo de estrés es capaz de modificar la actividad y composición del complejo durante el desarrollo de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Los resultados muestran que en condiciones normales, la máxima actividad de SnRK1 se presenta en el día 20 después de la floración y que el eje embrionario, es el órgano que registra la mayor actividad. En condiciones de deficiencia de fósforo esta etapa se prolonga hasta el día 25. En contraste de lo que ocurre en otros sistemas donde el complejo activo es heterotrimérico (α - β - γ), se estableció que en semillas de frijol en desarrollo podría existir un complejo activo heterodimérico formado por la subunidad catalítica α y la subunidad regulatoria $\beta\gamma$, ésta última única en plantas.

ABSTRACT

SNF1/AMPK/SnRK1 enzyme complexes are metabolic sensors that have been conserved through evolution in all organisms from unicellular eukaryotes (SNF1) animals (AMPK) and plants (SnRK1) (Ghillebert *et al.*, 2011). In plants SnRK1 complex is activated by nutrient deprivation, darkness and stress conditions, and allows the survival of the plant maintaining energy homeostasis and producing catabolic processes and limiting energy consumption in anabolic processes (Baena-González *et al.*, 2007). These kinases are capable of controlling the growth and development of an organism through the modulation of enzymatic activity by direct phosphorylation of various metabolic enzymes, and by regulating gene expression (Halford and Hey, 2009), so that SnRK1 has become a potential candidate for manipulation in order to improve crop performance in harsh environments. Using extracts of tissues that make up the seed of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different stages of development and under conditions of phosphorus deficiency, a type of common nutritional deficiency in soils where it is grown, *in vitro* studies were conducted to measure SnRK1 activity and gene expression by western blot assays in order to observe whether this kind of stress is able to modify the activity and composition of the complex during development of bean seed. The results showed that the maximum SnRK1 activity in bean seeds is observed at day 20 after flowering. Embryo, specifically the embryonic axis, is the organ that registers the highest activity. Under conditions of phosphorus deficiency, this stage lasts until the day 25. In contrast to what occurs in yeast and animals, where the active complex is heterotrimeric (α - β - γ), here it was established that a heterodimeric α - β γ complex active is responsible for the enzymatic activity in bean developing seeds.

I. INTRODUCCIÓN

Las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1 son complejos enzimáticos que funcionan como sensores energéticos y cuyas características fundamentales se han conservado a través de la evolución: SNF1 en las levaduras, AMPK en las células animales y SnRK1 en las plantas (Ghillebert *et al.*, 2011).

Mientras que en las levaduras y en las células animales los complejos SNF1 y AMPK se activan ante una deficiencia energética (reconocida por el aumento en la concentración de glucosa y el AMP respectivamente), en las plantas, la actividad de SnRK1 responde a condiciones de estrés (privación de nutrientes, oscuridad, etc.). En todos los casos, al limitar el consumo de energía en procesos anabólicos, contribuyen a la capacidad de supervivencia de los organismos (Baena-González *et al.*, 2007).

Al fosforilar enzimas que ocupan posiciones clave en distintos procesos metabólicos, así como al modificar la expresión génica, las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1 también participan en el control del crecimiento y desarrollo de los organismos bajo condiciones normales (Halford y Hey, 2009).

A nivel mundial, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más consumida por el hombre (Broughton *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003), especialmente por sectores con bajos recursos económicos. No obstante su importancia, generalmente se cultiva en condiciones de temporal, en suelos de baja fertilidad y con la escasa aplicación de insumos, de allí que la sequía y el ataque de plagas y enfermedades sean algunas de las causas principales por las que los rendimientos son bajos. Además de esto, amplias regiones dedicadas al cultivo de frijol se caracterizan por tener suelos con grado elevado de alcalinidad o acidez, lo que limita seriamente la disponibilidad de

nutrientes. La disponibilidad de fósforo (P) resulta particularmente afectada (Graham *et al.*, 2003).

Las plantas disponen de diversos mecanismos para el diseño de las estrategias con las que enfrentan condiciones ambientales adversas. Dado el papel clave de la actividad de SnRK1 para regular diversos aspectos del metabolismo de carbono, especialmente en respuesta a condiciones de estrés, el propósito de este trabajo es determinar si la actividad y composición del complejo SnRK1 se ve modificada durante el desarrollo de las semillas de frijol tanto en condiciones normales, como en respuesta a los estímulos generados por la deficiencia de fósforo.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), es la especie más conocida del género *Phaseolus* de la familia Fabaceae. El frijol cuenta con numerosas variedades de las cuales se consumen tanto las vainas verdes como los granos secos (Hernández *et al*, 2007). Al frijol corresponde más del 50% del consumo de leguminosas en el mundo (Broughton *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2003) y para muchos habitantes de Centro y Sudamérica, es la principal fuente de proteína. En México, es un cultivo estratégico, pues cada año se siembran alrededor de 1.8 millones de hectáreas (ocupa el segundo lugar en superficie sembrada) con un rendimiento promedio de 0.7 ton/ha, muy cercano al promedio Latinoamericano (SIAP, 2003). Si bien se le cultiva en todo el país, los estados de Zacatecas, Durango, Sinaloa, San Luis Potosí, Guanajuato y Chiapas destacan como los productores más importantes. Aproximadamente el 84% de la superficie destinada a este cultivo se ubica en áreas de temporal donde los suelos con frecuencia son poco fértiles, por lo que la falta de lluvia y las deficiencias nutricionales se convierten en limitantes muy importantes de la producción (SAGARPA-CEA, 2013).

2.1.1 Requerimientos nutricionales del frijol

La actividad fotosintética que realizan las plantas les permite usar la energía solar para convertir el CO₂ en azúcares. Sin embargo, también necesitan de diversos minerales que son empleados para la síntesis de moléculas complejas y/o en la regulación de procesos metabólicos (Karp, 1998). Los minerales necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas se clasifican, de acuerdo a las cantidades requeridas, en *macronutrientes* (Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre) y *micronutrientes* (Hierro, Manganeso, Zinc, Cobre, Molibdeno, Boro y Cloro). Los primeros son usados en grandes cantidades, mientras que los segundos son necesarios en cantidades mucho menores

(Ascencio y Fargas, 1973). La disponibilidad de nitrógeno (N) y fósforo (P), así como el grado de acidez o alcalinidad de los suelos son factores que frecuentemente limitan la producción del frijol en muchas de las regiones donde se le cultiva (Graham *et al.*, 2003).

2.1.2 Deficiencia de fósforo

Generalmente, la concentración total de fósforo en los suelos es alta, sin embargo, la forma asimilable (fosfato inorgánico (Pi)), rara vez es mayor a 10 uM (Poirier y Bucher, 2002), cantidad que resulta insuficiente para la mayoría de los cultivos.

El fósforo es un elemento que interviene en procesos importantes como: la producción de energía (síntesis de ATP), transporte de nutrientes, transferencia de información genética, formación de estructuras de membrana, entre otros. Su contenido representa del 0.2 a 0.5% peso seco de las plantas, es un elemento móvil que en condiciones de deficiencia se moviliza y concentra en los tejidos nuevos (Marschner, 1995; Schachtman *et al.*, 1998).

Las plantas solo pueden asimilar el fósforo que está presente como iones ortofosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}), por lo que su disponibilidad está condicionada por reacciones fisicoquímicas y biológicas en el suelo. Por ejemplo en suelos muy alcalinos o muy ácidos, pueden formarse compuestos o precipitados no aprovechables por las plantas. En suelos muy alcalinos reacciona con calcio y magnesio y forma precipitados que no pueden ser asimilados, mientras que en suelos muy ácidos al reaccionar con hierro, aluminio y manganeso tampoco son aprovechables (Raghothama, 1999; Poirier y Bucher, 2002).

La falta de P tiene muchos efectos sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas, pero algunos de los más notorios son la reducción en el crecimiento de la parte aérea (tallos, hojas, yemas axilares, etc.), así como la disminución en el número (Lynch *et al.*,

1991) y tamaño de las hojas (Marschner, 1995), lo que a su vez puede ser indicativo de efectos negativos en la división y/o en la expansión celular (Chiera *et al.*, 2002). Generalmente, la producción de clorofila resulta menos afectada, por lo que al disminuir el tamaño de las hojas, éstas adquieren un color verde más oscuro (Chiera *et al.*, 2002).

La deficiencia de P tiene menor efecto sobre el crecimiento de la raíz; sin embargo, induce cambios en su morfología y estructura: se incrementa el número de raíces adventicias, disminuye la ramificación de raíces laterales y aumenta la densidad y el tamaño de los pelos radicales. En conjunto, estas modificaciones son importantes para maximizar la exploración de las capas superiores del suelo (Fragoso 2004; Lynch, 1995; Lynch y Brown 2001; Schachtman *et al.*, 1998). En *Arabidopsis* y en otras especies vegetales como *Medicago truncatula*, soya y maíz la multiplicación de pelos radicales es una de las modificaciones más relevantes (Schachtman *et al.*, 1998; Schmidt, 2001). Estas extensiones de las células epidérmicas incrementan el contacto de la raíz con el suelo y aumentan el volumen de suelo explorado. Se ha estimado que hasta el 63% del P que las plantas toman del suelo se absorbe por los pelos radicales (Grotz y Guerinot, 2002). El crecimiento de los pelos radicales es muy rápido, por lo que su aparición constituye una respuesta casi inmediata a condiciones ambientales cambiantes (Bates y Lynch 2000a). Sin embargo, la capacidad para producir pelos radicales en respuesta a la deficiencia de P tiene un componente genético importante.

En otras especies (como *Lupinus albus*), ante la deficiencia de P se induce la formación de raíces proteoides, las cuales son raíces laterales primarias con grupos de raíces secundarias y terciarias organizadas en forma compacta (Watt y Evans, 1999) y especializadas en la exudación de ácidos orgánicos que contribuyen a solubilizar el P que se encuentra formando complejos (Neumann *et al.*, 1999). Las células corticales de raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* que sufren deficiencia de P muestran la aparición de grandes vacuolas, invaginaciones del plasmalema y mitocondrias amorfas (Wanke *et*

al., 1998). Por otro lado, los efectos de la deficiencia de P son dependientes de la etapa de desarrollo de las plantas. En etapas avanzadas la formación de órganos reproductivos se retarda, el número de flores disminuye y la senescencia prematura de las hojas restringe la formación de semillas (Marschner, 1995). Sin embargo, independientemente de la etapa afectada, la falta de P hace que las plantas crezcan más lentamente y acumulen menos biomasa (Bates y Lynch, 2000b).

Los cambios estructurales y morfológicos mencionados involucran modificaciones importantes en el metabolismo del carbono. En soya, la deficiencia en P reduce la cantidad y la actividad de la Rubisco, lo que se refleja en una menor tasa fotosintética (Lauer *et al.*, 1989). En frijol no se han observado cambios importantes en la actividad fotosintética (Ciereszko y Barbachowska, 2000). Sin embargo, en ambos casos se presentan incrementos en los niveles de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) así como la disminución de actividad de sacarosa fosfato sintasa, invertasas, ADP glucosa pirofosforilasa (Ciereszko y Barbachowska, 2000) y aumento de la UDP glucosa pirofosforilasa (Ciereszko *et al.*, 2001). Se ha sugerido que estos cambios forman parte de una estrategia general para adaptar el metabolismo a las necesidades que plantea la deficiencia en P.

Es probable que los cambios morfológicos y las alteraciones metabólicas que presentan las plantas que sufren deficiencia de P contribuyan a crear cierto grado de tolerancia a esta condición, lo cual en última instancia depende de la expresión de múltiples genes e involucra diferentes mecanismos (Ciereszko *et al.*, 2001).

2.2 Biología de *Phaseolus vulgaris*

P. vulgaris es una planta de crecimiento rápido, su sistema radicular está constituido por una raíz principal y un gran número de raíces secundarias; sus hojas son sencillas, de

tamaño variable según el genotipo, la flor es de diversos colores, el fruto es una vaina de color y dimensiones variables, de forma cilíndrica, en cuyo interior se llegan a encontrar de 4 a 7 semillas (Graham y Ranalli, 1997).

De acuerdo con la forma de crecimiento de la planta, los cultivos de frijol se pueden agrupar en cuatro tipos: a) *Arbustivo*. El tallo principal y las ramas laterales terminan en una inflorescencia, lo que detiene su crecimiento. La altura de las plantas varía normalmente entre 30 y 50 cm (aunque existen casos de plantas enanas que no rebasan los 25 cm), presentan floración temprana y la floración es rápida. b) *Arbustivo indeterminado*. En este caso las plantas siguen creciendo aun después de que se ha llevado a cabo la floración, posee un bajo número de ramas y frecuentemente desarrollan una rama guía. c) *Indeterminado postrado*. Las plantas se caracterizan por una ramificación abundante, tanto el tallo principal como las ramas tienen aptitud trepadora gracias a las guías que se presentan en la parte terminal. La etapa de floración es más prolongada que en los casos anteriores y la madurez de sus vainas se ve un poco retardada. d) *Trepador*. El tallo alcanza hasta 2 o más metros de altura si es guiado y las ramas son poco desarrolladas, la floración se prolonga durante varias semanas, observándose vainas casi secas en la parte basal de la planta, mientras que en la parte alta sigue la floración (Graham y Ranalli, 1997; Graham y Rosas, 1979).

Las flores de las plantas de frijol tienen la morfología ideal para la autopolinización, el polen cae directamente sobre el estigma lo cual provoca la rápida apertura de las flores. Cada flor polinizada forma una vaina. Este tipo de frutos pueden ser planos o cilíndricos y se caracterizan por estar compuestos por dos valvas que envuelven de 4 a 7 óvulos. Durante los primeros 3 o 4 días posteriores a la fecundación, las vainas se elongan lentamente portando los rudimentos florales en su parte apical que después caen. Los

factores ambientales, como la escasez de nutrientes, falta de agua y otros, pueden ocasionar que algunos de los óvulos aborten (Graham y Ranalli, 1997).

Las semillas inician su desarrollo poco antes que las vainas alcancen su máxima longitud, sin embargo, su crecimiento en esta etapa es limitado. Una vez que la vaina alcanza su máxima longitud, las semillas crecen con rapidez, gracias a la acumulación de grandes cantidades de almidón y proteínas (Graham y Ranalli, 1997).

2.2.1 Características de las semillas de frijol

A diferencia de los animales, las plantas están limitadas en su habilidad de buscar las mejores condiciones para la vida y el crecimiento. Por consiguiente, han evolucionado de muy diversas formas para propagarse y aumentar la población a través de las semillas (Leython y Jáuregui, 2008). El desarrollo de la semilla es crucial en el ciclo de la vida de las plantas, está programado genéticamente y correlacionado con cambios en el nivel de metabolitos (Leython y Jáuregui, 2008). El control de la diferenciación inicialmente es ejercido por los órganos de origen materno; posteriormente, pasa a los órganos filiales a medida que éstos se especializan (Weber *et al.*, 2005).

2.2.2 Estructura de la semilla del frijol

El frijol es una planta dicotiledónea; sus semillas están compuestas por 2 estructuras básicas: el embrión, que a su vez está formado por un eje embrionario formado por una radícula y un par de hojas pequeñas, y los cotiledones que son grandes y carnosos; y la testa o cubierta que es de origen materno. El endospermo es absorbido por los cotiledones en etapas tempranas del desarrollo de la semilla por lo que las sustancias de reserva se acumulan en los cotiledones, es decir, en el embrión (Strassburger,

1994). En la superficie de la cubierta pueden verse además varias estructuras: el hilo o hilio que es una cicatriz que queda al separarse la semilla de su tallo (funículo), el micrópilo que es un pequeño poro cercano al hilo y el rafe que es un bordo en la semilla producido por el encorvamiento de la semilla contra el funículo (Vaughan, 1970). La siguiente Figura muestra la estructura de las semillas del frijol:

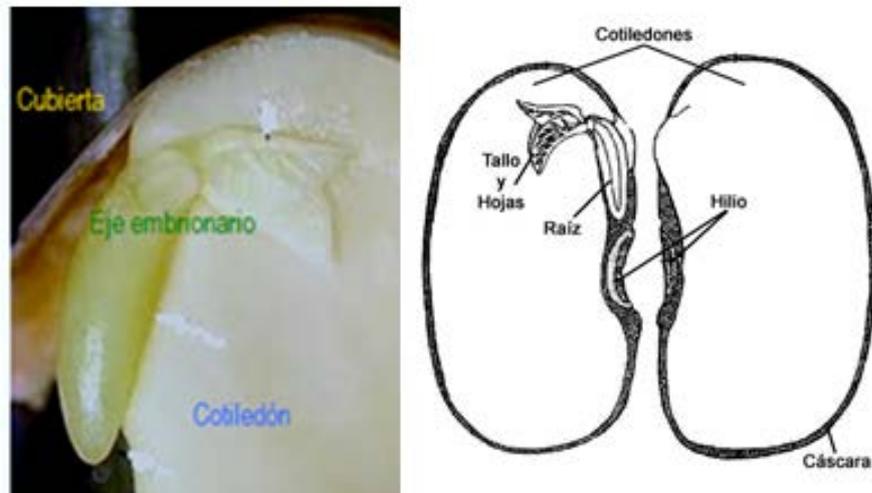


Figura 1. Partes de la semilla en *Phaseolus vulgaris*: Embrión: eje embrionario y cotiledón, protegido por la cubierta de origen materno. Vaughan, 1970; Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijol Voluble. 1ª Ed, 2007.

2.3 Características generales en el crecimiento y desarrollo de las semillas en leguminosas

El crecimiento de las semillas en leguminosas es heterogéneo tanto genética como fisiológicamente, en un principio está determinado por los procesos que suceden en la cubierta (que es de origen materno), y posteriormente por los que tienen lugar en el cotiledón y el eje embrionario (órganos filiales) (Wang y Hedley, 1993). De forma general, en leguminosas se han identificado tres fases de crecimiento que están separadas por 2 fases de reposo. La primera fase esta confinada al endospermo y la

cubierta, mientras que la segunda corresponde al crecimiento y diferenciación del embrión. Estas primeras fases se caracterizan por una elevada tasa de división celular. La tercera y última fase de crecimiento comprende la maduración de la semilla y se distingue por la expansión celular (Wang y Hedley, 1993). Posteriormente ocurre la desecación.

Desde el punto de vista metabólico, en el desarrollo de las semillas en leguminosas se identifica una fase de pre-almacenamiento controlada por los tejidos de origen materno (cubierta y endospermo) y caracterizada por una alta actividad mitótica (Figuras 2 y 3) y niveles elevados de hexosas (Figura 3). Posteriormente se presenta una fase de transición donde ocurre un cambio metabólico promovido por varios factores como son el aumento en la toma de sacarosa que incrementa la relación sacarosa:hexosas, el establecimiento de la actividad fotosintética que aumenta la disponibilidad de energía y la inducción en la expresión de genes asociados al almacenamiento. La fase de transición entonces contribuye a incrementar el flujo metabólico hacia la síntesis de productos de reserva. Esta fase también se caracteriza por la participación de cinasas como las CPDK y por el papel del ABA como promotor de los cambios (Weber *et al.*, 2005). Por su parte, la fase de almacenamiento está bajo control filial y se distingue por la expansión celular promovida por la acumulación de sustancias de reserva y por la alta relación sacarosa:hexosas. La acumulación de sacarosa es un prerrequisito para adquirir la tolerancia a la desecación (Koch, 1996).

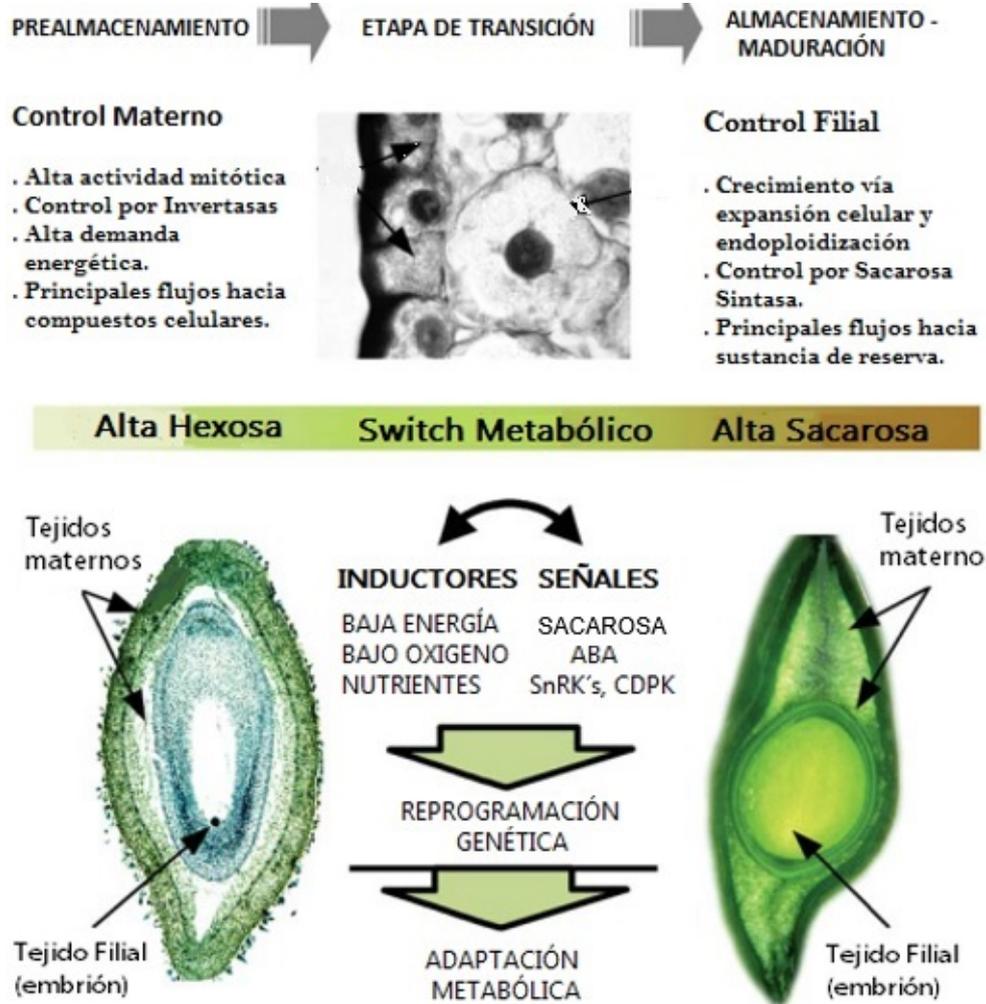


Figura 2. Secuencia de eventos durante la diferenciación de los órganos de almacenamiento de la semilla (Weber *et al.* 2005).

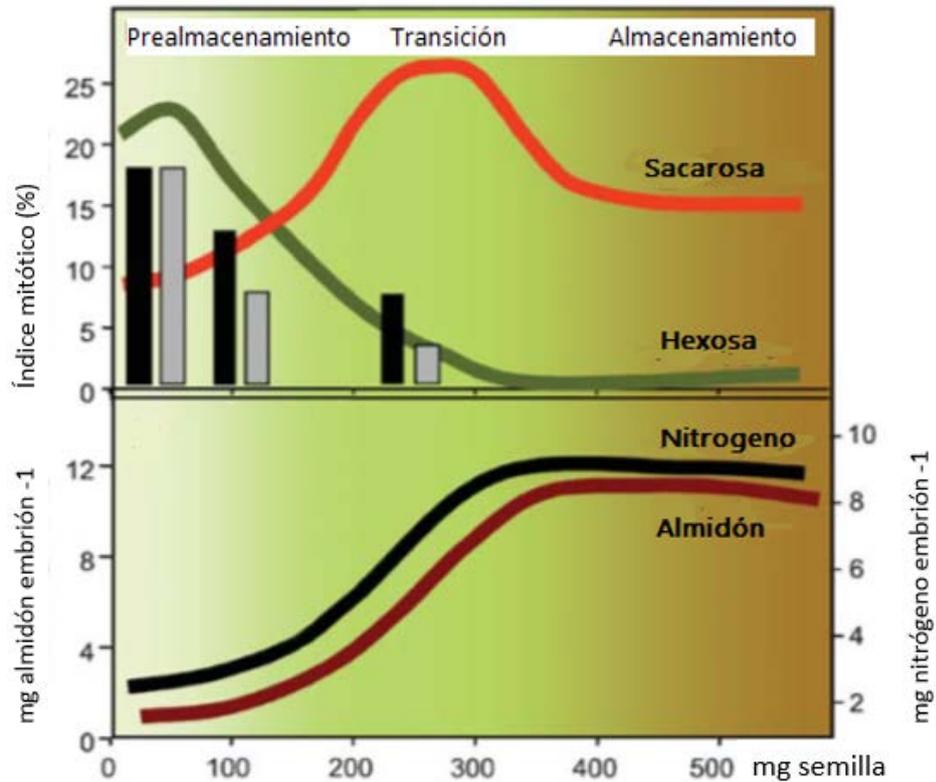


Figura 3. Características fisiológicas y bioquímicas del desarrollo en semilla de leguminosas (*Vicia faba*). Cambios observados en la actividad mitótica (barra oscura: región adaxial de la semilla; barra clara: región abaxial de la semilla) y en la acumulación de hexosas, sacarosa, nitrógeno y almidón. (Weber *et al.* 2005).

La madurez fisiológica se adquiere cuando la semilla deja de crecer, en ese momento su contenido de humedad es de 52 a 54% y su color es verde y uniforme. Al finalizar esta etapa la semilla reduce su contenido de humedad (14%) y su color es el característico del genotipo. En el proceso de desecación es importante la acumulación de azúcares no reductores, los cuales además de proteger y ayudar a mantener la integridad funcional de membranas y complejos proteicos (Koch, 1996 y 2004; Smeekens, 2000), también pueden servir como fuente de energía durante el inicio de la germinación (Koch, 2004).

2.3.1 Control materno

El crecimiento temprano de la semilla es sujeto a control materno, el cual establece restricciones físicas que determinan el potencial de crecimiento en etapas posteriores (Wang y Hedley, 1993; Weber *et al.*, 1996). Por ejemplo, en semillas de chícharo (*Pisum sativum*) el tamaño final de la semilla está correlacionado positivamente con el volumen máximo del endospermo (de origen materno). Por otro lado, el número de células del cotiledón (que también está relacionado con el tamaño final de la semilla) está igualmente sujeto a control materno. Dado que el número de células depende del ciclo de división celular, su control es crucial, especialmente en las primeras etapas del desarrollo de la semilla (Weber *et al.*, 1996).

2.3.1.1 Función de la cubierta

En las etapas iniciales del desarrollo de la semilla, la cubierta funciona como órgano de almacenamiento temporal y acumula almidón y proteínas antes que el proceso de almacenamiento en el embrión se lleve a cabo. Las reservas que acumula la cubierta son muy importantes debido a que funcionan como amortiguador para garantizar el suministro de nutrientes al embrión en desarrollo (Heim *et al.*, 1993; Rochat y Boutin, 1992).

Estudios realizados en *Vicia faba* y chícharo han mostrado que el papel de la cubierta es muy importante, pues mutaciones que alteran su funcionamiento también impiden el crecimiento del embrión. (Weber *et al.*, 2005). Así mismo se ha observado, que cuando en las semillas de *V. faba* se retrasa la diferenciación de la cubierta, se prolonga la actividad mitótica del embrión (fase de prealmacenamiento) y por lo tanto se retrasa su maduración (Weber *et al.*, 1996).

El ácido abscísico (ABA) es muy importante para la maduración de las semillas y en *Arabidopsis* se ha observado que primero se produce en los tejidos maternos y más tarde en el embrión. Así, el ABA sintetizado en la cubierta de semillas de *Arabidopsis* y de *Nicotiana* que se trasloca al embrión, promueve la expansión celular, la acumulación de reservas y evita el aborto de las semillas (Frey *et al.*, 2004). Sin embargo, hacen falta más estudios para determinar el efecto directo de ABA sobre la iniciación de la diferenciación del embrión.

2.3.2 Transición de un control materno a un control filial

El proceso en el que el embrión se transforma en un tejido de almacenamiento altamente diferenciado se caracteriza por múltiples cambios (Weber *et al.*, 2005):

- 1) La toma de nutrientes se basa en la actividad de las células de transferencia que se diferencian a partir de la región exterior de la cubierta (el protodermo).
- 2) Un fuerte aumento en la toma de sacarosa que a su vez incrementa la relación sacarosa:hexosas en el embrión.
- 3) Paso de un estado caracterizado por la alta actividad mitótica a otro dominado por la expansión celular.
- 4) Ganancia de actividad fotosintética que contribuye al mejoramiento del estado energético y la expresión de genes asociados con el almacenamiento de sustancias de reserva que, en conjunto, favorecen el flujo de metabolitos hacia la síntesis de estos compuestos.

Las invertasas juegan un papel crucial en el control de la diferenciación y en la movilización de sustancias de reserva de la cubierta hacia el embrión. Se ha reportado que las invertasas solubles pueden actuar como sensores de estrés y contribuir a ajustar tanto el tamaño como el número de semillas de acuerdo a los recursos disponibles (Sturm y Tang, 1999; Weber *et al.*, 1995).

2.3.3 Regulación de la maduración vía fosforilación de proteínas

La regulación de los procesos de almacenamiento en la semilla de leguminosas es compleja e involucra la fosforilación de muchas proteínas, algunas de las cuales son importantes para ajustar los flujos metabólicos en función de la energía disponible (Weber *et al.*, 2005). Dentro de este grupo se ha observado que en *Vicia*, la SPS (sacarosa fosfato sintasa) de cotiledones se inactiva por fosforilación en la fase de transición antes de que inicie el almacenamiento de sustancias de reserva (Weber *et al.*, 1996). Otro ejemplo es la PEPC (fosfoenol piruvato carboxilasa), una enzima asociada al almacenamiento y cuya actividad es dependiente de su estado de fosforilación es activada (Athwal *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002). Por su parte la sacarosa sintasa que también puede fosforilarse y activarse en respuesta a un bajo nivel de oxígeno o de energía (Subbaiah y Sachs, 2001).

2.4 SnRK's (*Sucrose Nonfermenting 1-related Protein Kinases*) como reguladores clave en el metabolismo de las plantas

Las cinasas SnRK1/ SNF1/ AMPK constituyen una familia de proteínas que son componentes importantes en el mecanismo de detección y respuesta a la falta de azúcares en plantas, levaduras y animales respectivamente (Hardie *et al.*, 1999). La familia SnRK se divide en tres sub-familias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. La sub-familia SnRK1 comprende un grupo de serina-treonina cinasas (EC. corresponde a 2.7.11.1) estrechamente relacionada con las cinasas SNF1 de levadura y AMPK de mamífero. Las sub-familias SnRK2 y 3 son probablemente únicas en plantas y existe evidencia clara de que algunos miembros de estas familias están involucrados en las vías de señalización que regulan las respuestas a varios tipos de estrés; por ejemplo, las cinasas de la familia SnRK2 se activan en estrés osmótico, mientras que algunos

miembros de la familia SnRK3 participan en la tolerancia a estrés salino (Coello *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2000; Jossier *et al.*, 2009).

2.5 Composición del complejo SNF1/AMPK/SnRK1

La estructura de los complejos SNF1/AMPK se caracteriza porque una subunidad catalítica (α) está asociada con dos subunidades regulatorias (subunidades β y γ) y esta organización se ha conservado durante la evolución (Davies *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Jiang y Carlson, 1997; Bouly *et al.*, 1999).

La levadura (*S. cerevisiae*) es el organismo donde más se ha estudiado este complejo, y allí se ha observado que la subunidad β ancla a las subunidades α y γ para formar un complejo heterotrimérico estable. La subunidad β también es importante para la interacción entre el complejo y su blanco (Vincent *et al.*, 2001; Wojtaszewski *et al.*, 2002; Hedbacker *et al.*, 2004). Posteriormente, se confirmó que el complejo heterotrimérico purificado de células animales presenta una organización similar (Davies *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1996).

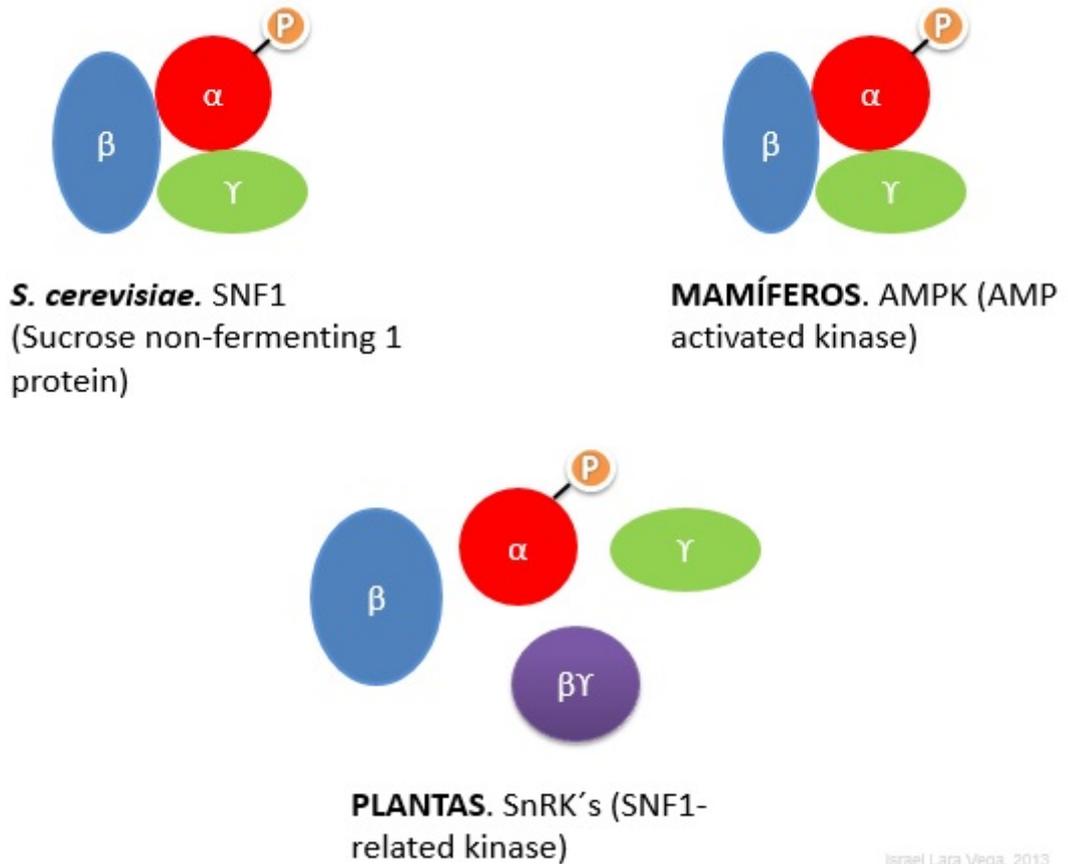


Figura 4. Composición del complejo heterotrimérico activo SNF1/AMPK. La composición de SnRK1 no está totalmente establecida, pero se muestran las subunidades descritas que podrían participar en su formación. (Con información de: Davies *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Jiang y Carlson, 1997; Bouly *et al.*, 1999; Gissot *et al.*, 2004).

En el caso particular de SnRK1, como se observa en la Figura 5, existen además diferentes isoformas de las subunidades que forman los complejos: hay 2 isoformas de la subunidad catalítica α SnRK1a (AKIN10) y SnRK1b (AKIN11) (Halford *et al.*, 2003), 3 subunidades β : β_1 , β_2 , β_3 (Gissot *et al.*, 2004) y 2 subunidades γ : γ_1 y γ_2 .

AMPK α subunit	SNF1	SnRK1 α 1/Kin10 SnRK1 α 2/Kin11
AMPK β subunit	GAL83/SIP1/SIP2	SnRK1 β 1 SnRK1 β 2 SnRK1 β 3
AMPK γ subunit	SNF4	SnRK1 β γ SnRK1 γ 1 SnRK1 γ 2
LKB1/CaMKK β	ELM1/PAK1/TOS3	SnAK1 SnAK2

Figura 5. Subunidades que componen al complejo AMPK/SNF1/SnRK1 (izquierda a derecha) y sus cinasas activadoras (Robaglia *et al.*, 2012).

Las plantas además de las subunidades ya mencionadas, tienen una subunidad $\beta\gamma$, inicialmente descubierta en maíz (Lumbreras *et al.*, 2001) y que comparte dominios con las subunidades β y γ . Se ha propuesto que en plantas, además de complejos similares a los descritos en levaduras y mamíferos, también pueden existir otro tipo de complejos funcionales (Halford y Hey, 2009; Coello *et al.*, 2011b).

2.5.1 Subunidad catalítica α

Esta subunidad se encarga de fosforilar a los diferentes blancos, contiene un dominio cinasa de serina-treonina en el extremo amino terminal y otro regulatorio en su extremo carboxi-terminal con el que interactúan las subunidades regulatorias β y γ . El tamaño de la subunidad catalítica varía dependiendo del organismo: se ha reportado que la de AMPK pesa 63 kDa, la de SNF1, 72 kDa y la de SnRK1 en *Arabidopsis* 58 kDa. La comparación de las mismas arroja un 48% de similitud en sus secuencias completas, pero si el análisis se restringe al dominio catalítico, la similitud aumenta hasta 60-65% (Polge y Thomas, 2007). En el caso particular de *Arabidopsis*, donde existen 2 isoformas (AKIN10 y AKIN11), la primera aumenta su expresión en respuesta a la

deficiencia de fósforo (Fragoso *et al.*, 2009), por lo que se propone que pueden tener diferentes funciones.

2.5.2 Subunidad regulatoria β

Las subunidades β en levaduras, mamíferos y plantas muestran una estructura común, compuesta por un dominio amino terminal variable asociado a dos dominios conservados uno de los cuales se denomina KIS (*kinase interacting sequence*) (Jiang y Carlson, 1997) que participa en la unión con la subunidad α . El otro dominio conservado se llama ASC (*association with SNF1 complex*) (Yang *et al.*, 1992; Jiang y Carlson, 1997) y es importante para la unión con la subunidad γ (Yang, 1992). Posteriormente, se identificó un dominio capaz de unir glucógeno y de interactuar con el dominio KIS al que se denominó GBD (*glycogen binding domain*) y cuya estructura también tiene características de N-isoamilasa (Hudson *et al.*, 2003).

La subunidad β de mamíferos tiene un peso molecular que oscila entre los 38 kDa y 40 kDa, y para ser funcional es necesario que se expresen los tres dominios. En cambio en levaduras, el dominio ASC es suficiente para la formación del complejo α - β - γ activo. Las subunidades β presentes en plantas pueden ser agrupadas en dos clases: una en la que se incluyen a las subunidades que tienen características semejantes a las de levaduras y otra en donde el parecido es con la subunidad β de mamíferos. En el primer grupo se incluyen las denominadas AKIN β 1 y AKIN β 2 de *Arabidopsis* (Bouly *et al.*, 1999), las cuales se distinguen porque el dominio ASC interactúa fuertemente con la subunidad γ . En el segundo grupo está β 3, que es la otra clase que tiene una composición estructural atípica en donde el dominio ASC puede interactuar con las subunidades catalíticas α (Bouly *et al.*, 1999; Gissot *et al.*, 2004).

2.5.3 Subunidad regulatoria γ

La subunidad regulatoria γ se une al dominio autoinhibitorio de la subunidad α por lo que su presencia es muy importante para mantener la conformación activa de la subunidad catalítica. El grado de conservación de la secuencia entre las subunidades γ presentes en levaduras, mamíferos y plantas varía entre 20 y 35%; en su secuencia también se distinguen algunos motivos similares a la cistatión β -sintasa, que en mamífero sirven para unir a moléculas de AMP o ATP (Scott, 2004). La subunidad γ de mamíferos tiene un peso molecular que oscila entre 36 y 38 kDa, mientras que el de la de *Arabidopsis* es de 47KDa (Mitchelhill *et al.*, 1994; Bouly *et al.*, 1999; Buitink *et al.*, 2003).

2.5.4 Subunidad $\beta\gamma$

Esta subunidad fue descubierta en maíz (Lumbreras, 2001). En *Arabidopsis* presenta tiene un peso de 54 Kda y se distingue porque su región amino terminal tiene secuencias similares al dominio KIS característico de la subunidad β , mientras que en la región carboxilo terminal se encuentran los motivos cistatión β -sintasa, típicos de las subunidades γ . Se ha demostrado que ésta subunidad es funcional y que puede participar en la formación de complejos, de hecho, la subunidad $\beta\gamma$ de *Arabidopsis* complementa al mutante $\Delta snf4(\gamma)$ de levadura (Buintik *et al*, 2003). Gissot *et al.* (2004), observaron que en plantas el dominio ASC de la subunidad α puede interaccionar con las subunidades γ y $\beta\gamma$, lo que abre la posibilidad de encontrar complejos en cuya formación intervenga una u otra subunidad. El descubrimiento de que la interacción con AKIN11 (subunidad catalítica de *Arabidopsis*) es dependiente de glucosa (Buintik *et al*, 2003) confirma esta posibilidad. El hecho que no existan subunidades del tipo $\beta\gamma$ en *D.*

melanogaster, *S. cerevisiae* o *H. sapiens* (Buintik *et al*, 2003) sugiere que tiene un papel importante en la regulación de procesos igualmente característicos de plantas.

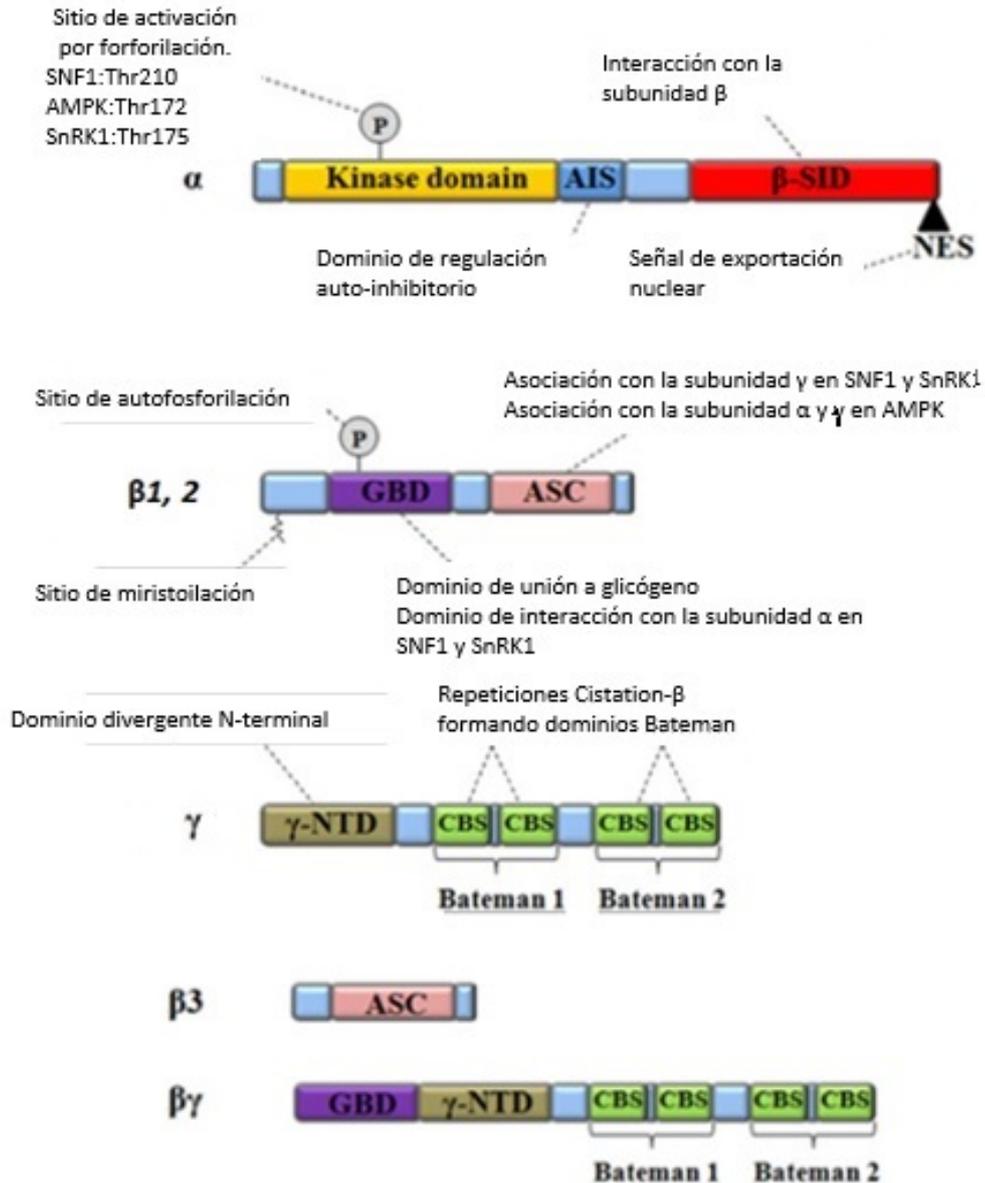


Figura 6. Características estructurales de las subunidades de SnRK1. Los dominios que interaccionan con subunidades y metabolitos también se indican. Biuntik *et al.*, 2003.

2.6 Blancos de SnRK1

Experimentalmente se ha demostrado que SnRK1 tiene como blancos fisiológicos a las siguientes enzimas: 3 hidroximetil-3 metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR), enzima clave en la biosíntesis de productos del mavelonato; sacarosa fosfato sintasa (SPS) que cataliza la biosíntesis de sacarosa; nitrato reductasa (NR), responsable del primer paso de la asimilación del nitrógeno para la síntesis de aminoácidos (Sugden *et al.*, 1999a); la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (F2KP), enzima bifuncional que sintetiza y degrada fru-2,6-P₂ que a su vez regula la síntesis de sacarosa y de almidón (Kulma *et al.*, 2004). Otro blanco es la trehalosa fosfato sintasa (TPS5) que es una enzima clave en la síntesis de la trehalosa 6 fosfato, la cual a su vez participa en la señalización de azúcares y en la tolerancia a la desecación, así como a la gliceraldehído 3-P no fosforilante, enzima glucolítica exclusiva de organismos fotosintéticos y algunas bacterias que proporciona principalmente poder reductor mediante la generación de NADH⁺ (Baena-González *et al.*, 2007; Piattoni *et al.*, 2011). Todas ellas son inactivadas después de ser fosforiladas por SnRK1. Otra enzima clave en el metabolismo del carbono, la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), que está involucrada en la síntesis del almidón, es regulada positivamente por SnRK1 a través de la modulación de su estado redox y de su expresión genética.

Otras enzimas como la sacarosa sintasa (degradación de la sacarosa) o la α -amilasa (degradación del almidón) son reguladas positivamente por SnRK1 a nivel de su expresión genética al interactuar con factores de transcripción (Purcell *et al.*, 1998; Laurie *et al.*, 2003; Baena-González *et al.*, 2007).

En la figura 7 se presenta un esquema general de la vía de señalización de SnRK1, los blancos descritos hasta ahora y los factores a los que responde la actividad de esta

cinasa. Brevemente, SnRK1 es activada por oscuridad y por varios tipos de estrés como el hídrico, salino o nutricional, así como a la presencia de biomoléculas como la sacarosa, la 2-desoxiglucosa y el AMP. Por otro lado, para que SnRK1 sea activa requiere ser fosforilada río arriba por otra cinasa (SnAK1/2). En cuanto a los factores que inhiben a este complejo enzimático se encuentran la glucosa-6-fosfato (G6P) y la trehalosa-6-fosfato (T6P).

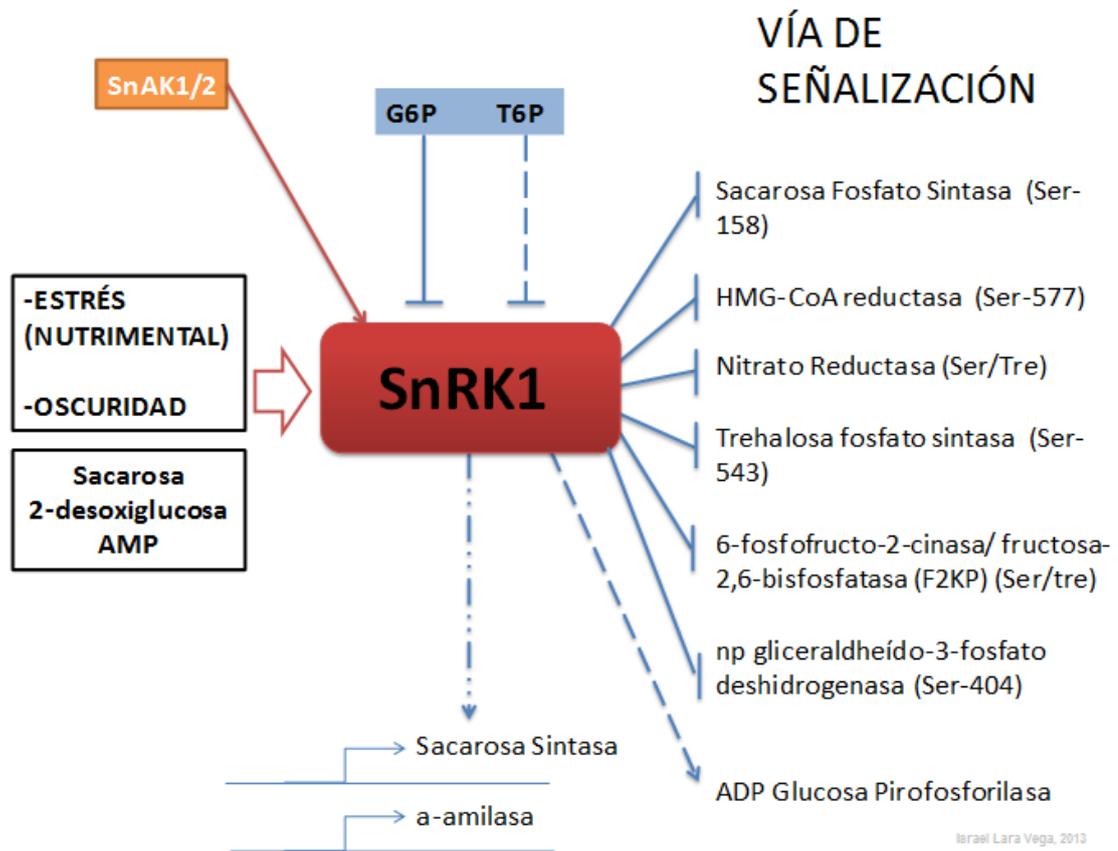


Figura 7. Vía de señalización de SnRK1. (Con información de: Sugden *et al.*, 1999a; Kulma *et al.*, 2004; Piattoni *et al.*, 2011; Purcell *et al.*, 1998; Laurie *et al.*, 2003; Baena-González *et al.*, 2007; Baena-González y Sheen, *et al.*, 2008; Sugden *et al.*, 1999c y 1999c; Bhalerao *et al.*, 1999; Harthill *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010; Crozet *et al.*, 2010).

El alto grado de conservación entre SNF1, AMPK y SnRK1 se hace particularmente evidente en el dominio catalítico de la subunidad α donde el 62% de los aminoácidos son

idénticos. La especificidad de su sustrato también es similar ya que las tres enzimas son capaces de fosforilar la secuencia de péptidos sintéticos (Figura 8) *AMARA* (AMARAAS*AAALARRR) y *SAMS* (HMRS*AMSGHLVKRR) que comúnmente son utilizados para medir su actividad *in vitro* (Halford y Hardie, 1998; Sugden, *et al.*, 1999a) y cuyas secuencias están basadas en las de regiones consenso presentes en algunas de las enzima blanco: el péptido *SAMS* está basado en la secuencia blanco de la acetyl-CoA carboxilasa en mamíferos, mientras que el péptido *AMARA*, en la secuencia del sitio fosforilado en la HMG-CoA reductasa de plantas (Dale *et al.*, 1995).

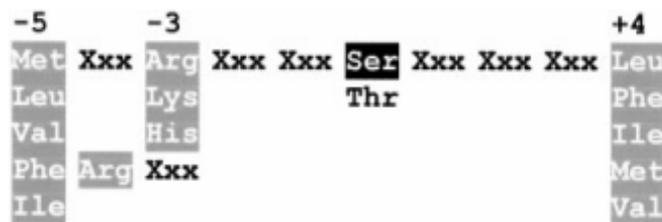


Figura 8. Secuencia consenso de fosforilación reconocida por la SnRK1. Los residuos requeridos para el reconocimiento están destacados como sigue: (1) serina que se fosforila (en negro); (2) residuos hidrofóbicos en P-5 y P+4 (en gris); residuos básicos en P-3 o P-4 (en gris). Dale *et al.*, 1995.

2.7 Factores que regulan la actividad de SnRK1

Para las plantas, el estrés está parcialmente codificado como una deficiencia de energía y dado que esta circunstancia es común a diferentes tipos de estrés, no sorprende que las plantas respondan de manera similar a diferentes estímulos (Figura 7). De hecho, se propone la existencia de una relación muy estrecha entre la capacidad para mantener la disponibilidad de energía y la tolerancia a varios tipos de estrés (Kenyon, 2005; Baena-González *et al.*, 2007).

En las plantas la vía metabólica de SnRK1 es muy importante para detectar el estado energético y posteriormente implementar respuestas de adaptación. Además de la fosforilación de diversas enzimas, AKIN10 y AKIN11, isoformas de la subunidad catalítica de SnRK1, también han sido identificadas como reguladores centrales del transcriptoma de *Arabidopsis* en respuesta a oscuridad, deficiencia de nutrientes y desecación o estrés hídrico (Baena-González y Sheen, 2008).

En la AMPK está plenamente demostrado que el AMP al unirse a la subunidad γ , se convierte en su activador más importante, mientras que SnRK1 no responde a este estímulo (Sugden *et al.*, 1999b). Sin embargo, se ha mostrado que SnRK1 es activada por la sacarosa (Bhalerao *et al.*, 1999) y que las concentraciones elevadas de la misma son inhibitorias (Baena-González *et al.*, 2007). La 2-desoxiglucosa es un análogo no metabolizable de la glucosa que también estimula la actividad de SnRK1, aunque no se conocen los detalles de su interacción (Harthill *et al.*, 2006). La glucosa-6-fosfato también puede inhibir la formación del complejo SnRK1 (Toroser *et al.*, 2000). La inhibición de la actividad de SnRK1 por la trehalosa 6-fosfato (T6P) es particularmente interesante, pues es muy efectiva a concentraciones considerablemente más bajas (1-20 μ M) que las comúnmente usadas para estudiar el efecto de otros azúcares (Zhang *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010), lo que hace suponer que tiene un efecto fisiológico importante. En ese contexto, se ha observado que T6P regula la síntesis del almidón vía la activación redox de la AGPasa que se localiza río abajo de la SnRK1 (Schluepmann *et al.*, 2012).

2.7.1 Regulación de SnRK1 por fosforilación

Otras cinasas río arriba activan a SNF1/AMPK por fosforilación en un residuo de treonina localizado en el *loop* de activación. Estas cinasas han sido identificadas en

levadura (SAK1, ELM1 y TOS3) y en mamífero (LKB1 y CaMKK) (Jossier *et al.*, 2009). En plantas también existen cinasas activadoras (SnAK1 y SnAK2) cuyo mecanismo de acción sobre SnRK1 ha sido recientemente descrito en *Arabidopsis* (Crozet *et al.*, 2010). SnAK1 es una cinasa que se activa por autofosforilación en la treonina 154, lo que le permite fosforilar a SnRK1 en la treonina 175. Una vez que SnRK1 es activada, lleva a cabo una fosforilación de retroalimentación negativa sobre SnAK1 en la serina 260 (261 en SnAK2) la cual queda inactiva. Cuando SnAK1 está inactiva, posiblemente entren en juego fosfatasas que devuelven al sistema a su estado de fosforilación inicial (Figura 9). Se ha sugerido que SnAK1 y SnAK2 pueden formar un complejo para llevar a cabo la activación de SnRK1.

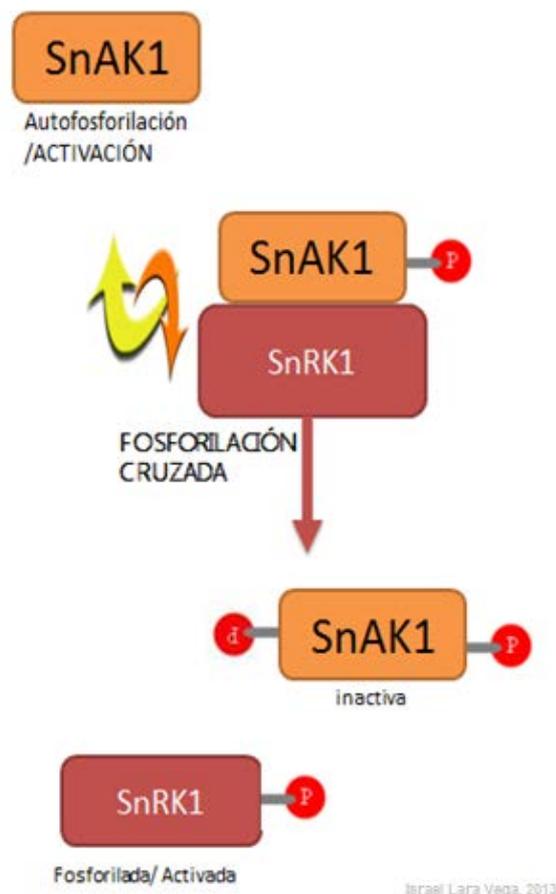


Figura 9. Representación del cruce de fosforilación entre SnAK1/2 y SnRK1. (Con información de Crozet *et al.*, 2010).

2.8 SnRK1 en el desarrollo de las semillas.

La actividad de SnRK1 ha sido involucrada en la regulación del metabolismo del carbono, tanto de manera directa mediante la fosforilación de enzimas ubicadas en puntos clave de diversos procesos metabólicos, como de forma indirecta contribuyendo a modificar la expresión genética o a alterar el estado redox de las células (Halford y Hey, 2009).

La subunidad α de SnRK1 en embriones de chícharo es expresada constitutivamente mientras que el mRNA de las subunidades β y γ se incrementan conforme avanza la maduración (Radchuk *et al.*, 2006). Algo similar sucede con las subunidades α y β durante el desarrollo de semillas de tomate (Bradford *et al.*, 2003). Únicamente el mRNA de la subunidad reguladora γ es sensible a GA (ácido giberélico), ABA y a varios tipos de estrés (Bradford *et al.*, 2003). Sin embargo, durante la germinación de semillas de *Medicago truncatula*, la expresión de las subunidades β y γ es regulada por factores de transcripción que responden a deficiencia de nutrientes (Buitink *et al.*, 2003).

En plantas de tabaco, chícharo y cebada la eliminación de la actividad de SnRK1 afecta el desarrollo de los granos de polen, probablemente como resultado de la incapacidad para metabolizar sacarosa y acumular almidón (Zhang *et al.*, 2001). Por otro lado, las plantas transgénicas de chícharo en las que se ha silenciado la expresión de SnRK1 en semilla, producen semillas verdes, sin fase de maduración y ocasionalmente vivíparas (Radchuk *et al.*, 2006). El análisis de expresión reveló que cuando la actividad de SnRK1 es disminuida, genes cuya expresión debería disminuir en la fase de transición, permanece elevada. Algunos de esos genes están asociados con la regulación del ciclo celular, por lo que es probable que al perturbar de alguna manera su regulación, la

deficiencia de SnRK1 contribuya a prolongar la fase de pre-almacenamiento de las semillas (Kramer *et al.*, 2004).

JUSTIFICACIÓN

El complejo cinasa SnRK1, el ortólogo en plantas de SNF1 y AMPK en levadura y mamífero respectivamente, es un regulador global del metabolismo del carbono. En plantas esta familia de cinasas ha divergido en 38 miembros y puede ser subdividida en tres sub-familias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. La evidencia disponible sugiere que, al igual que en otros organismos, su participación permite a las plantas modificar el metabolismo del carbono para ahorrar energía y enfrentar a varios tipos de estrés. SnRK1 tiene un papel definido en vías de señalización dependientes de ABA e involucradas en adquirir tolerancia a la desecación, estrés nutricional y enfermedades, entre otras. Su papel clave en la interfase entre el metabolismo del carbono y la señalización originada por todos esos estímulos la convierten en un candidato cuya manipulación puede contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos (entre ellos el frijol) establecidos en ambientes desfavorables.

HIPOTESIS

“La actividad del complejo SnRK1 en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y la expresión de las subunidades que forman parte de él, se verán modificadas como consecuencia de los cambios metabólicos inducidos tanto por el desarrollo de la semilla como por la deficiencia de fósforo.”

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar el efecto del desarrollo y de la disponibilidad del fósforo sobre la actividad de SnRK1 y sobre la abundancia relativa de las subunidades que componen este complejo para observar si este tipo de estrés es capaz de modificar la actividad y composición del complejo durante el desarrollo de la semilla de frijol.

3.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la actividad del complejo SnRK1 en cubierta, cotiledón y eje embrionario de semillas de frijol provenientes de plantas cultivadas en condiciones control y de deficiencia de fósforo.
- 2) Evaluar la actividad del complejo SnRK1 en cubierta, cotiledón y eje embrionario de semillas de frijol a lo largo del desarrollo.
- 3) Evaluar la expresión de las subunidades que componen el complejo SnRK1, a través de ensayos de western-blot, en semillas de frijol a lo largo del desarrollo y en condiciones de deficiencia de fósforo.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Cultivo de las plantas de frijol

Germinación. Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad Canario 60 se desinfectaron con una serie de lavados: 1 min en etanol, 3 lavados de 5 min c/u con agua desionizada, 1 lavado de 30 seg en hipoclorito de sodio 1% (v/v) y 5 lavados de 5 min c/u con agua destilada. Posteriormente se colocaron sobre papel filtro húmedo dentro de un recipiente plástico y se incubaron a 25°C hasta su germinación.

Siembra. Las semillas germinadas se transfirieron a macetas de plástico con 4L de agrolita sin fosfato y se regaron con agua desionizada. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero con temperatura promedio de 25°C e iluminación natural. Posteriormente, se regaron de manera alternada con agua desionizada y solución Hoagland modificada (Tabla 1), para que en las control la concentración de fósforo fuera de 2 mM y 0.2 mM en las deficientes.

Cosecha. Las flores se etiquetaron con la fecha de su antesis y se colectaron vainas a 10, 15, 20, 25, 30 y 40 días después. Las vainas se colocaron en hielo y con ayuda de un bisturí se disectaron para separar la cubierta, el cotiledón y el eje embrionario de las semillas. Los cortes fueron colocados en tubos eppendorf, congelados en nitrógeno líquido y almacenados en ultracongelador a -70°C hasta su posterior utilización.

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada

Macronutrientes

Componente	Elemento	Concentración final
		g/l
KNO ₃	Nitrógeno y Potasio	0.6066
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	Calcio	0.9448
NH ₄ H ₂ PO ₄	Fósforo	0.345 (2mM) / 0.029 (0.2mM)
MgSO ₄ 7H ₂ O	Azufre y Magnesio	0.493
EDTAFe	Hierro	0.01

Micronutrientes

Componente	Elemento	Concentración final
		mg/l
H ₃ BO ₄	Boro	2.84
MnCl ₂ 4H ₂ O	Manganeso y Cloro	1.78
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Zinc	0.23
CuSO ₄ 5H ₂ O	Cobre	0.749
H ₂ MoO ₄	Molibdeno	0.0179

El pH se ajusta a 5.2.

4.2 Extracción de proteínas en semilla

El tejido (1g) se molió en un mortero con 1mL de amortiguador de extracción frío (0.1 M tricina, 25 mM NaF y 2 mM pirofosfato de sodio (NaPPi) como inhibidores de fosfatasas, 0.5 mM ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA) como quelante e inhibidor de nucleasas, 0.5 mM ácido ethyleneglycoltetraacético (EGTA) como quelante de calcio, 1 mM benzamidina pH 8.2 como inhibidor de tripsina, 5 mM ditioneitol (DTT) como reductor del medio, 25 mM β-mercaptoetanol, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) como inhibidor de proteasas de serina). Luego se recolectó el tejido molido y se añadió por cada 20 mL de amortiguador de extracción se agregaron 200 uL del coctel de

inhibidores de proteasas (PIC) para extractos vegetales (SIGMA-ALDRICH) que contiene: inhibidores de serin proteasas, metaloproteasas, ácido-proteasas, cistein proteasas y aminopeptidasas y 1 mL de coctel de inhibidores de fosfatas (PPI) que a su vez está compuesto de: 500 mM NaF, 250 mM de glicerofosfato, 100 mM pirofosfato de sodio, 20 mM ortovanadato de sodio y justo antes de usarse se agregaron DTT y PMSF. La suspensión se transfirió a tubos para microcentrifuga marca Gelec® y se clarificó por durante 5 minutos a 12000 g a 4°C.

4.2.1 Desalado de extractos

Para medir la actividad de SnRK1 es necesario eliminar los metabolitos que pudieran afectarla, con ese propósito 1 mL del extracto se pasó por una columna NAP-10 de 10 cm previamente equilibrada con amortiguador de extracción. Se recuperaron 1.5 mL y después de agregar 15 uL de PIC y 15 uL de NaPPI, se hicieron alícuotas de 200 ul que se congelaron en N líquido y se almacenan a -80°C.

4.3 Cromatografía de exclusión molecular

El extracto crudo se filtró (0.2 mL) y se fraccionó en una columna Sephacryl S-300 de 90cm con un flujo de 0.5 mL/min previamente equilibrada con el amortiguador de extracción. Se colectaron fracciones de 1 mL en cada una de las cuales se midió la concentración de proteína y la actividad de SnRK1. También se prepararon muestras para su análisis por SDS-PAGE.

4.4 Determinación de proteína por el método de Bradford

Se preparó una curva patrón de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 ug con albúmina sérica bovina a partir de un stock de 0.5 mg /mL. A cada muestra se le añadieron 1.5 mL de reactivo de

Bradford y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína presente en las muestras se calculó por interpolación en la curva patrón.

4.5 Entrecruzamiento de proteínas con DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate])

Con el fin de estabilizar las interacciones de las proteínas que pudieran estar formando parte del complejo SnRK1, los extractos se incubaron durante 1h en hielo con el entrecruzador homobifuncional reversible DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) (Figura 10) a concentraciones variables (0-2.5 mM disuelto en DMSO), la reacción se detuvo agregando a la mezcla de reacción el amortiguador de muestra para SDS-PAGE.

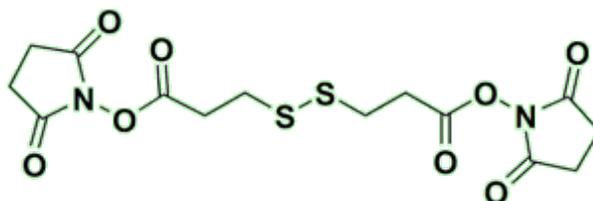


Figura 10. DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate])

4.6 Determinación de la actividad de SnRK1

La actividad cinasa de SnRK1 se midió cuantificando la incorporación de ^{33}P al péptido sintético AMARA (AMARAAS*AAALARRR). El ensayo se llevó a cabo a 37°C . La mezcla de reacción contiene 40 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 200 μM ATP que contiene 12.5 kBq [^{33}P] ATP (GE Healthcare), 5 mM dithiothreitol, 1 mM ácido okadaico, 1 mM pepstatina A, 10 mM E64 (inhibidor de proteasas) y 7 mM quimiostatina. Esta mezcla se dividió en 2 alícuotas, el péptido AMARA (200 μM) se añadió a una de ellas y agua en la otra como control negativo. Un coctel que contiene tricina-DTT-inhibidor de proteasas (10 μL) se mezcló con 10 μL de la mezcla ATP- $\text{MgCl}_2 \pm$ AMARA. Las fracciones del extracto (5 μL) fueron luego agregadas para iniciar la reacción. Un control de agua (5 μL) se incluyó para cada ensayo en duplicado. La reacción se llevó a cabo durante 6

minutos. Se tomaron 15uL de la mezcla de reacción y se colocaron en 1cm² de papel de fosfocelulosa Whatman, el cual se depositó inmediatamente en un recipiente con ácido fosfórico al 1% (v/v) para detener la reacción.

Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 minutos en ácido fosfórico al 1% (v/v). Los papeles de fosfocelulosa fueron colocados en acetona durante 5 minutos y luego se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente. Por último, los papeles fueron colocados en un vial y se adicionan 5mL de líquido de centelleo Ultima Gold LS (Packard, Meridian, CT). Se cubrió el vial y se mezcló para posteriormente colocarlo en un contador de líquido de centelleo Beckman durante 5 minutos. Por último se realizaron los cálculos para obtener la concentración de ³³P incorporado en nmol/min/mg proteína.

4.7 SDS-PAGE

Se estandarizaron las muestras a 1ug / uL y se agregó el amortiguador de muestra 4X, el cual contiene: 0.12 M de Tris, 4% de SDS, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerol y 2 mg/mL de azul de bromofenol. Se calentaron los tubos a 80°C durante 15 minutos, después se enfriaron en hielo hasta 4°C e inmediatamente se guardaron a -70°C para posteriormente llevar a cabo la electroforesis.

Para SDS-PAGE en condiciones no reductoras las muestras se prepararon en amortiguador sin 2-mercaptoetanol.

Se prepararon geles al 7 y 12% de acrilamida en los geles apilador y separador, respectivamente. Se cargaron 10 ug de proteína de muestra por carril. Se colocaron en la cubeta con amortiguador de TRIS/Glicina (25 mM de Tris, 0.19 M de glicina, 0.1% (p/v) SDS) y se corrieron a 80 volts hasta que las muestras pasaron el gel apilador y posteriormente a 120 volts durante aproximadamente 1.5 horas. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de coomasie o se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore) según el caso.

4.8 Identificación de subunidades del complejo SnRK1 por Western Blot

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana Immobilon-P (Millipore). Para ello, el gel y la membrana (previamente hidratada con metanol) se equilibraron en amortiguador de transferencia (Tris 12.4 mM, glicina 96 mM, 20% de metanol y 125 μ L/L de SDS al 20%) y se colocaron en un cassette plástico en medio de papeles filtro humedecidos con amortiguador de transferencia para hacer presión y mantener un contacto homogéneo entre el gel y la membrana. La transferencia se llevó a cabo en una cámara de transferencia (BioRad) a 400 mA durante 1 hora con agitación continua.

Transcurrida la transferencia, se retira la membrana y se bloquea con agitación suave durante dos horas en una solución de leche descremada al 5% en TBS y 0.1% Tween-20 (20X TBS: 160 gNaCl, 4g KCl, 60 g Tris base en 1L de agua desionizada) a 25°C. Se colocó el anticuerpo específico según la dilución para cada caso (Tabla 2) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiró la membrana de la solución de bloqueo y se hicieron 3 lavados con TBST durante 15 min c/u. Se incubó nuevamente la membrana en leche descremada al 5% con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa durante 2 horas a 25°C. Posteriormente se retiró la membrana de la solución de bloqueo y se realizaron 3 lavados con TBST durante 15 min c/u. Finalmente, el revelado de la membrana se realizó en cuarto oscuro; se colocó sobre una superficie plana con la cara donde están las proteínas hacia arriba, se cubrió uniformemente con 1mL de solución de revelado (Whatman) y se incubó durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se escurrió la membrana y se colocó entre 2 capas de plástico anti-adherente dentro de un cassette de revelado. Sobre la membrana protegida se colocó la película fotosensible kodak y se cerró el cassette. El tiempo de exposición varió según el anticuerpo utilizado para cada tejido estudiado (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpos para subunidades de SnRK1	Dilución/ Tiempo de exposición	Los anticuerpos corresponden a los utilizados para SnRK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
α (AKIN10)	1:5000 / 1min	
$\beta 1$ y $\beta 2$	1: 2000/ 3min	
$\beta \gamma$	1: 10 000/ 2min	
γ	1:5000/ 3min – 20min	

V. RESULTADOS

5.1 Efectos de la deficiencia de fósforo en plantas de frijol.

La evaluación cualitativa de las plantas cultivadas en deficiencia de fósforo mostró que estas se caracterizan por un crecimiento lento y reducido, hojas pequeñas, menor número de brotes y ramas, retraso en la floración así como una disminución muy importante en el número de vainas y semillas. En la Figura 11 se observa que plantas en la etapa final de su ciclo de vida muestran diferencias en cuanto a altura, tamaño y número de hojas así como una reducción del número y tamaño de vainas. Las semillas obtenidas de plantas deficientes de fósforo se obtuvieron en menor cantidad aunque en cuanto a tamaño fueron similares a las obtenidas de plantas control.

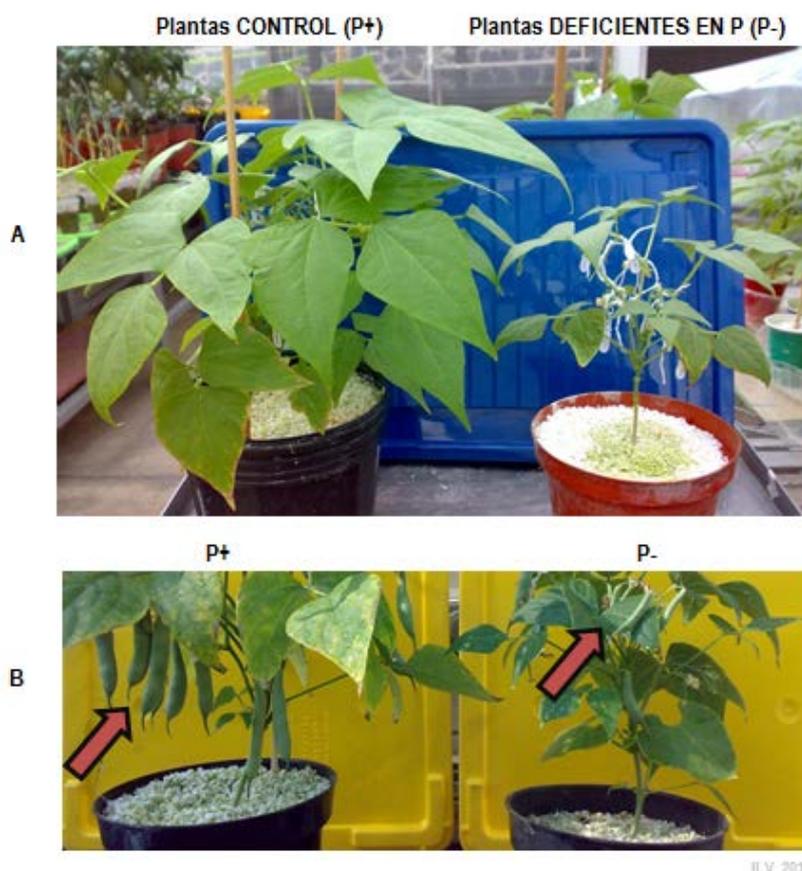


Figura 11. Efectos visibles de la deficiencia de fósforo. A: diferencia en altura de la planta y tamaño y número de las hojas. B: diferencia en cantidad y tamaño de vainas.

5.2 Subunidades del complejo cinasa SnRK1 en semilla de frijol.

Mediante western blot se analizó si el desarrollo de la semilla y/o la deficiencia de fósforo afectan la abundancia de las subunidades del complejo cinasa SnRK1 (Figura 12). En la parte superior de la imagen (Figura 12A) se muestran los geles teñidos con azul de Coomassie y como puede observarse, la acumulación de proteínas de reserva en ambas condiciones inicia alrededor del día 20 después de la antesis (DDA). Como marcador del desarrollo se usó la expresión de la subunidad grande de la RUBISCO. La Figura 12B muestra que en ambas condiciones esta proteína solo aparece en etapas tempranas del desarrollo de la semilla. La Figura 12B también muestra los efectos del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la abundancia relativa de las proteínas que forman el complejo SnRK1. Como puede apreciarse, los cambios más evidentes están relacionados con el desarrollo y no con la deficiencia de fósforo: la subunidad catalítica α de SnRK1 está presente a lo largo de todo el proceso con clara tendencia a disminuir conforme avanza el desarrollo de la semilla. Por su parte, las subunidades γ y $\beta\gamma$ aumentan su abundancia a partir de los 20 DDA. En el caso de la subunidad $\beta\gamma$ el anticuerpo reconoce 2 bandas con pesos muy cercanos, mientras que para la subunidad γ antes del día 20 se observan varias bandas de pesos cercanos pero con una expresión menor. Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ de SnRK1 solo están presentes a los 10 DDA.

prolongó hasta los 25 DDA. Como se puede apreciar en la Figura 13B, no se encontró relación directa entre la actividad y la cantidad de subunidad catalítica.

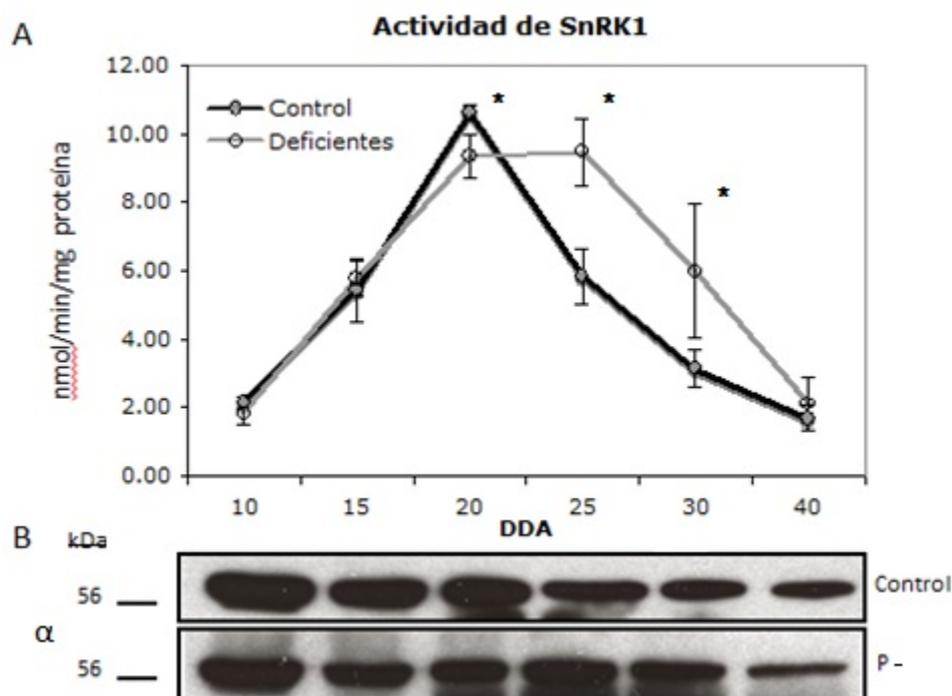


Figura 13. A, actividad de SnRK1 durante el desarrollo de semillas control y deficientes de fósforo. B, western blot de la subunidad catalítica (tomado de la Figura 12). Las barras representan media \pm SD (n=3) * : p<0.05.

5.4 Actividad y subunidades de SnRK1 presentes en los diferentes compartimentos de la semilla de frijol.

Los experimentos anteriores se hicieron usando la semilla completa. Sin embargo, dada la complejidad de la semilla y las grandes diferencias metabólicas que caracterizan a las estructuras que la forman, se consideró necesario hacer un estudio más detallado para lo cual se disectaron semillas control de 20 DDA. Como se puede apreciar en la Figura 14B, la mayor actividad de SnRK1 se encontró en el eje embrionario, seguida del cotiledón y de la cubierta. En la Figura 14C, se muestra que las subunidades α y $\beta\gamma$ están presentes

en los 3 tejidos. Es interesante resaltar que en el eje embrionario a pesar de que la cantidad de subunidad catalítica es considerablemente menor, la actividad es mucho mayor que la de los otros compartimentos. La subunidad γ solo se detectó en el embrión (cotiledones y eje embrionario).

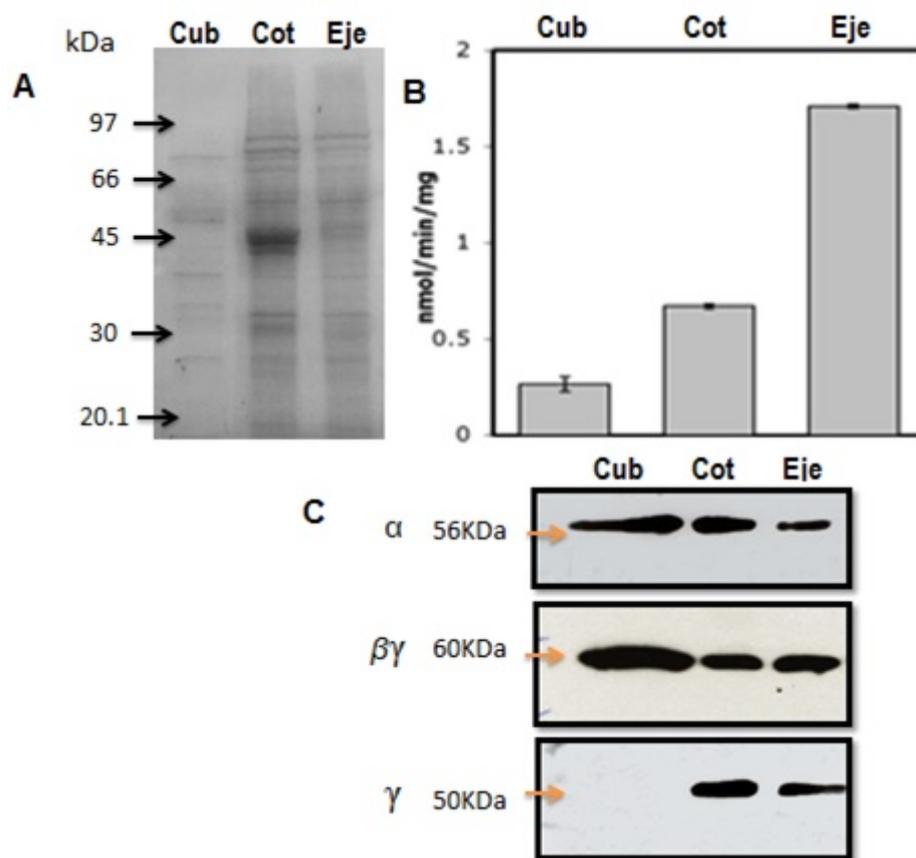


Figura 14. Distribución de la actividad y de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en semillas control de 20 DDA. A, gel de poliacrilamida donde se analizan las proteínas totales presentes en la cubierta (Cub), cotiledón (Cot) y eje embrionario (Eje). B, actividad de SnRK1 en los diferentes compartimentos. C: Identificación por western-blot de la subunidades α , $\beta\gamma$ y γ . Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada muestra (3 réplicas del gel, 5 réplicas del western blot). Las barras representan media \pm SD (n=3).

5.4.1 Efecto del desarrollo y de la deficiencia de fósforo sobre la abundancia relativa de las subunidades de SnRK1 en los diferentes compartimentos de la semilla de frijol.

Dado el efecto tan importante del desarrollo sobre la abundancia de las subunidades del complejo SnRK1 (Figura 12), se hizo un experimento para analizar el efecto de esta variable y de la deficiencia de fósforo sobre las cantidades de las subunidades del complejo SnRK1 en la cubierta, el cotiledón y el eje embrionario de semillas de frijol de 20 y 25 DDA. En la Figura 15 se observan los geles teñidos con azul de Coomassie, donde se destaca que la acumulación de proteínas en el cotiledón es ya visible a los 20 días para ambas condiciones.

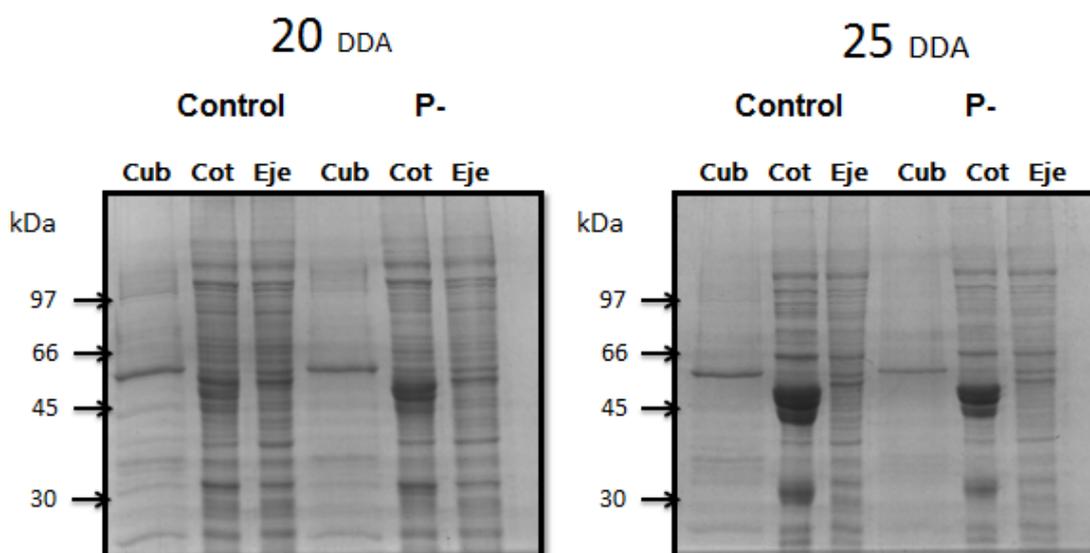


Figura 15. Tinción Coomassie de geles de acrilamida SDS-PAGE con extractos de cubierta (Cub), cotiledón (Cot) y eje embrionario (Eje) de semillas de 20 y 25 DDA producidas por plantas en condiciones control y deficientes de fósforo (P-). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada muestra (3 réplicas del gel).

En la Figura 16 se muestra la distribución de las subunidades de SnRK1 en los diferentes compartimentos de la semilla. La abundancia de la subunidad catalítica (α) en cotiledón es relativamente constante independientemente de la edad de la semilla. En la cubierta, a

los 20 DDA la cantidad de esta subunidad disminuye considerablemente y a los 25 DDA ya no se detecta en las cubiertas de semillas provenientes de plantas cultivadas en deficiencia de fósforo.

La abundancia de la subunidad $\beta\gamma$ es relativamente constante independientemente de la edad, tejido y disponibilidad de fósforo durante el cultivo de las plantas analizadas. Por último, independientemente de la edad de las semillas y de la disponibilidad de fósforo, la subunidad γ no se detectó en la cubierta. La cantidad de ésta subunidad en cotiledón y eje embrionario parece que no depende de la disponibilidad de fósforo, pero disminuye significativamente conforme transcurre la maduración de la semilla.

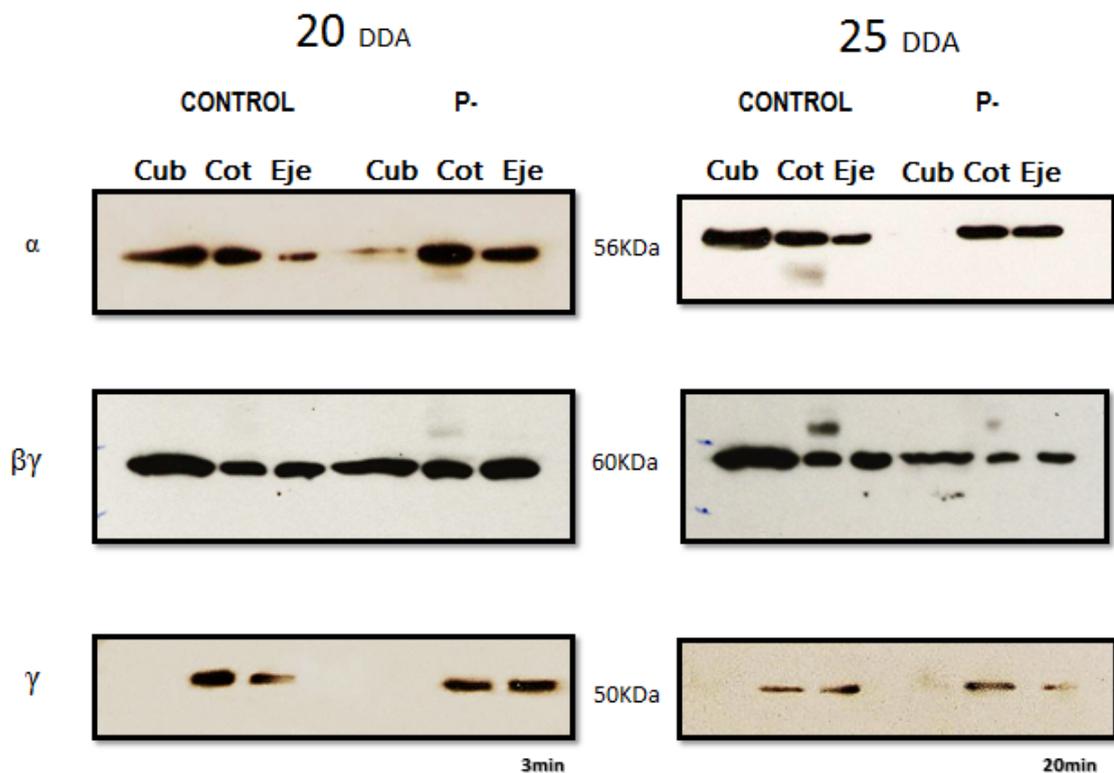


Figura 16. Análisis por western-blot de la distribución de las subunidades del complejo SnRK1 en cubierta (Cub), cotiledón (Cot) y eje embrionario (Eje) de semillas de 20 y 25 DDA producidas por plantas en condiciones control y deficientes de fósforo. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada muestra (5 réplicas del western blot). En todos los casos se empleó un tiempo de exposición de la película aproximado de 3 minutos (tabla 2) para obtener bandas visibles excepto para las repeticiones de las películas de la subunidad γ a los 25 DDA donde se requirió más tiempo (20 minutos).

5.5 Evaluación de la composición del complejo SnRK1 presente en semillas de frijol por cromatografía de exclusión molecular.

Con el propósito de investigar la composición del complejo SnRK1, se elaboraron extractos de embriones de 20 (control) y de 25 (control y deficientes de fósforo) DDA, los cuales se fraccionaron en una columna de Sephacryl S-300, en cuyas fracciones se analizó la distribución de la actividad de SnRK1 y por western-blot la de las subunidades que forman el complejo SnRK1.

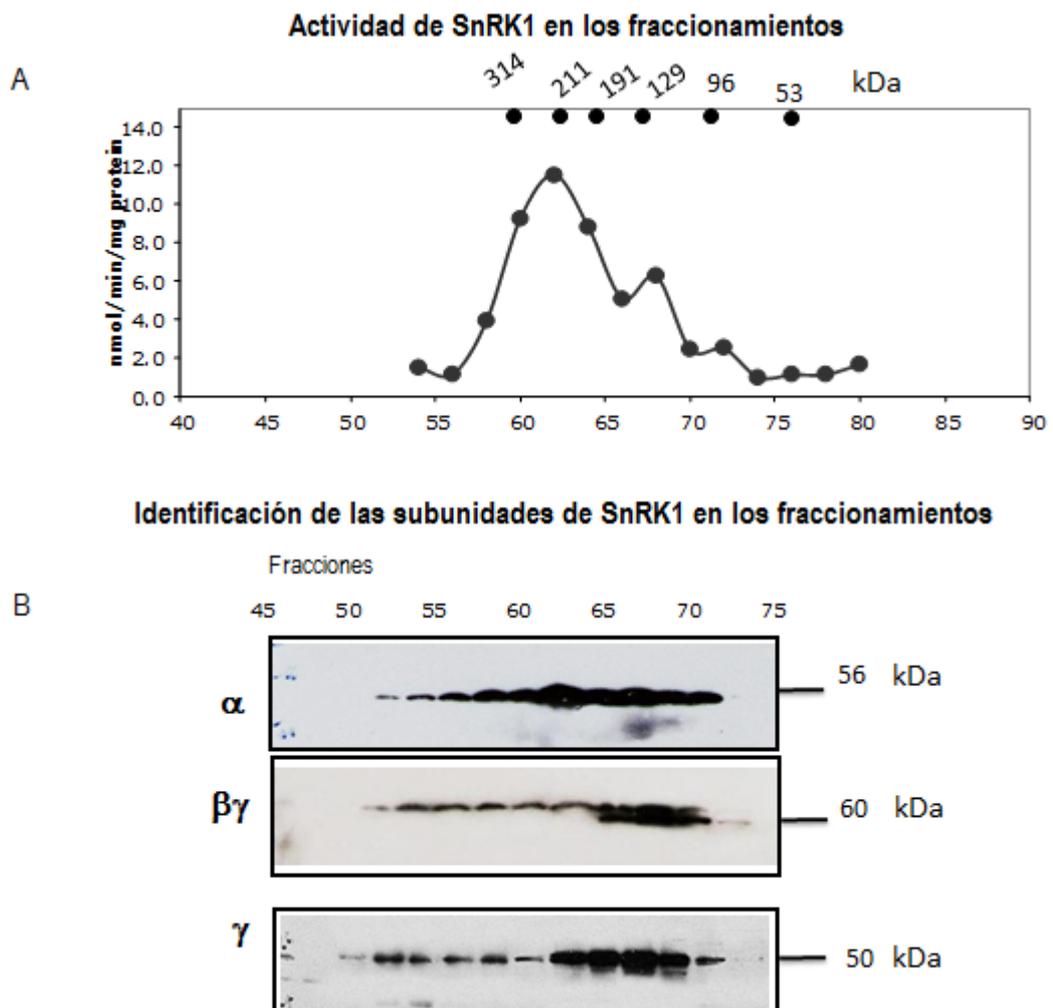


Figura 17. Distribución de la actividad de SnRK1 (A) e identificación por western-blot de las subunidades que forman el complejo SnRK1 (B) en un extracto de embriones (eje embrionario y cotiledón) de semilla control de 20 DDA fraccionado en una columna de Sephacryl S-300. Para A n=3, se muestra la media. Los resultados obtenidos fueron

satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del western blot).

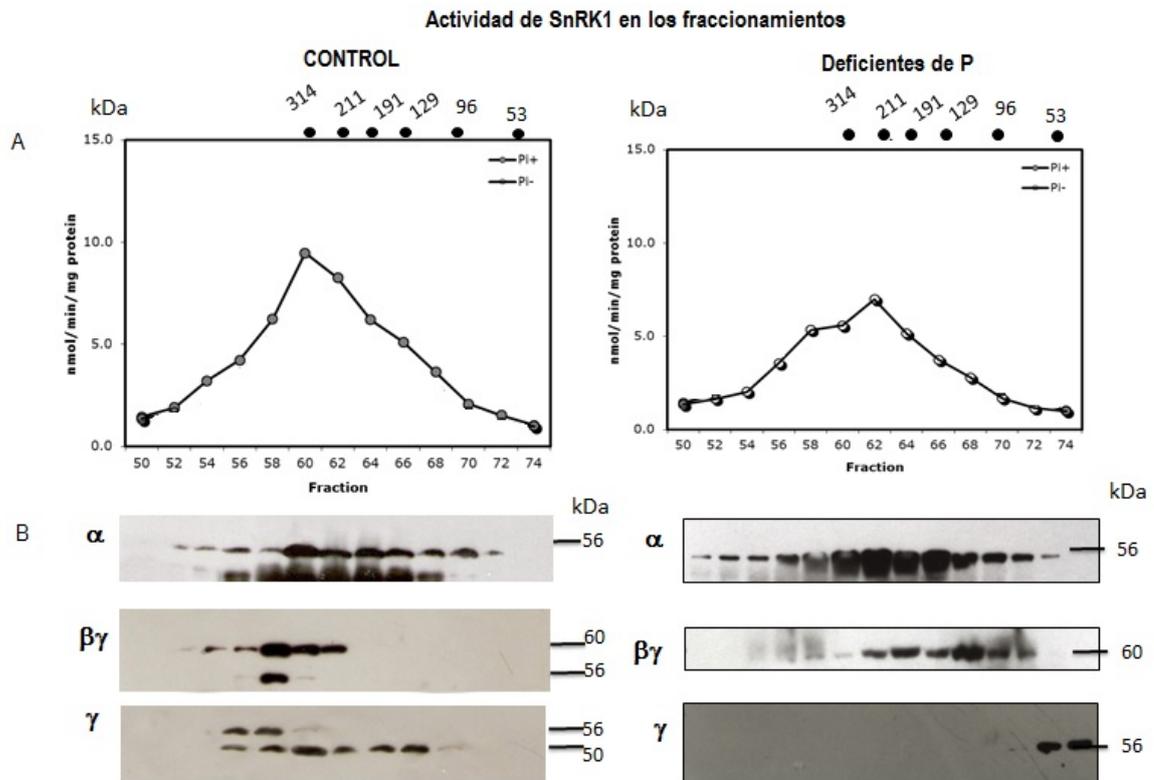


Figura 18. Análisis de la distribución de la actividad de SnRK1 (A) e identificación por western-blot de las subunidades que forman el complejo SnRK1 (B) en extractos de embriones (eje embrionario y cotiledón) de semillas de 25 DDA provenientes de plantas control y deficientes en fósforo y fraccionados en una columna de Sephacryl-S300. Para A n=3, se muestra la media. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del western blot).

Las Figuras 17 y 18 muestran que en todos los casos la actividad SnRK1 se concentra entre las fracciones 50 y 75, con un pico máximo entre las fracciones 58 y 64, las cuales corresponden a complejos con pesos moleculares entre 191 y 314 KDa. La distribución de la subunidad catalítica es amplia pero tiende a concentrarse en las fracciones con alta actividad. En lo que se refiere a la distribución de las subunidades regulatorias los resultados muestran que éstas son afectadas por el desarrollo y la disponibilidad de fósforo. En el fraccionamiento en embriones control de 20 DDA (Figura 17), el pico

máximo de actividad corresponde con la fracción 62 (211 KDa) donde las tres subunidades están presentes. También se aprecia un segundo pico de actividad en la fracción 68 (129 KDa), donde también están presentes las 3 subunidades, aunque la γ en mayor proporción.

A los 25 DDA en embriones control el pico máximo de actividad corresponde con la fracción 60 (314 KDa), las tres subunidades están presentes, aunque las regulatorias aparecen corridas hacia fracciones más pesadas. Por último en el fraccionamiento de embriones de 25 DDA producidos por plantas cultivadas en deficiencia de fósforo, el pico máximo de actividad se presenta en la fracción 62 (211 Kda), la distribución de la subunidad $\beta\gamma$ se ajusta mejor con la actividad y la subunidad γ parece no forma parte del complejo activo.

En la Figura 19 observamos el fraccionamiento que se realizó del tejido de eje embrionario de 20 días de desarrollo en condiciones control. El pico máximo de actividad se registró en la fracción 60 (314 KDa) donde las 3 subunidades están presentes. La subunidad catalítica α , al igual que en los casos anteriores, tiene una distribución amplia, aunque en las fracciones con mayor actividad aparecen 2 bandas de pesos moleculares cercanos. La subunidad γ se presenta en una distribución amplia y en mayor cantidad relativa en fracciones de mayor peso. Por último, la subunidad $\beta\gamma$ aparece en las fracciones con pesos por debajo de los 314 KDa y curiosamente en fracciones donde la subunidad γ está en menor cantidad relativa.

Actividad de SnRK1 en los fraccionamientos de eje embrionario

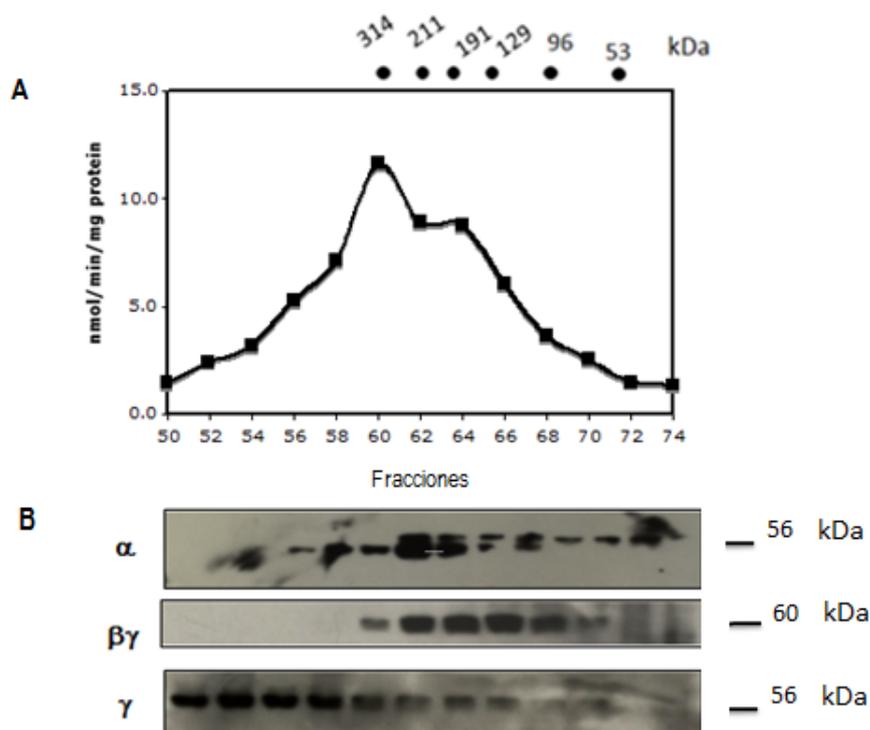


Figura 19. Análisis de la distribución de la actividad de SnRK1 (A) e identificación por western-blot (B) de las subunidades que forman el complejo SnRK1 en un extracto de eje embrionario de semillas control de 20 DDA fraccionado en una columna Sephacryl S-300. Para A n=3, se muestra la media. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del western blot).

5.6 Evaluación de la composición del complejo SnRK1 en semilla de frijol por entrecruzamiento con DSP.

El entrecruzador DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]), fue usado con la finalidad de estabilizar las interacciones entre las proteínas que forman el complejo SnRK1 funcional. Ensayos *in vitro* con extractos de cotiledón y eje embrionario (Figura 20) de semillas control de 20 DDA, mostraron que al aumentar la concentración del entrecruzador la actividad de SnRK1 disminuye, siendo la de eje embrionario la más susceptible.

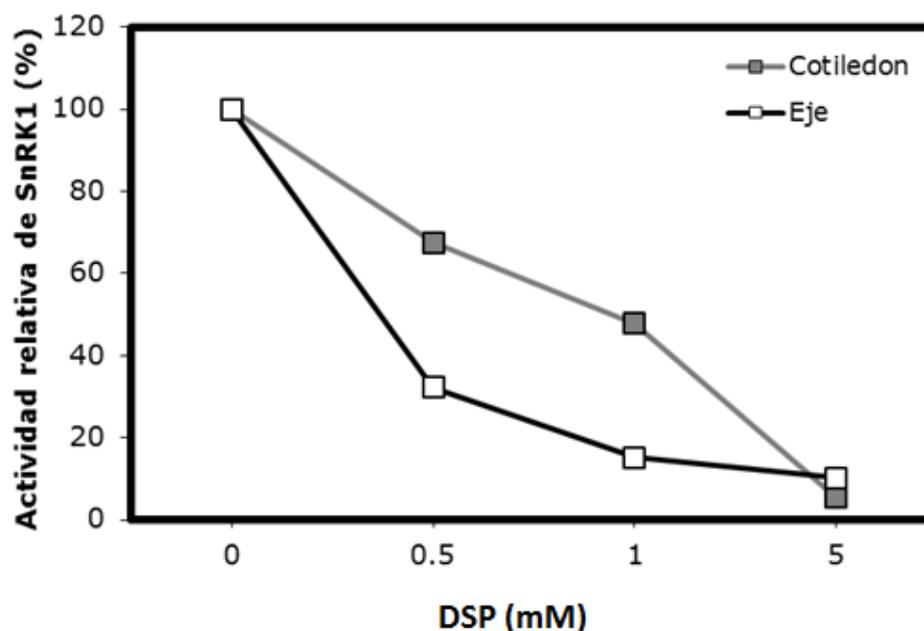


Figura 20. Actividad relativa de SnRK1 en extractos de eje embrionario y de cotiledón de semillas control de 20 DDA tratados con 0, 0.5, 1 y 5 mM de DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) durante 1 h a 4°C. n=3, se muestra la media.

En la Figura 21 se presenta un análisis electroforético de las proteínas tratadas con 0, 1 y 2.5mM de DSP. En condiciones no reductoras se aprecia la formación de complejos de alto peso molecular. Por otro lado, la molécula de DSP (Figura 10) puede romperse si se trata con un agente reductor como el 2-mercaptoetanol del amortiguador de muestra para SDS-PAGE. En las condiciones probadas puede apreciarse que al tratamiento de las muestras con 2-mercaptoetanol previo a la electroforesis revierte casi por completo el efecto del DSP.

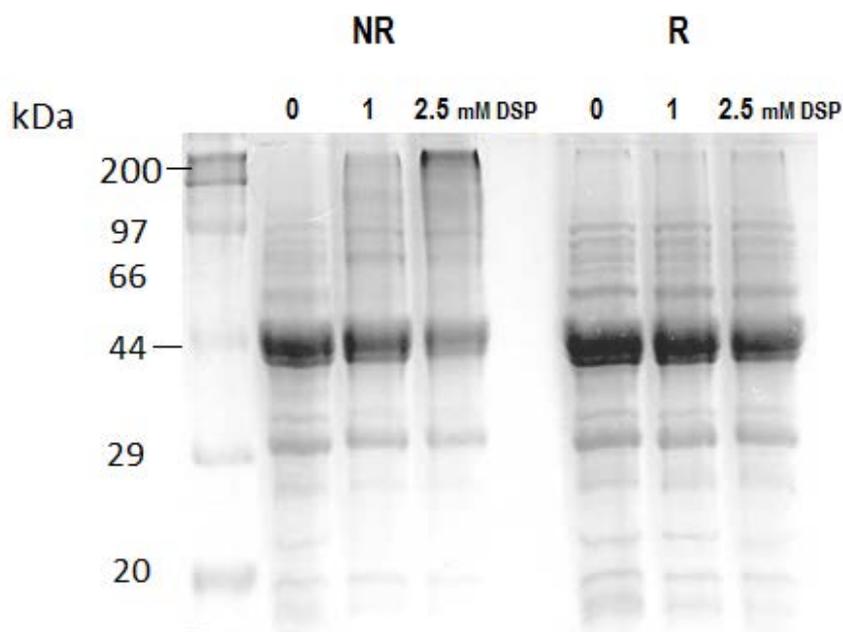


Figura 21. Tinción con azul de Coomassie de geles SDS-PAGE donde proteínas extraídas de cotiledones control de 20 DDA y tratadas con 0, 1 y 2.5mM de DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) fueron analizadas en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del gel).

La Figura 22 corresponde a las muestras analizadas en la Figura 21 después de ser transferidas y probadas con el anticuerpo contra la subunidad catalítica. Como se puede apreciar, dependiendo de la concentración, DSP induce la formación de complejos en los que participa una pequeña proporción de esta subunidad: con 1mM de DSP y en condiciones no reductoras, además de la banda mayoritaria que corresponde a la subunidad catalítica (56KDa), el anticuerpo reconoce otra de aproximadamente 100 kDa. Una concentración de DSP (2.5 mM) induce la formación de otros complejos, algunos de mayor tamaño aunque las bandas no se definen claramente. En condiciones reductoras el efecto del DSP se pierde y solo se observa la banda correspondiente a la subunidad catalítica.

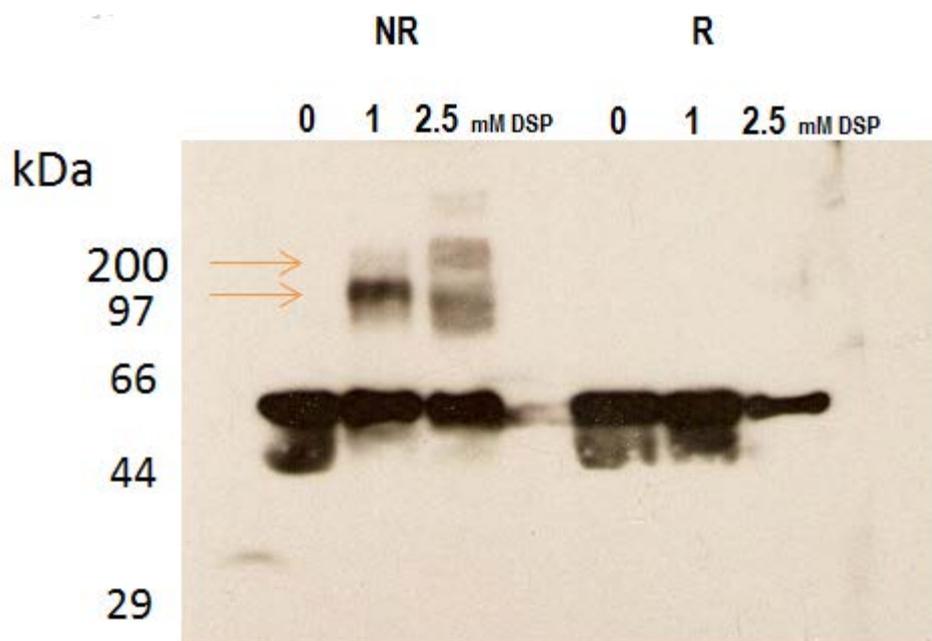


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) sobre la distribución de la subunidad catalítica (α) del complejo SnRK1 en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR) en extractos de cotiledon de semillas control de 20 DDA. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del western blot).

Utilizando muestras tratadas con 1 mM de DSP se usaron los anticuerpos contra las subunidades regulatorias $\beta\gamma$ y γ para tratar de establecer si estas forman parte de los complejos en los que participa la subunidad catalítica (Figura 23). El anticuerpo contra la subunidad $\beta\gamma$ detectó 2 bandas de 44 y 66 KDa y 2 más pesadas que pueden corresponder a las que forma la subunidad catalítica. Por último el tratamiento con DSP no alteró la movilidad de la subunidad γ .

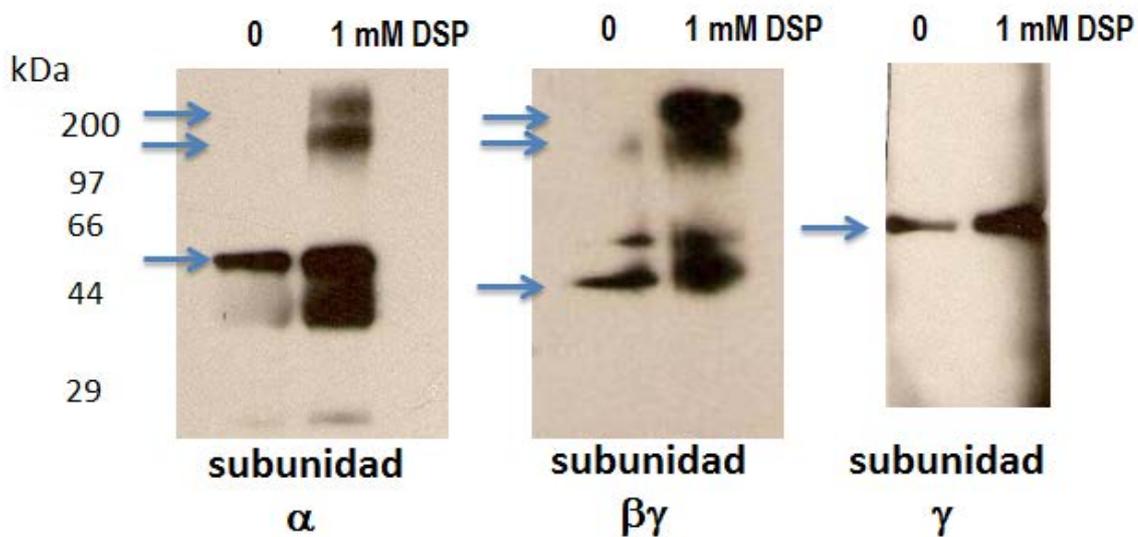


Figura 23. Análisis del efecto de DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) sobre las subunidades α , $\beta\gamma$ y γ presentes en cotiledones de semillas control de 20 DDA. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios y consistentes en cuanto a la repetibilidad para cada ensayo (5 réplicas del western blot).

VI. DISCUSIÓN

Las semillas son órganos heterotróficos, totalmente dependientes de los nutrientes importados de la planta madre. El flujo de nutrientes hacia las semillas influye en su número y determina su talla final (Fenner, 2005), lo que resulta de gran interés tanto biológico como agronómico.

En términos evolutivos, el éxito reproductivo de una planta está determinado por una compensación entre el número de semillas producidas y la talla final que estas alcanzan (Fenner, 2005). De esta forma, una prolífera producción de semillas pequeñas incrementa la probabilidad de que la progenie pueda dispersarse en varios microhábitats favorables para su crecimiento y desarrollo; por otro lado semillas con una talla grande confieren tolerancia a varios tipos de estrés y una habilidad competitiva a la plántula resultante.

Para fines agronómicos, el rendimiento final de un cultivo es una función que relaciona el tamaño de la semillas promedio sobre el número total de semillas obtenidas (FAO, 2012). En este contexto, un rendimiento óptimo para cultivos de importancia comercial o de consumo humano, como lo es el frijol, implica obtener un balance adecuado entre el número de semillas y su talla, lo que muy frecuentemente es difícil de obtener debido a factores ambientales cambiantes y de estrés, cuyo control generalmente esta fuera de las posibilidades humanas.

Entre los factores ambientales que frecuentemente afectan la producción de los cultivos en leguminosas, como el frijol, se encuentra la disponibilidad de fósforo en el suelo, cuya importancia fue descrita previamente. La deficiencia de fósforo que caracteriza los suelos ácidos y alcalinos de uso agrícola constituye una limitación muy grande al rendimiento de

los cultivos de leguminosas en vastas regiones de América Latina, Asia y África (Vance, 2001).

Las principales investigaciones acerca del estrés por deficiencia de fósforo en leguminosas se han realizado en *Lupinus albus* y *Phaseolus vulgaris*, y en menor medida en *Medicago truncatula* (un sistema modelo en leguminosas) y *Glycine max* (Vance, 2001; Broughton *et al.* 2003; Graham y Vance 2003; Vance *et al.* 2003; Tesfaye *et al.* 2007). Sin embargo, los mecanismos de transducción de señales por los que se producen esos cambios adaptativos durante la deficiencia de fósforo aún no son conocidos con claridad.

Más aun, en semillas de leguminosas como las del frijol no se han realizado estudios para evaluar los procesos metabólicos que ocurren y que permiten desarrollar semillas viables cuando la planta madre se encuentra bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo.

Estudios previos han demostrado la importancia que juega SnRK1 durante el desarrollo de la semilla; la inhibición de la expresión de SnRK1 produce profundos efectos en el desarrollo de diferentes plantas. Por ejemplo, plantas nulas para las subunidades catalíticas α de SnRK1 resultan estériles o producen semillas que no se desarrollan o que tienen serios problemas para el almacenamiento de sustancias de reserva, como el almidón (Zhang Y *et al.*, 2001; Radchuk *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2004).

Dado que estudios de este tipo en frijol y bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo no se han realizado, los experimentos que se reportan en este trabajo se hicieron con plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad C60 la cual presenta un crecimiento de tipo arbustivo y un ciclo de vida corto. La presencia de 0.2 mM de fosfato en la solución Hoagland indujo los síntomas clásicos de deficiencia de fósforo (Lynch et

al., 1991; Marschner, 1995; Chiera *et al.*, 2002; Fragoso 2004; Lynch, 1995; Lynch y Brown 2001; Schachtman *et al.*, 1998; Marschner, 1995; Bates y Lynch, 2000b), y resultó suficiente para que las plantas produjeran semillas (Figura 11); estas semillas se evaluaron de forma cualitativa con las producidas por las plantas cultivadas en condiciones control y se encontró que fueron más pequeñas y además se produjeron en menor número, las vainas también eran de menor tamaño. Al respecto, si bien la producción de semillas por las plantas sometidas a estrés por deficiencia de fósforo constituye la puesta en marcha de una serie de mecanismos adaptativos por parte de la planta madre con el fin de completar su ciclo de vida, no es posible indicar de forma precisa los cambios originados en las semillas bajo este tipo de estrés, es decir, no es posible indicar a que se debe la reducción en el tamaño y número de semillas producidas bajo deficiencia de fósforo pues podría ser a consecuencia de la disminución en la cantidad de sustancias de reserva almacenadas en la células o bien a un menor número de células de almacenamiento producidas en estas semillas. Sin embargo, más adelante se provee una hipótesis para este efecto observado.

6.1 Actividad de SnRK1 a lo largo del desarrollo de la semilla.

En condiciones normales, la actividad de SnRK1 presenta grandes cambios durante el desarrollo de la semilla, el valor máximo se observó a los 20 DDA que corresponde también con el inicio en la acumulación de proteínas de reserva (Figura 12A). Esto sugiere que ambos hechos pueden estar relacionados y que sería alrededor del día 20 DDA cuando en la semilla de frijol se presenta la etapa de transición a partir de la cual el metabolismo se orienta a la acumulación de sustancias de reserva. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Weber *et al.* (2005), quienes mencionan que en la etapa de transición de las semillas de leguminosas se observa la participación de cinasas como las dependientes de calcio (CPKD), cinasas altamente relacionadas con las SnRK's, y las cuales son requeridas para iniciar la acumulación de sustancias de reserva en semillas

de arroz al fosforilar a la sacarosa sintasa. De esta forma señales hormonales como el ABA (Weber *et al.*, 2005) o ciertos tipos de estrés que ocurren dentro de la semilla como por ejemplo el ambiente hipóxico en el que se desarrollan los embriones de leguminosas (Rolletschek *et al.*, 2002) derivan en la baja de carbohidratos y/ o energía lo que provoca la activación de la SnRK1 en esta etapa de desarrollo en las semillas de frijol.

El análisis de la expresión de las subunidades que pueden formar parte del complejo SnRK1 muestra que mientras que la subunidad catalítica α es abundante a lo largo del periodo estudiado, la cantidad de las subunidades regulatorias (γ y $\beta\gamma$) se incrementa hasta los 20 DDA, por lo que parece probable que en las etapas iniciales del desarrollo de la semilla de frijol la actividad de SnRK1 esté limitada por la disponibilidad de las subunidades regulatorias (Figura 12B). También es importante mencionar que otro factor que está involucrado en la actividad de SnRK1 es su enzima activadora (SnAK's) que se encuentra río arriba, lo que puede explicar en gran parte la no relación entre la cantidad de subunidad catalítica α encontrada en cada estadio de desarrollo y la actividad SnRK1 encontrada.

Por otro lado, las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, solo se detectaron durante los primeros 10 días de desarrollo de la semilla. Si bien en animales y levadura esta subunidad juega un papel importante para la formación del complejo heterotrimérico activo AMPK/SnF1 al funcionar como una molécula de anclaje para las otras dos subunidades (Yang, 1992), en plantas la ausencia de esta subunidad no representaría un problema al encontrarse la subunidad $\beta\gamma$, la cual se sabe puede interactuar sola con la subunidad catalítica α (Gissot *et al.*, 2004); de hecho en *Arabidopsis* esta interacción es dependiente de glucosa (Buintik *et al.*, 2003).

Al evaluar la actividad de SnRK1 en condiciones control y de deficiencia de fósforo (Figuras 12A y B) se encontró que en ambas condiciones la actividad máxima se presenta a los 20 DDA y mientras que en las semillas control empieza a disminuir luego de ese día, en las plantas cultivadas en deficiencia de fósforo la actividad máxima se prolonga por 5 días más (Figura 13). De acuerdo a estos datos podemos decir que en condiciones de deficiencia de fósforo al mantenerse elevada la actividad de SnRK1 por un periodo mayor, respecto a las semillas de plantas cultivadas en condiciones control, la fase de almacenamiento se estaría reduciendo (etapa de acumulación de reservas) por lo que las células producidas en la fase de pre-almacenamiento (etapa de división celular) no se estarían expandiendo completamente debido a la acumulación de reservas. Esto es posible que se lleve a cabo en un ambiente de estrés como el que se estudió y en parte explicaría la reducción en cuanto al tamaño de las semillas cosechadas en plantas cultivadas bajo deficiencia de fósforo, es decir, el tamaño menor de estas semillas sería debido a una disminución en cuanto a la cantidad de reservas que acumuló la semilla y no debido a una baja en la actividad mitótica durante la fase de pre-almacenamiento.

Es por ello que los análisis posteriores para determinar la composición del complejo SnRK1 se realizaron utilizando semillas de 20 y 25 DDA, las primeras para estudiar las características del complejo cuando muestra su actividad máxima y las segundas para estudiar el efecto de la deficiencia de fosforo.

Otro aspecto igualmente importante fue analizar si la actividad de SnRK1 puede tener cierta relación con los procesos que suceden en los diferentes compartimentos de la semilla. La Figura 14, muestra que en semillas de 20 DDA, el eje embrionario y el cotiledón (embrión) tienen la actividad más alta y es interesante resaltar que la subunidad catalítica α es abundante en la cubierta, no así su actividad. En el eje embrionario se aprecia la actividad más alta y la cantidad más baja de la subunidad catalítica (Figura 14).

En esa misma Figura se muestra que mientras en los extractos de cotiledón y de eje embrionario están presentes las 3 subunidades (α , β y γ), en los de cubierta no se detecta la subunidad γ , lo cual puede contribuir también a que la actividad sea muy baja. Sin embargo, es importante recordar que la subunidad catalítica α debe ser activada río arriba por la cinasa SnAK1/2 (Crozet *et al.*, 2010) y una actividad diferencial de la misma puede explicar por qué en el eje embrionario la actividad es alta a pesar de que la subunidad catalítica es menos abundante que en el cotiledón o en la cubierta.

Las diferencias encontradas en la actividad de SnRK1 durante el desarrollo de la semilla de frijol y bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo nos indican que SnRK1 está jugando un papel importante en el proceso de desarrollo de la semilla. Es probable que SnRK1 sea una de las cinasas involucradas en los procesos de fosforilación de proteínas que ocurre durante la regulación de los procesos asociados al almacenamiento de sustancias de reserva en las semillas de leguminosas (Weber *et al.*, 1996). Por ejemplo, en otras leguminosas como *Vicia* se sabe que la sacarosa fosfato sintasa es inactivada por fosforilación durante el switch metabólico hacia la fase de almacenamiento, aunque aún no se sabe si es debido a SnRK1. Este cambio es acompañado por un incremento en el estado de energía y un decremento de los niveles de AMP (Borisjuk *et al.*, 2003). PEPC, una enzima asociada al almacenamiento, es simultáneamente activada por fosforilación en la etapa de transición. Estos datos proveen evidencia de que los eventos de fosforilación en semillas son activados por señales metabólicas y/o por el estado de energía e incluso oxígeno, vías donde la SnRK1 se sabe que es capaz de actuar (Baena-González *et al.*, 2007).

6.2 La composición de SnRK1 en semillas de frijol

Debido a que hasta el momento no se ha reportado la estructura del complejo SnRK1 activo, así como las subunidades que participan en su formación, y tomando en cuenta que en plantas existe, adicional a las típicas subunidades encontradas en animales y levadura, la subunidad $\beta\gamma$, resultó importante conocer la composición del complejo activos que sería responsable de la actividad encontrada en las semillas de frijol.

En los fraccionamientos de extractos elaborados con cotiledones y ejes embrionarios de semillas control de 20 DDA (Figuras 17 y 19), se aprecia que en las fracciones con mayor actividad podría existir un complejo de 211 KDa que puede corresponder a un complejo heterotrimérico (166KDa) formado por las subunidades α , $\beta\gamma$ y γ , y que en otras fracciones, donde también hay actividad, podrían estar presentes complejos heterodiméricos tipo $\alpha\text{-}\beta\gamma$ o $\alpha\text{-}\gamma$. De igual forma es posible que en aquellas fracciones correspondientes a pesos de más de 300 KDa se encuentren complejos multiméricos conformados por las subunidades en una proporción distinta.

Los fraccionamientos realizados en embriones de 25 DDA (Figura 18) muestran que en condiciones normales de desarrollo, en las fracciones más activas también es probable que esté presente un complejo heterotrimérico. Mientras que, en condiciones de deficiencia de fósforo parece que el complejo presente en las fracciones activas es heterodimérico y formado por las subunidades $\alpha\text{-}\beta\gamma$. Si bien no se realizó una comparación cuantitativa entre los western blot de ambas condiciones (control y deficientes de fósforo) si es posible observar que durante el desarrollo de las semillas en frijol se modifica la expresión de las subunidades regulatorias de SnRK1. Al respecto, Buitink *et al.* (2003), mencionan que diferentes tipos de estrés, entre ellos la deficiencia

de nutrientes, son capaces de modificar la expresión de las subunidades regulatorias β y γ de SnRK1, durante la germinación de semillas de *Medicago*.

Por otra parte, es posible que no todas las interacciones entre las proteínas que forman el complejo SnRK1 sean estables, por lo que se usó el entrecruzador DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) (Figuras 10 y 20), el cual interacciona covalentemente con los grupos amino primarios de los residuos de lisina y el extremo N-terminal de cada polipéptido que se encuentren a una distancia de 12 Å, y puede estabilizar dichas interacciones. El entrecruzador DSP tiene como ventaja adicional que el núcleo de la molécula está constituido por un puente disulfuro que puede romperse en presencia de un agente reductor, lo que dejaría nuevamente en libertad a las proteínas unidas.

Cabe mencionar que este compuesto ha sido utilizado exitosamente para establecer la composición de las ATPasa mitocondriales de levadura (Todd y Douglas, 1981) y de corazón bovino (Joshi y Burrows, 1990). En estos trabajos se reporta que la actividad enzimática disminuye conforme se aumenta la concentración de DSP debido precisamente a la interacción de este agente sobre el complejo activo. También se menciona que a concentraciones elevadas de DSP pueden inducir la formación de complejos no específicos. Por esa razón en este trabajo decidimos utilizar concentraciones menores a 1 mM, las cuales no inhiben por completo la actividad de SnRK1.

Los resultados obtenidos muestran, que en los extractos de embriones de semillas control de 20 DDA, el DSP estabiliza una serie de complejos en cuya formación intervienen las unidades α - $\beta\gamma$ (y probablemente otras más) y cuyos pesos moleculares están en el rango de 100-200 KDa (Figura 23). Sin embargo, el fraccionamiento en la columna de exclusión molecular de un extracto comparable sugiere que en la formación

del complejo también podría intervenir la subunidad γ . Esta aparente contradicción puede deberse a que en las interacciones con la subunidad γ no existen sitios en donde pueda reaccionar el DSP y probablemente el análisis deba ser completado con el uso de entrecruzadores con rangos de interacción diferentes o a que la subunidad γ no interacciona con la subunidad α y $\beta\gamma$.

Al respecto, cabe señalar que la presencia de la subunidad atípica $\beta\gamma$ en plantas, puede favorecer la formación de complejos diferentes a los que se han descritos en animales y levadura. La capacidad de la subunidad $\beta\gamma$ de formar complejos heterodiméricos con la subunidad catalítica α ya ha sido reportada *in vitro* en maíz, así como su interacción con la subunidad catalítica AKIN11 a través del dominio KIS, sin la necesidad de una subunidad β (Lumberas *et al*, 2001). También se ha demostrado, *in vitro*, que $\beta\gamma$ es capaz de interaccionar con las tres subunidades β (Gissot *et al.*, 2006). Estos datos sugieren la posible existencia de otros complejos heterotriméricos conformados por una subunidad catalítica, una subunidad β y la $\beta\gamma$ (Gissot *et al.*, 2006).

Con base en estos datos y con los resultados obtenidos en esta investigación, entre los que destaca la ausencia de las subunidades tipo β a partir del día 10 de desarrollo, podemos concluir que es posible que el complejo heterodimérico α - $\beta\gamma$ sea activo y que sea el responsable de la actividad encontrada en las semillas de frijol de forma particular en la etapa de transición de las semillas que corresponde a los 20 DDA.

VII. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de las semillas de frijol, la etapa de transición que da inicio a la etapa de almacenamiento de sustancias de reserva, se encuentra en el día 20 de desarrollo, cuando también se registra la máxima actividad de SnRK1. En condiciones de deficiencia de fósforo, esta etapa se prolonga hasta el día 25 de desarrollo.

La abundancia de las subunidades que componen al complejo SnRK1 se modifica dependiendo de la etapa de desarrollo de la semilla, las características del tejido estudiado y de las condiciones ambientales, en este caso, de los estímulos generados por la deficiencia de fósforo.

En la etapa de máxima actividad de SnRK1 el eje embrionario es el órgano que registra la máxima actividad de SnRK1.

Es probable que exista un complejo heterodimérico funcional formado por las subunidades α - $\beta\gamma$ durante la etapa de transición de la semilla de frijol (20 DDA).

Los fraccionamientos realizados en embriones de 25 DDA muestran que en condiciones normales de desarrollo, en las fracciones más activas es probable que esté presente un complejo heterotrimérico. Mientras que, en condiciones de deficiencia de fósforo parece que el complejo presente en las fracciones activas es heterodimérico y formado por las subunidades α - $\beta\gamma$.

VIII. PERSPECTIVAS

SnRK1 es capaz de fosforilar varios blancos los cuales son muy distintos entre sí. Sería importante observar si otros tipos de péptidos sintéticos los cuales se basen en blancos distintos a los que se basa la secuencia del péptido sintético AMARA, y el cual fue utilizado en los ensayos de actividad de este trabajo, presentan una actividad distinta o similar a la encontrada en este trabajo. Con estas observaciones y estudiando también la composición del complejo activo responsable de esa actividad se podría conocer si los complejos activos varían en cuanto a las subunidades con las que se forma y de esta forma comenzar a relación distintos tipos de complejos con determinados blancos.

De igual forma el estudio de actividad y composición de SnRK1 en semillas de otras especies de plantas daría un mejor entendimiento acerca del papel que juega este complejo enzimático durante el desarrollo de las semillas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ascencio J. y Fargas J. (1973). Nutrición mineral y rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. 'turrialba-4') cultivado en solución nutritiva. *Agronomía Tropical*. 23(5): 451-466.
2. Athwal GS, Huber JL, Huber SC (1998). Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an amp-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol*. 118:1041-48
3. Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcriptional network in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938-943
4. Baena-González E, Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* 13: 474-482
5. Bates TR, Lynch JP (2000a). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* 87:958-963.
6. Bates TR, Lynch JP (2000b). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *Am J Bot* 87: 964-970.
7. Bhalerao, RP, Salchert K, Bako L, Okresz L, Szabados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J and Koncz C (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5322-5327.
8. Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus spp.*): model food legume. *Plant Soil* 252: 55-128
9. Bradford KJ, Downie AB, Gee OH, Alvarado V, Yang H. (2003). Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol*. 132:1560-76
10. Borisjuk L, Rolletschek H, Walenta S, Panitz P, Wobus U. (2003). Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *Plant J*. 36:318-29
11. Bouly JP, Gissot L, Lessard P, Kreis M, Thomas M (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J* 18: 541-550.
12. Buitink J, Thoma M, Gissot L, Leprince O. (2003). Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory γ and β subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ* 27:55-67.
13. Chiera J, Thomas J, Ruffy T (2002). Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J Exp Bot* 53:473-481.
14. Ciereszko I, Barbachowska A (2000). Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 156: 640-644.
15. Ciereszko I, Johanson H, Hurry V (2001). Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212:598-605.
16. Coello P, Hey SJ, Halford NG (2011a) The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield.

Review J Exp Bot. 62(3):883-93.

17. Coello P, Hirano E, Hey SJ, Muttucumaru N, Martinez-Barajas E, Parry MA, Halford NG (2011b) Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. J Exp Bot. 2012 Jan;63(2):913-24
18. Crozet P, Jammes F, Valot B, Ambard-Breteville F, Nessler S, Hodges M, Vidal J, Thomas M (2010) Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* Sucrose Nonfermenting 1-related Protein Kinase 1 (AtSnRK1) and Its Activating Kinase (AtSnAK) Determines Their Catalytic Activities. J Biol Chem 285 (16): 12071–12077
19. Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG (1994). Purification of the AMP –activated protein kinase on ATP –gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. Eur J Biochem. 223, 351-7
20. Dale S, Arró M, Becerra B, Morrice NG, Boronat A, Hardie DG, Ferrer A (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. Eur J Biochem. 15; 233(2):506-13.
21. Fenner M (2005) Seed size and chemical composition: the allocation of minerals to seeds and their use in early seedling growth. Botanical Journal of Scotland 56, 163–173.
22. Fragoso S, Espíndola L, Páez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martínez-Barajas E, Coello P (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. Plant Physiology. 149:1906-1916.
23. Fragoso IS (2004). Respuesta de soya a la deficiencia de fosfato y sobreexpresión de fitasa en plantas transgénicas. Facultad de Química. UNAM.
24. Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *N. plumbaginifolia*. Planta 218:958–64.
25. Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. FEBS J. 278(21):3978-90.
26. Gissot L, Polge C, Jossier M., Girin T., Bouly J.P., Kreis M. and Thomas M. (2006) AKINβγ contributes to SnRK1 heterotrimeric complex and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. Plant Physiol ; 142: 931-944.
27. Gissot L, Polge C, Bouly JP, Lemaitre T, Kreis M, Thomas M (2004) AKINβ3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. Plant Mol Biol, 56, 747-759.
28. Graham PH, Rosas JC, Estevez de Jensen C, Peralta E, Tlustý B, Acosta-Gallegos J, Arraes Pereira PA (2003) Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective. Field Crop Res 82: 179–192
29. Graham PH, Vance CP (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 131, 872–877.
30. Graham PH y Ranalli P (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Field Crops Res 53:131-146.
31. Graham PH, Rosas JC (1979). Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. Agron J 71:925-926.

32. Grotz N, Guerinot ML (2002). Limiting nutrients: and old problem with new solutions? *Curr Op Plant Biol* 5:158-163.
33. Guilioni L (2003) High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Funct. Plant Biol.* 30, 1151–1164
34. Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J.* 419(2):247-59.
35. Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang Y (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany.* 54 (382):467-475.
36. Halford NG, Hardie DG (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* 37, 735–748.
37. Hardie DG, Carling D, Carlson M. (1999). The AMP-activated/SNF1 protein kinase sub-family: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67:821–55
38. Harthill, J.E., Meek, S.E., Morrice, N., Peggie, M.W., Borch, J., Wong, B.H. and Mackintosh, C. (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47, 211–223.
39. Hedbacker, K., Townley, R. and Carlson, M. (2004) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1836–1843.
40. Heim U, Weber H, Bäumllein H, Wobus U. (1993). A sucrose-synthase gene of *V. faba* L.: ex- pression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 191:394–401.
41. Hernández G, Ramírez M, Valdés-López O, Tesfaye M, Graham MA, Czechowski T, Schlereth A, Wandrey M, Erban A, Cheung F, Wu HC, Lara M, Town CD, Kopka J, Udvardi MK, Vance C (2007). Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol* 44:753-767
42. Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, 13, 861-866.
43. Huber SC, MacKintosh C, Kaiser WM. (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3-proteins. *Plant Mol. Biol.* 50:1053–63
44. Jiang R, Carlson M (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 com- ponent in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099–2106.
45. John W Scott, Jonathan S Oakhill, Bryce JW van Denderen (2009) AMPK/SNF1 structure: a menage a trois of energy-sensing. *Frontiers in Bioscience* 14, 596-610.
46. Joshi S, Burrowst R. (1990). ATP Synthase Complex from bovine heart mitochondria. *JBC* 265 (24), 14518-25.
47. Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 59(2), 316–28. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03871.

48. Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Jones S (1982) Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *JPlant Nutr* 5: 1003–1030
49. Karp G (1998) *Biología Celular y Molecular*. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
50. Kenyon C (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449–460
51. Koch KE (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:509–40
52. Koch K (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 7:235–46
53. Kulma A, Villadsen D, Campbell DG, Meek SE, Harthill JE, Nielsen TH, MacKintosh C (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J.* 37, 654–667.
54. Lauer MJ, Pallardy SG, Blevins DG, Randall DD (1989). Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Physiol* 91: 848-854.
55. Laurie, S., McKibbin, R.S. and Halford, N.G. (2003) Antisense SNF1- related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J. Exp. Bot.* 54, 739–747.
56. Leython S, Jáuregui D (2008). Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical.* 56:1075-1086.
57. Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim C-S, Shu J-K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 97:3730-3734.
58. Lu, CA, Lin CC, Lee KW, Chen JL, Huang LF, Ho SL, Liu HJ, Hsing YI, Yu SM. . (2007) The SnRK1A protein kinase plays a key role in sugar signaling during germination and seedling growth of rice. *Plant Cell* 19, 2484–2499
59. Lumbreras V, Alba MM, Kleinow T, Koncz C, Pages M (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep*, 2, 55-60.
60. Lynch JP, Lauchli A, Epstein E (1991). Vegetative growth of tile common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci* 31:380-387.
61. Lynch JP (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* 109:7-13.
62. Lynch JP, Brown KM (2001). Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225-237.
63. Marschner H (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. New York, Academic Press
64. Mitchelhill KI, Stapleton D, Gao G, House C, Michell B, Katsis F, Witters LA, Kemp BE (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 269, 2361–2364
65. Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Romheld V (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208:373-382.

66. Plaxton WC (2004) Plant responses to stress: biochemical adaptations to phosphate deficiency. In RM Goodman, ed, Encyclopedia of Plant and Crop Science. Marcel Dekker, New York, pp 976–980
67. Paul MJ, Jhurrea D, Zhang Y, Primavesi LF, Delatte T, Schluemann H, Wingler A. (2010) Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant Signal Behav.* 5(4):386-92.
68. Piattoni C., Bustos D., Guerrero S., Iglesias A. (2011) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at serine-404 by an SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate. *Plant physiology.* 156: 1337-50.
69. Poirier Y. and Bucher M. (2002), Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists.
70. Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, 12, 20-28.
71. Purcell PC, Smith AM, Halford NG (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J* 14: 195-202
72. Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665–693
73. Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H. (2006) Repressing the expression of the sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol.* 140(1):263-78.
74. Robaglia C., Thomas M., Meyer C. (2012) Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Op Plant Biol* 15: 301-7.
75. Rochat C, Boutin JP. 1992. Temporary storage compounds and sucrose-starch metabolism in seed coats during pea seed development (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum.* 85:567-572.
76. Rolletschek H, Borisjuk L, Koschorreck M, Wobus U, Weber H. 2002. Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* 53:1099–107
77. Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116:447-453.
78. Schluemann H, Berke L, Sánchez-Pérez GF (2011). Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J Exp Bot* 63: 3379-90.
79. Schmidt W (2001). From faith to fate: ethylene signaling in morphogenic responses to P and Fe deficiency. *J Plant Nutr Soil Sci* 164:147-154.
80. Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113:274–284.
81. Smeekens S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:49–81

82. Strassburger, E. (1994). Tratado de Botánica. 8va. edición. Omega, Barcelona.
83. Sturm A, Tang GQ. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Trends Plant Sci. 4:401–7.
84. Subbaiah CC, Sachs MM. (2001). Altered patterns of sucrose synthase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedlings. Plant Physiol. 125:585–94
85. Sugden C, Donaghy P, Halford NG, Hardie DG (1999a) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase and sucrose phosphate synthase in vitro. Plant Physiol. 120, 257–274.
86. Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG (1999b) Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5¢-AMP. Plant J. 19, 433–439.
87. Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG (1999c) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. Plant Physiol. 120, 257–274.
88. Tesfaye M, Liu J, Allan DL, Vance CP (2007). Genomic and genetic control of phosphate stress in legumes. Plant Physiol. 144, 594– 603.
89. Theodorou ME, Plaxton WC (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiol 99:1680-1685.
90. Todd RD, Douglas MG. (1981). A model for the structure of the yeast mitochondrial adenosine triphosphatase complex. JBC. 256(13), 6984-89.
91. Toroser D, Plaut Z, Huber SC (2000) Regulation of a plant SNF1- related protein kinase by glucose-6-phosphate. Plant Physiol. 123, 403–412.
92. Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytol 157: 423–447
93. Vance CP (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiol. 127, 390–397.
94. Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. Genes Dev. 15, 1104–1114.
95. Wanke M, Ciereszko I, Podbielkowska M, Rychter AM (1998). Response to phosphate deficiency in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. Respiratory metabolism, sugar localization and changes in ultrastructure of bean root cells. Ann Bot 82:809-819
96. Wang TL, Hedley CL. (1993). Genetic and developmental analysis of the seed. In Peas: Genetics, Molecular Biology and Biochemistry, ed. R Casey, D R Davies, pp. 83–120. Cambridge, UK: CAB Intl.
97. Watt M, Evans JR (1999). Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentration. Plant Physiol 120:705-716.
98. Weber H, Borisjuk L, Wobus U (2005). Molecular physiology of legume seed development. Ann Rev Plant Biol 56, 253–79.

99. Weber H, Borisjuk L, Wobus U. (1996). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant J.* 10:823– 34
100. Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P, Wobus U. (1995) Seed coat associated invertases of Fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7:1835–46
101. Weber H, Buchner P, Borisjuk L, Wobus U (1996). Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications on seed development. *Plant J.* 9:841–50
102. Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y, Hardie DG, Richter EA (2002) Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 51, 284–292.
103. Woods A, Salt I, Scott J, Hardie DG, Carling D (1996) The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett*, 397: 347-351.
104. Yang X, Hubbard EJ, Carlson M (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, 257: 680-682.
105. Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schlupepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 49(4):1860-71.
106. Zhang Y, Shewry PR, Jones H, Barcelo P, Lazzeri PA (2001). Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J.* 28:431–42.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

- 1.-SAGARPA-CEA (Comisión Estatal del Agua). Disponible en: <http://www.cea.gob.mx/> Consultado en marzo 2013.
- 2.-SIAP- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA, 2003. Monografía del frijol. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=171&Itemid=81
- 3.-FAO. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2002. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/004/y6000s/y6000s00.htm> Consultado en septiembre de 2012.