



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**Caracterización funcional de la sobreexpresión de *SnRK1* en *Phaseolus vulgaris*
durante la simbiosis de los nódulos de la raíz**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Gabriel de la Hoz Ruiz

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Manojkumar Arthikala.
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
Dr. René García Contreras
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM
Dr. Miguel Lara Flores
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
Dr. Francisco Javier López Baena
FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Dr. Carlos Medina Morillas
FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

LEÓN, GUANAJUATO - MÉXICO

FEBRERO, 2020.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**Caracterización funcional de la sobreexpresión de *SnRK1* en *Phaseolus vulgaris*
durante la simbiosis de los nódulos de la raíz**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Gabriel de la Hoz Ruiz

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Manojkumar Arthikala.
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
Dr. Aaron Ivan Velez Ramirez
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN, UNAM

LEÓN, GUANAJUATO - MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2019.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA
OFICIO CPCB/020/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Biología Evolutiva del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de noviembre de 2020**, aprobó el siguiente jurado para la presentación de examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, del estudiante **DE LA HOZ RUIZ GABRIEL**, con número de cuenta: **519494545**, con la tesis titulada **“Caracterización funcional de la sobreexpresión de SnRK1 en Phaseolus vulgaris durante la simbiosis de los nódulos de la raíz”**, bajo la dirección del **DR. MANOJKUMAR ARTHIKALA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. MIGUEL LARA FLORES
Vocal: DR. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ BAENA
Secretario: DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
Suplente: DR. CARLOS MEDINA MORILLAS
Suplente: DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo,

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de enero de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

En primer lugar, me gustaría agradecer al equipo de postgrado de la UNAM, D. Adolfo, Dña. Lilia y Dña. Erica, por aceptarme en la universidad y poner a mi disposición todos los servicios de la misma, así como orientarme, ayudarme, guiarme en esta etapa y darme la bienvenida a un país tan maravilloso como es México.

En segundo lugar, quisiera agradecer a la Dirección general de Asuntos del Personal Académico (DGAPA / PAPIIT-UNAM) por financiar esta investigación clave IA2O7219 al Dr. Manojkumar Arthikala.

Finalmente, agradezco al Dr. Manojkumar Arthikala por acogerme en su proyecto, por toda su paciencia y gran labor como científico al enseñarme todas y cada una de las técnicas necesarias, por ayudarme a crecer como investigador y por confiar en mi en cada momento durante la investigación y realización de la tesis. De igual manera, agradecer al Dr. Miguel Lara Flores, al Dr. Francisco Javier López Baena, al Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza, al Dr. Carlos Medina Morillas y al Dr. René García Contreras, los cuales forman el comité, por su tiempo y dedicación en la validación de mi tesis, al igual que por sus palabras al validarla.

Agradecimientos

En esta etapa quisiera acordarme y agradecer a toda aquella persona que haya sacado tiempo para apoyarme o simplemente un mensaje que diera ánimos. Y, por supuesto a toda persona que haya ayudado en este viaje a mi crecimiento como persona.

Quisiera agradecer a mi familia y mi hogar, Manuela, Jerónimo, Inmaculada, Asunción, Celia, Concepción, Juan, Matilde, Jero y Almudena por el apoyo incondicional en la distancia.

A mi compañero y amigo Jesús por estar en todos aquellos momentos durante el viaje y servir como apoyo en los momentos donde se necesita.

A los profesores encargados de la coordinación que facilitaron este viaje, Doña Montserrat y D. Afolfo, además de Doña Lilia y Doña Erica por el buen recibimiento y la agilización de los trámites.

Al doctor Aarón por orientarnos por la ciudad y la universidad el primer día.

A la universidad de Sevilla que me otorgó la beca y a la UNAM por brindarme la oportunidad de seguir creciendo con los excelentes profesionales que tiene.

Al equipo de postgrado de la UNAM, D. Adolfo, Dña. Lilia y Dña. Erica, por aceptarme en la universidad y poner a mi disposición todos los servicios de la misma.

Al Doctor Aaron y la Doctora Ilane por recibirme y orientarme en el inicio de la Maestría.

A los doctores Manoj y Kalpana por ser mucho más que unos tutores y ayudarme con todo y poder hablar con ellos como si fuesen familia. Además, deseo agradecer a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA / PAPIIT-UNAM) por financiar esta investigación clave IA2O7219 al Dr. Manojkumar Arthikala.

Al Doctor Francisco Germán Villanueva por la ayuda prestada, los conocimientos que me otorgó y los ánimos que siempre me ha dado.

A Laura, Yanni y Rodrigo, grandes apoyos en la UNAM, ya que sin ellos no hubiera sido lo mismo, además de todas las demás personas que también me hicieron sentir en como en casa.

A toda la gente que me apoyo en la distancia, en los buenos momentos y en los malos, y que te hacen sentir cerca.

ÍNDICE

Contenido	N° de página
Resumen	09
1. Introducción	10
1.1 Leguminosas (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	10
1.2 Origen, producción e importancia de <i>P. vulgaris</i> en México	10
1.3 Biotecnología aplicada a <i>P. vulgaris</i>	11
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	12
Raíces pilosas	12
1.4 Simbiosis de leguminosas-rhizobios	13
La invasión de la rhizobia en la raíz de las leguminosas	14
1.5 Familia quinasa no fermentadora de sacarosa (<i>SnRK</i>)	15
1.6 Sobreexpresión génica	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Hipótesis	21
3.1 Justificación	22
4. Antecedentes	23
4.1 Vía simbiótica de las leguminosas	23
4.2 Transformación transitoria de <i>P. vulgaris</i> por raíces pilosas	24
4.3 Genes expresados de forma específica durante la simbiosis frijol-rizobia	25
4.4 Función de los genes <i>SnRK</i> en la simbiosis	25
5. Metodología	26
5.1 Medios de cultivo	26
5.2 Cepas de microorganismos	26
5.3 Selección del gen candidato <i>SnRK</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
5.4 Material vegetal	27
5.5 Transformación de raíces pilosas en <i>P. vulgaris</i> con <i>A. rhizogenes</i>	27
5.6 Utilización de la bacteria <i>Rhizobium</i> para la inducción de nódulos en las raíces de <i>P. vulgaris</i>	29
5.7 Ensayo histoquímico GUS en raíces transgénicas	29
5.8 Extracción de ARN	30
5.9 Obtención de cDNA	33
5.10 Análisis por PCR	34
5.11 Crecimiento de <i>P. vulgaris</i> en tubos Falcom	34
5.12 Técnicas de microscopía	35
6. Resultados	36
6.1 Análisis estructural y de dominio del gen <i>SnRK1</i> de <i>P. vulgaris</i>	36
6.2 Validación de la sobreexpresión de <i>SnRK1</i> y la localización de <i>SnRK1</i> en los vectores y transformación en <i>A. rhizogenes</i>	37
6.3 Generación de raíces pilosas transgénicas que expresan sobreexpresión de <i>SnRK1</i> y <i>SnRK::YFP</i> en <i>P. vulgaris</i>	39
6.4 Localización subcelular in vivo de <i>PvSnRK1::YFP</i> en raíces pilosas transgénicas	40

6.5 Análisis por RT-PCR de raíces transgénicas para medir las transcripciones de <i>SnRK1</i>	42
6.6 Estudios de fenotipo de la raíz en raíces 35S- <i>SnRK1</i> en raíces transgénicas	43
6.7 Estudios de fenotipo de infección temprana (<i>Rhizobium</i>) en raíces transgénicas y nódulos	46
6.8 Estudios de fenotipos de nódulos en raíces transgénicas	47
6.9 Expresión de sacarosa sintasa, ciclinas celulares y genes simbióticos en las raíces 35S- <i>SnRK1</i>	49
7. Discusión	51
7.1 La sobreexpresión de <i>SnRK1</i> aumenta el número de raíces laterales	51
7.2 La sobreexpresión de <i>SnRK1</i> incrementa el número de nódulos en <i>P. vulgaris</i>	51
7.3 Relación del azúcar y la sobreexpresión de <i>SnRK1</i>	53
7.4 Desarrollo de más de un hilo de infección debido a la sobreexpresión de <i>SnRK1</i>	54
8. Conclusiones	54
9. Bibliografía	56
10. Anexos	69
10.1 Figuras anexo	69
10.2 Tablas anexo	69

Caracterización funcional de la sobreexpresión de *SnRK1* en *Phaseolus vulgaris* durante la simbiosis de los nódulos de la raíz

Resumen

Un elemento indispensable en la regulación transcripcional y metabólica en respuesta al estrés y al estado energético son las proteínas quinasas sensoriales de energía, SNF1 en levadura, AMPK en mamíferos y SnRK en plantas. Las proteínas quinasas SnRK (quinasas relacionadas con la sacarosa no fermentadora SNF1) están implicadas de manera clave en las vías de señalización de las plantas. Las proteínas SnRKs fosforilan diversas enzimas, como la HMG-CoA reductasa, sacarosa y trehalosa fosfato sintasa en *Arabidopsis*. Estudios anteriores muestran que, en *Medicago truncatula*, una HMG-CoA reductasa interactúa con el RLK-DMI2 y es esencial para la señalización de los factores de nodulación y la nodulación temprana. En las leguminosas, el desarrollo de nódulos requiere alta energía (sacarosa), por lo que varios genes de señalización de azúcar (*PvTRE1* y *PvTPS9*) se activan en los nódulos funcionales. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios directos en leguminosas que revelen la función de los genes *SnRK* en la simbiosis de nódulos. En el presente estudio, intentamos comprender el papel de *SnRK1* en la ruta simbiótica de los nódulos de la raíz, por lo que el gen *SnRK1* de *Phaseolus vulgaris* se sobreexpresó (35S-*SnRK1*). A continuación, se indujo la formación de raíces peludas de *P. vulgaris* para la expresión de 35S-*SnRK1*. Los hilos de infección por *Rhizobium* aumentaron significativamente (252%) en las raíces de sobreexpresión de *SnRK1* en comparación con el control. De manera similar, los números de primordios de nódulos y de nódulos también aumentaron significativamente en las raíces transgénicas 35S-*SnRK1* en relación con el control. En conjunto, esto indica que *SnRK1* desempeña un papel crucial en la regulación de los números de nódulos durante la simbiosis de *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*.

Palabras clave: Raíces pilosas, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, simbiosis, *SnRK1*, sobreexpresión.

1. Introducción

1.1 Leguminosas (*Phaseolus vulgaris*)

El frijol se encuentra dentro de la familia Fabaceae (Leguminosae, Papilionoidae) y pertenece al género *Phaseolus* (Borém, 2005). El género *Phaseolus* es el cultivo de leguminosas destinadas al consumo más relevante en el mundo (Singh and Muñoz, 1999) y presenta 76 especies procedentes del Nuevo Mundo (Freytag et al., 2002), de las cuales solo cinco especies son cultivables, estas son el frijol tépari (*P. acutifolius* A. Gary), el ayocote (*P. coccineus* L.), el frijol botil (*P. polyanthus* Greenman), frijol común (*P. vulgaris* L.), y el frijol lima (*P. lunatus* L.) (Borém, 2005; Delgado-Salinas et al., 2006; Smykal et al., 2015). El frijol común se extiende desde el Norte de México al Noreste de Argentina (Koenig and Gepts, 1989; Singh et al., 1991) y su cultivo presenta una extensión del 90%, por lo que resalta entre los demás especies destinadas al cultivo (Singh, 1999). Actualmente, constituye una fuente importante de alimento para más de 300 millones de personas, sobre todo en zonas de Brasil, México, la Zona Andina, América Central y el Caribe (Jones, 1999) componiendo el 65% de la proteína y el 32% de la energía totales que son consumidas (Broughton et al., 2003; Blair et al., 2010). El frijol común es rico en nutrientes, siendo una fuente de ácido fólico, fibra dietética y carbohidratos complejos, presentando además vitaminas solubles en agua, como la tiamina, riboflavina, niacina y vitamina B6, además de ser un buen reservorio no carnico de hierro y otros minerales como son el calcio, magnesio, potasio, el zinc y el cobre (Jones, 1999; Beebe et al., 2000).

1.2 Origen, producción e importancia de *P. vulgaris* en México

Phaseolus vulgaris tiene su origen en América Central y América del Sur, donde se comenzó a extender desde el norte de México hasta el noreste de Argentina. Existe variabilidad a lo largo de los cultivos silvestres de *P. vulgaris* a lo largo de su distribución geográfica, como diferentes formas de crecimiento, diferente morfología en hojas y diferentes formas, colores y tamaños en semillas (Koenig and Gepts, 1989; Singh et al., 1991). Esta variabilidad no solo se observa morfológicamente, sino que también a nivel molecular, gracias al uso de microsatelites como marcadores moleculares. Atendiendo a la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en el año de 2016, se obtuvo una producción mundial de *P. vulgaris* de 26.8 millones de toneladas como grano seco, por otro lado, se obtuvieron por hectárea 23.5 millones de toneladas como hortaliza (FAOSTAT, 2018). En México se consume per capita una gran cantidad de esta leguminosa, llegando a los 10.2 kg anuales. El frijol no solo representa una gran importancia en la alimentación dentro de México, sino que su cultivo constituye un gran factor económico puesto que México se posiciona como el 7° productor de frijol a nivel mundial, produciendo anualmente unas 1,183,868 toneladas. Dentro de México,

los estados que presentan una mayor producción son Sinaloa, Zacatecas y Durango, lo cual, económicamente aporta al año más de 16 mil millones de pesos (SIAP, 2018).

Debido al gran impacto que supone el frijol en la población de México, se promovió la creación del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El desarrollo de herramientas biotecnológicas que tienen como fines el estudio y optimización del frijol están siendo impulsadas por las investigaciones que son llevadas a cabo en el Centro de Ciencias Genómicas y los grupos de científicos que las realizan.

1.3 Biotecnología aplicada a *P. vulgaris*

Para un estudio óptimo de los organismos a nivel molecular, además de las interacciones que presentan con los organismos de su alrededor, se utiliza la generación de plantas genéticamente modificadas, aunque el frijol común presenta gran dificultad para producir en él una transformación estable y eficaz debido a que el frijol es un cultivo que no admite flexibilidad a la transformación y cultivo *in vitro* (Hnatuszko-Konka et al., 2014).

Cuando se trata de generar plantas transgénicas de frijol común se presentan varias opciones. La utilización de métodos de bombardeo de partículas es una de ellas, aunque esta requiere una gran cantidad de trabajo, dando como resultado un porcentaje de transformación que no es el esperado, de un 0.001, mientras que el bombardeo con 1.5g de ADN plasmídico de los explantes a una distancia de 4 cm dos veces producía la mayor eficiencia (8.4%) (Christou, 1997; Aragao et al., 2002; Nguyen et al., 2012). Otra opción es el intentar generar a través de *Agrobacterium tumefaciens* plantas transgénicas de frijol común, lo cual producirá una transformación que no presenta estabilidad, con callos sin la capacidad de regeneración y tejidos quiméricos (Mariotti et al., 1989; Franklin et al., 1993).

Descubrimientos recientes muestran que existe un método eficiente utilizando genes marcadores combinados con el gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa de *S. cerevisiae*. Tras depositar los explantes que se han transformado previamente en un medio rico en kanamicina, estos comienzan a producir nuevos brotes tras pasar un periodo de cuatro a cinco meses. Este protocolo presenta dos ventajas como son que proporciona la obtención de regenerantes transformados además de que la transformación presenta estabilidad para el gen utilizado (Solis-Ramos et al., 2019).

La técnica de transformación de frijol más utilizada en la actualidad es la transformación mediante *Agrobacterium rhizogenes* que dará como resultado unas raíces transgénicas que se denominan raíces peludas (hairy roots). Se obtienen unas plantas semi-transgénicas (compuestas) debido a que únicamente las raíces generadas a partir de la infección de *A. rhizogenes* son transgénicas mientras que el resto de estructuras de la planta se encuentran inalteradas (Estrada-Navarrete et al., 2006). Esta

técnica destaca por su facilidad y la obtención de un alto porcentaje de transformaciones en una amplia variedad de especies vegetales (Gelvin, 2000).

Agrobacterium rhizogenes

La enfermedad de la raíz peluda es causada por una bacteria del suelo, *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfer, 1990). Esta enfermedad que se le induce a la planta provocará que desarrolle nuevas raíces con características especiales como respuesta a hormonas, una elevada tasa de crecimiento y la creación de metabolitos secundarios (Srivastava & Srivastava, 2007). La infección causada por *A. rhizogenes* se lleva a cabo mediante la transferencia del plásmido *Ri* y la integración de T-ADN en el genoma vegetal (ADN de transferencia) y su posterior expresión dentro de las células vegetales (Grant et al., 1991; Gelvin, 2000; Kumar & Fladung, 2001). Al producirse la expresión dentro de las células vegetales del T-ADN que se encuentra integrado en ellas, se inducen raíces transformadas y se sintetizan opinas, compuestos de carbono de bajo peso molecular (Petit et al., 1983). Es posible reemplazar ese T-ADN mediante ingeniería genética con ADN externo, permitiendo la posibilidad de añadir un gen de interés, pudiendo introducirlo dentro de la planta, esto también le aporta a las raíces transformadas estabilidad genética.

Raíces Pilosas

Las raíces pilosas se tratan de raíces transformadas que se generan por la infección de *Agrobacterium rhizogenes*. A través de esta técnica de transformación es posible profundizar en el estudio de la biología de la raíz, interacción con microorganismos, genómica funcional, etc. Aunque esta técnica presenta una desventaja como es que las raíces transgénicas no serán heredadas por la progenie, lo cual hace que no sea posible usar para el mejoramiento genético estas plantas, no obstante, en el campo de la investigación serán de gran utilidad (Hnatuszko-Konka et al., 2014). La existencia de un protocolo para la formación de raíces pilosas en frijol común de manera eficiente y estable permitirá además el análisis de la interacción que ocurre entre frijol y *Rhizobium* (Estrada-Navarrete et al., 2006 y 2007). Entre las leguminosas en las que se ha conseguido una óptima generación de raíces pilosas encontramos: *Lotus corniculatus* (Petit et al., 1987), *Trifolium repens* (Lugtenberg, 1989), *Vicia hirsuta* (Quandt et al., 1993), *Vigna aconitifolia* (Lee, et al., 1993), *Glycine max* (Cheon et al., 1993), *Lotus japonicus* (Stiller et al., 1997), *T. pratense* (Díaz et al., 2000), *Medicago truncatula* (Boisson-Dernier et al., 2001) y *Sesbania rostrata* (de Velde et al., 2003).

1.4 Simbiosis de leguminosas-rizobios

La simbiosis que tiene lugar entre las bacterias del suelo pertenecientes a rizobia y las raíces de las leguminosas es de gran importancia debido a la fuente de nitrógeno asimilable que les proporciona la bacteria a las plantas. Para el inicio de la simbiosis debe producirse un intercambio de señales previas entre los organismos (Oldroyd & Downie, 2008).

La planta libera compuestos como son carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos y derivados fenólicos a la rizósfera, siendo estos derivados fenólicos los que dan comienzo al primer paso para la simbiosis entre raíces de leguminosa y bacteria (Perret et al., 2000). Dentro del grupo de compuestos fenólicos que libera la planta, encontramos los flavonoides y los isoflavonoides que actuando de forma conjunta con los glucósidos, las betaínas y los ácidos aldónicos desempeñan el papel de quimioatrayentes de las bacterias. Esto provocará que las bacterias se sientan atraídas por el ápice de los pelos radicales. La segunda señal que se produce en el intercambio de señales entre la bacteria y la planta tiene lugar en un regulador transcripcional bacteriano, la proteína *Nod D*, con el que actúan los flavonoides, lo que provoca la transcripción de los genes *nod*. Estos genes codifican proteínas bacterianas que presentan un papel dentro de los procesos de síntesis y producción de metabolitos llamados factores de nodulación (FN) (Geurts & Bisseling, 2002).

En los pelos radicales se han encontrado la mayoría de respuestas celulares y específicas que producen las raíces cuando se encuentran ante los FN. Estos compuestos FN desencadenarán una serie de sucesos preinfectivos que incluyen un reajuste del citoesqueleto y un curvamiento en los pelos radicales de la raíz (Murray, 2011). Además, esta presencia de FN, provocará un incremento en los niveles de Ca^{2+} en los pelos radicales, justamente en el área apical de estos, coincidiendo con la fragmentación y polimerización que tiene lugar en la misma zona de los microfilamentos de actina en raíces de *P. vulgaris* y *M. sativa* (Cárdenas et al., 1999; de Ruijter et al., 1999). Existen además cambios morfológicos tras la aplicación de FN como el crecimiento de los pelos radicales, produciendo un aumento de grosor en su zona apical. Una vez que se desencadena la respuesta, continua con un redireccionamiento del crecimiento apical del pelo radical que se producirá a las 6 horas y su ramificación entorno a las 12 horas (Cárdenas et al., 2000). Los FN también influyen sobre las raíces en las leguminosas, un aumento en la presencia de transcrito de genes específicos llamados nodulinas tempranas y la reactivación en las células corticales de la división de la mitosis. Se evidenció que las respuestas anteriores son un requisito necesario para la infección de rizobia (Murray, 2011).

La invasión de la rhizobia en la raíz de las leguminosas

La emisión de las señales químicas y su reconocimiento permiten que la rhizobia se adhiera a las raíces, más concretamente a la región apical de los pelos radicales. En esta unión, la lectina juega un papel fundamental ya que reconoce y se une de forma específica a ciertos azúcares. La unión que se produce entre rhizobia y las raíces desencadenará en el hospedador una gran cantidad de cambios moleculares y celulares (Bohlool y Schmidt, 1984; Gage, 2004). Uno de esos cambios es la deformación del pelo radical, debido al crecimiento del rizobio este va produciendo sustancias que harán que se produzca un ensramamiento en los pelos radicales de leguminosas. El siguiente paso es la formación del hilo infectivo (HI), el cual se producirá gracias al ensramamiento previo. El rizobio producirá un polisacárido que activará la producción de poligalacturonasa, esto provocará un ablandamiento en la pared del pelo radical, en la zona del ensramamiento, siguiendo una invaginación de la membrana y la creación de una nueva pared celular, esto dará lugar al hilo infectivo, el cual se trata de una estructura con forma de tubo a través de la cual ingresarán las bacterias. Tras este proceso, el HI se desplazará hacia el interior del pelo radical dirigido por el núcleo del pelo, a medida que se produce la migración las bacterias presentarán un estado de división (Ljunggren & Fahraeus, 1961; Murray, 2011) (Figura 1). Realizando una caracterización molecular dentro de este proceso se ha podido conocer que se requieren de elementos como los microtúbulos y los filamentos de actina propios del citoesqueleto además de una *remorina*, *flotillin*as, receptores tipo cinasa, una *vapirina* enzimas que medien procesos de ubiquitinación y factores de transcripción (Popp & Ott, 2011).

A medida que el HI va desarrollándose, las células del córtex tendrán como objetivo formar el primordio del nódulo, para ello producirán la reactivación de procesos de división celular. La división se producirá en el córtex interno para dar lugar a nódulos indeterminados como es el caso de las leguminosas, por el contrario la división ocurrirá en el cortex externo en leguminosas que presentan nódulos determinados (Oldroyd & Downie, 2008). En las primeras etapas de la nodulación, se produce un incremento en los niveles de transcritos de nodulinas tempranas como son *Enod40* y *Enod2*. Al producirse la llegada del HI al cortex, se producirá una bifurcación de este, liberando de esta forma bacterias, las cuales ingresan en el citoplasma de las células del cortex, presentando una membrana identificada como peribacteroidal. En este nuevo simbiosoma que se forma, las bacterias se transformarán en bacteroides que presentarán el complejo nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, con los que se logrará la fijación biológica del nitrógeno (Popp & Ott, 2011).

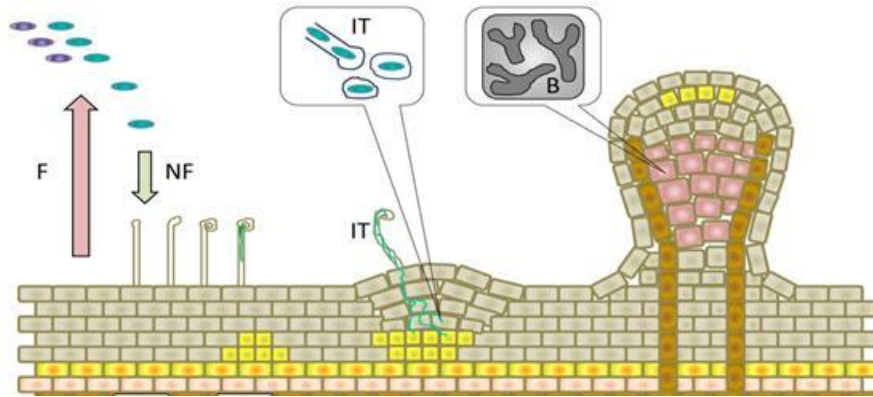


Figura 1. Esquema general de formación de simbiosis nodular y funcionamiento en leguminosas. De izquierda a derecha: tres etapas principales de la simbiosis, a saber, la preinfección, la colonización de la raíz / morfogénesis de los nódulos y la fijación de nitrógeno. F - flavonoides excretados por la raíz, NF - Factores nodales excretados por bacterias nodulares, IT - hilo de infección, B - bacteroides. (Figura tomada de Sergeevich et al., 2015).

1.5 Familia quinasa no fermentadora de sacarosa (*SnRK*)

SnRK es una proteína (quinasa no fermentadora de sacarosa) que presenta homología tanto con las proteínas quinasas *SNF1* (no fermentadoras de sacarosa 1) como con las proteínas quinasas *AMPK* (quinasas dependientes de *AMP* cíclico). Esta presenta una amplia distribución en las plantas y está inmersa en distintas vías metabólicas y de señalización. Existe homología entre las quinasas de levadura, mamíferos y plantas, siendo *SNF1*, *AMPK* y *SnRK1* respectivamente, además se agrupan dentro de la superfamilia de proteínas quinasas *SNF1*.

La familia *SnRK* presenta un papel clave en la señalización del azúcar, llegando a activarse bajo situaciones de estrés, tanto abiótico como biótico, que conllevarán una escasez de energía al verse involucrados los procesos de respiración, fotosíntesis o procesos que involucran carbono (Hedbacker & Carlson, 2008).

Las proteínas quinasas *SnRK* puede subdividirse en tres subfamilias: *SnRK1*, *SnRK2* y *SnRK3* (Halford, 2005). Esta proteína quinasa presenta una alta conservación en eucariotas.

Existe una subunidad catalítica presente en los complejos *SNF1/AMPK/SnRK1*, conocida como *SNF1*, *AMPK- α* o *SnRK1*, que está relacionada con otra subunidad, en este caso una subunidad activadora y (la cual puede ser denominada *SNF4*, *AMPK γ* o *SnRK γ*) y una subunidad reguladora β (que será *SIP1/SIP2/GAL83*, *AMPK β* , *SnRK β*) (Mitchelhill et al., 1994; Jiang & Carlson, 1997).

Subfamilia SnRK1: La proteína quinasa *SnRK1* al igual que sus homólogos en levaduras y animales, *SnF1* y *AMPK* respectivamente, (Halford & Hey, 2009; Smeekens et al., 2010) se encuentra regulada en parte por la fosforilación de un residuo de treonina en la región del bucle T (Sugden et al. 1999a). Dos de las quinasas que producen esta activación son conocidas como quinasa-1 y -2 activadora de *SnRK1* (*SnAK1* y *SnAK2*) o quinasas de interacción de geminivirus (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006; Hey et al., 2007; Shen et al., 2009). Al producirse una infección por geminivirus se produce la expresión de la respuesta de estas quinasas, además de producirse la interacción con una proteína concreta que es la proteína de replicación de geminivirus AL1 (Shen & Hanley-Bowdoin, 2006), lo que indica una respuesta de señalización metabólica frente a la infección de patógenos. *SNF1* presenta un importante papel en *Saccharomyces cerevisiae* como componente central cuando se desencadena la respuesta a la ausencia de glucosa, interviniendo en el paso de metabolismo fermentativo a metabolismo oxidativo mediante la reversión del estado de represión de ciertos genes que se encuentran en ese estado relacionados con la glucosa (Carlson, 1999; Young et al., 2003). La quinasa *SnRK1* es la encargada de la señalización para mantener la energía, activando las vías metabólicas catabólicas que inducirán la obtención de energía, inhibiendo paralelamente las rutas anabólicas que producen un gasto de energía (Emanuelle et al., 2016).

RKINI fue el primer miembro de la subfamilia *SnRK1* que se evidenció en plantas. Descubierta al aislar una secuencia de ADNc a partir de una librería de ADNc de centeno, y observando efectos de reversión en la insuficiencia de *SNF1* en la cepa mutante de levadura *snf1Δ* (Alderson et al., 1991).

La quinasa *SnRK1* se encarga de la regulación de enzimas biosintéticas a través de procesos de fosforilación como la *HMG-CoA* reductasa (*HMG*) y la sacarosa fosfato sintasa (Sugden et al. 1999b), lo que desencadenará a su inactivación. Además se encargará de fosforilar para su regulación de la trehalosa-fosfato sintasa, la nitrato reductasa y la *6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-1,6-bisfosfatasa* (Coello et al., 2011), pero para su inactivación, éstas enzimas necesitarán de que una proteína 14-3-3 se una (Halford & Hey, 2009). La adenosin difosfato (ADP)-glucosa pirofosforilasa se trata de otra enzima que se encuentra regulada por la *SnRK1* mediante la modulación de su estado redox (Tiessen et al., 2003). La adenosin difosfato (ADP)-glucosa pirofosforilasa se trata de otra enzima implicada en el metabolismo de las plantas, la cual se encuentra regulada por *SnRK1* mediante los cambios en su estado redox (Tiessen et al., 2003).

SnRK1 se encuentra inactiva ante presencia de azúcares, además, esta quinasa causa cambios de transcripción de genoma extremadamente amplios debido a la ausencia de nutrientes en la planta (Baena-González et al., 2007).

En diversas plantas se ha encontrado la subfamilia *SnRK1*, resultado de que es la subfamilia más estudiada. Entre ellas encontramos 2 miembros de *Arabidopsis* (Halford & Hey, 2009) y 3 miembros de *Brachypodium distachyon* (Wang et al., 2015).

Subfamilia SnRK2: La subfamilia SnRK2 se encuentra integrada por serina/treonina quinasa específicas de la planta que se encuentran relacionadas con los mecanismos de respuesta al estrés abiótico y al crecimiento que experimenta la planta dependiente de ácido abscísico (ABA) (Kulik et al., 2011).

Los integrantes de la subfamilia *SnRK2* presentan una serie de dominios estructurales parcialmente cambiantes en el extremo C-terminal y tienen en común 2 regiones conservadas de aminoácidos tanto en el bucle de activación y como en el dominio de unión de ATP.

El lugar donde se producirá la fosforilación de la proteína quinasa será el dominio conservado del bucle de activación. Los residuos de Serina/Treonina presentan una gran importancia para la actividad de *SnRK2* (Belin et al., 2006).

En esta subfamilia encontramos funciones como son la sobreexpresión del gen *SnRK2.8* en *Arabidopsis*, lo cual produce un incremento notable en la tolerancia a la sequía (Umezawa et al., 2004; Shin et al., 2007). En *Arabidopsis*, mutantes dobles que presentaban copias con una alteración genética en *SnRK2.2* y *SnRK2.3* evidenciaron una sensibilidad mayor a ABA, reprimiéndose a su vez la germinación de semillas y el crecimiento radicular (Fujii & Zhu, 2009). En mutantes triples *SnRK2.2/2.3/2.6* se observó la función de *SnRK2*, plasmandose una gran dependencia a ABA como resultado de un déficit de agua, así como el desarrollo de la semillas y su germinación (Fujii & Zhu, 2009; Fujita et al., 2009; Nakashima et al., 2009).

Estudios demostraron que aplicando una sobreexpresión del gen *SnRK2*, las plantas de *Jatropha* presentarán una resistencia mayor a la sequía y la sal (Chun et al., 2014).

Mediante una expresión transitoria en protoplastos, se evidenció que las SnRK2 de *Arabidopsis thaliana* en todo su conjunto, a excepción de SnRK2.9, se activan tras la aplicación de diversos osmolitos, como puede ser sacarosa o NaCl, de forma instantánea, lo que sugiere es que el papel de estas cinasas es de respuesta general al estrés osmótico (Boudsocq et al., 2004, 2007). En la actualidad se ha evidenciado que el gen *SnRK2.4* es perteneciente del trigo y el gen *SAPK8* perteneciente al maíz. Estos le otorgan a las plantas transgenicas de *Arabidopsis* una mayor resistencia al estrés y a la sal (Mao et al., 2009; Ying et al., 2011).

Los miembros que se han evidenciado en esta subfamilia han sido 10 en *Arabidopsis* (Halford & Hey, 2009), 10 en *O. sativa* (Kobayashi et al., 2004), 10 en Sorgo (Li et al., 2010) y 10 en *B. distachyon* (Wang et al., 2015).

Subfamilia SnRK3: La subfamilia *SnRK3* engloba un conjunto de proteínas quinasas que interactúan con las proteínas de unión a calcio de la calcineurina B (CBL) (Luan, 2009). Existen distintas nomenclaturas para nombrar a las quinasas *SnRK3*, como son quinasas similares a *SOS2*, quinasas relacionadas a *SOS2* (Guo et al., 2001; Gong et al., 2004) y quinasas que interactúan con *CIPKs-CBL* (Shi et al., 1999). Estas proteínas están involucradas en la interacción con las proteínas similares a la calcineurina B con el objetivo de producir en la ruta de la señalización del calcio una regulación (Guo et al., 2002). En el caso de los sensores de calcio que interactúan con ellos sucede una situación parecida. En *Arabidopsis*, las proteínas que presentan similitud con calcineurina B se nombran de forma alterna como *SOS3*, *SCaBPs* o *CBL* (Shi et al., 1999; Liu y Zhu, 1998; Halfter et al., 2000; Gong et al., 2004).

En la subfamilia *SNRK3* se encuentran bien conservados tres lugares dentro del bucle de activación, como son Ser-156, Thr-168 y Tyr-175 (Chaves-Sanjuan et al., 2014). Cuando en la quinasa *SOS2* se realiza un reemplazo de estos residuos por un residuo de Asp se incrementa considerablemente la actividad de dicha enzima *in vitro*.

En situaciones de estrés salino, la proteína de unión a calcio *SOS3* percibe un incremento en los niveles de calcio en el citosol, es entonces cuando el complejo *SOS3-SOS2* activa el transportador de iones *SOS1* que se encargará de bombear el exceso de sodio que se encuentra en el citosol fuera la célula (Ji et al., 2013).

Cuando ocurre un incremento en la concentración de Ca^{2+} , los CBL lo detectan, desencadenando ya sea por estímulos celulares o estímulos ambientales cambios de conformación en el enlace de Ca^{2+} , que normalmente producen la activación de los CIPK que participan junto a ellos. Los CIPK presentan una función relevante dentro de las respuestas de las plantas condiciones adversas como el frío o la sequía, el ABA, el azúcar, la sal y los cambios de pH (Hrabak et al., 2003; Gong et al., 2004; Luan, 2009; Coello et al., 2010)

Fue en *A. thaliana* donde se identificaron las proteínas CIPK y CBL (Kudla et al., 1999). Finalmente, mediante análisis bioinformáticos, se consiguió identificar la totalidad de proteínas que se encuentran en esta subfamilia tanto en *A. thaliana* y *O. sativa* (Kolukisaoglu et al., 2004), lo cual representó un gran avance para el estudio de la subfamilia *SnRK3*.

Los miembros que se han evidenciado en esta subfamilia han sido 25 miembros en *Arabidopsis* (Halford & Hey, 2009), 30 en *O. sativa* (Kolukisaoglu et al., 2004) y 31 en *B. distachyon* (Wang et al., 2015).

1.6 Sobreexpresión génica

La mayoría de los genes sobreexpresados están inmediatamente adyacentes a los potenciadores. Además, en al menos un caso, los potenciadores de CaMV35S mejoraron principalmente un patrón de expresión endógeno y no indujeron una expresión ectópica constitutiva (Weigel et al., 2000).

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) se trata de un virus de ADN que presenta una longitud de unos 8 kb y que presenta una secuencia completa de nucleótidos conocida (Hohn et al., 1982). Existen dos promotores identificados que son el 19S y el 35S. El promotor 35S se transcribe a partir de la cadena negativa del ADN que presenta el virus para acabar produciendo un transcrito el cual es el 35S ARN de 8kb (Guilley et al., 1982). El fragmento que se localiza en sentido ascendente de -343 a -46 del promotor 35S se encarga de gran parte de su potencia (Odell et al., 1985). Se observa en 5', 3', y mediante supresiones internas, que en sentido ascendente este fragmento puede dividirse en tres regiones activas, -343 a -208, -208 a -90, y -90 a -46, presentando las dos primeras regiones capacidad para potenciar la actividad transcripcional con la secuencia promotora 35S correcta. Además, monómeros y multímeros de un fragmento 35S (-209 a -46) son capaces de comportarse como potenciadores para incrementar los procesos de transcripción de un promotor heterólogo.

Fueron evidenciadas las secuencias de CaMV35S como verdaderos potenciadores (Fang et al., 1989). Las explicaciones que se dan a esto son debidas al genoma de *Arabidopsis*, el cual esta integrado por gran cantidad de genes (Bevan et al., 1998), además de secuencias aislantes, protegiendo así a los genes del efecto que puedan provocar en estos los potenciadores o silenciadores adyacentes (Chung et al., 1993). Otra consecuencia es que no presenta muchas zonas donde los potenciadores de CaMV35S puedan establecerse y comenzar la activación génica de los alrededores. Una tercera explicación, es que tan solo un pequeño grupo de promotores endógenos son activados por potenciadores de CaMV35S activan solo un pequeño grupo de promotores endógenos causado por la especificidad del promotor o la afinidad de este (Ohtsuki et al., 1998).

El ARN 35S también presenta el papel de intermediario para la síntesis de ADN viral mediante técnicas de transcripción inversa (Pfeiffer & Hohn, 1983). Este método de potenciación fue el escogido para realizar nuestro estudio. Otros métodos de ganancia de funciones por sobreexpresión son el etiquetado de activación y el sistema *FOX-hunting*.

Etiquetado de activación: consiste en la introducción de numerosos elementos potenciadores de la transcripción de forma aleatoria en el genoma de la planta de elección. Los genes que se encuentran próximos al área de inserción de los elementos mencionados anteriormente manifiestan aumentos en la expresión y fenotipos dominantes en ganancia de funciones (Walden et al., 1994).

La primera vez que se utilizó el etiquetado de activación se empleó para producir recursos de ganancia de función en *Arabidopsis* (Weigel et al., 2000).

Sistema FOX-hunting: en este sistema, los ADNc-fl individuales se combinan en cantidades molares similares y posteriormente se les realiza una clonación dentro de un vector de expresión en sentido descendente de un promotor fuerte. El sistema FOX-hunting se puede aplicar a diversas plantas siempre que exista disponibilidad de clones de ADNc de fl y un método de transformación que asegure una transformación exitosa (Ichikawa et al., 2006; Kondou et al., 2011).

Existe además el efecto contrario a la ganancia de funciones, como es la pérdida de funciones por sobreexpresión. En este ámbito, encontramos la tecnología de silenciamiento de genes de represores quiméricos (*CRES-T*), en la cual, el factor de transcripción es una proteína que se asocia a secuencias específicas de ADN que se localizan en regiones 5' aguas arriba de la secuencia codificante de proteínas propias de los genes diana. Se encargará de la regulación del crecimiento mediante la expresión génica y respuestas a estímulos ambientales (Riechmann et al., 2000; Zhang, 2003).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Sobreexpresión de *SnRK1* en las raíces de *Phaseolus vulgaris* y análisis funcional de *SnRK1* en condiciones de simbiosis rizobial.

2.2 Objetivos específicos

1. Validación de pH7WG2D/35S-*SnRK1* y pEARLEY104/*SnRK1::YFP* vectores binarios por PCR y la transformación de vectores binarios en *Agrobacterium rhizogenes* K599.
2. Generación de raíces pilosas transgenicas que expresan 35S-*SnRK1* o *SnRK1::YFP* en *Phaseolus vulgaris*.
3. Localización subcelular *in silico* e *in vivo* de *SnRK1::YFP* en raíces pilosas transgenicas de *P. vulgaris*.
4. Análisis por RT-PCR de raíces transgenicas para medir las transcripciones de *SnRK1*
5. Estudios de fenotipo de infección temprana (*Rhizobium*) en raíces transgenicas
6. Estudios de fenotipos de nódulos en raíces transgenicas
7. Perfiles de expresión de genes simbióticos relacionados con la vía *SnRK*.

3. Hipótesis

En plantas, las quinasas SnRK1 tienen un papel central en la señalización del azúcar y participación en la reacción redox postraduccional de la ADP-glucosa-pirofosforilasa y, por lo tanto, en la biosíntesis del almidón y el metabolismo de los carbohidratos (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009). Además, la quinasa *SnRK* está implicada en la señalización de ABA y en la fosforilación directa de varias enzimas, tales como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa fosfato sintasa, nitrato reductasa y trehalosa 6-fosfato sintasa. La *HMG-CoA* reductasa es una enzima clave en la ruta del mevalonato de la biosíntesis de isoprenoides. En *Medicago truncatula*, una *HMG-Coa* reductasa interacciona con la quinasa receptor-like DMI2 que es fundamental para la señalización de los factores de nodulación y la nodulación temprana (Kevei et al., 2007). Además, la señalización de ABA afecta a la señalización de los factores de nodulación, el desarrollo de nódulos y la fijación del nitrógeno.

Basados en los hechos presentados anteriormente, se hipotetiza que *SnRK* puede afectar a la señalización de los FN a través de la ruta de los isoprenoides o la ruta de señalización de ABA.

Por lo tanto, los genes *SnRK* pueden desempeñar un papel clave en la señalización de los factores de nodulación.

3.1 Justificación

La señalización de azúcar, TOR y ABA es llevada a cabo por los genes que se encuentran dentro de la familia *SnRK*. A través de la fosforilación, la subfamilia *SnRK1* procede a la regulación de enzimas biosintéticas, como la *HMG-CoA* reductasa, además de la sacarosa fosfato sintasa, lo que producirá la inactivación de ambas.

Se necesitan de altas cantidades de energía en forma de sacarosa en leguminosas para la formación de nódulos, esto provocará que en los nódulos se produzca la activación de genes implicados en la señalización del azúcar como son *PvTRE1* y *PvTSP9*. La quinasa encargada de la señalización que mantendrá los niveles de energía será la *SnRK1*, teniendo un papel en la activación de vías metabólicas catabólicas que desembocarán en la adquisición de energía, inhibiendo, a su vez, aquellas rutas anabólicas que consumen energía.

No obstante, no se han reportado evidencias experimentales directas sobre la función de SnRK en la simbiosis. Por lo tanto existe una necesidad urgente de comprender el papel de SnRK1 en la ruta simbiótica de los nódulos de la raíz.

Existen evidencias indirectas en estudios realizados con anterioridad en los que se muestra que, en *M. truncatula*, una *HMG-CoA* reductasa interacciona con el RLK *DMI2* y tiene un papel clave en la señalización y nodulación de FN temprana. Otro aspecto a resaltar es que la señalización de ABA influye en la señalización de los FN, la formación de nódulos y la posterior fijación del nitrógeno atmosférico. Debido a esto, las quinasas *SnRK* pueden tener un papel dentro de la señalización de los FN (Kevei et al., 2007).

A partir de las evidencias indirectas que observamos en proyectos realizados con anterioridad, se proponen una serie de preguntas biológicas a resolver, como son determinar cual es el rol de SnRK1 en la simbiosis temprana, como interviene este gen en el desarrollo de la nodulación y su rol en la maduración del nódulo.

Atendiendo a los argumentos previamente expuestos y con estas preguntas biológicas propuestas, ¿El SnRK1 participa directamente en la simbiosis leguminosa-rizobia? Si es así, ¿cuál es la función de SnRK1 durante las primeras etapas del proceso de infección rizobial? ¿Cuál es el efecto de la sobreexpresión de SnRK1 en los genes de sacarosa sintasa y ciclina durante el desarrollo de nódulos?

para responder a estas preguntas proponemos el siguiente proyecto “Caracterización funcional de la sobreexpresión de *SnRK1* en *Phaseolus vulgaris* durante la simbiosis de los nódulos de la raíz”.

4. Antecedentes

4.1 Vía simbiótica de las leguminosas

La restricción que presenta el nitrógeno en el medio en el que habitan las plantas les confirió la habilidad de formar simbiosis con bacterias presentes en el suelo que tienen la capacidad de fijar nitrógeno para evadir este problema (Mortier et al., 2012).

La nodulación comienza con un intercambio de señales planta-bacteria, iniciándose con la producción de flavonoides en la raíz de la planta, los cuales son captados por los rizobios que producirán una activación en los genes de nodulación (*nod*) y segregan los factores de nodulación (FN) (D’Haeze & Holsters 2002).

Los FN producidos son detectados en la epidermis de la raíz por las quinasas similares a receptores del tipo LysM (RLK) lo que provocarán una cascada de señalización que desencadenará la infección y una posterior división de las células corticales (Amor et al., 2003; Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Arrighi et al., 2006; Oldroyd & Downie 2008). Posteriormente, la señal es traducida por medio de la vía de simbiosis común (CSP), una vía que se comparte también con la simbiosis de hongos micorrizicos arbusculares.

En la CSP existe un aumento en la concentración de calcio característica de esta vía, lo que es inducido por genes de simbiosis comunes como son *NUP85*, *CASTOR*, *SYMRK*, *NUP133* y *POLLUX*. La función de decodificador de la señalización del calcio la presentan los genes de las quinasas de proteínas dependientes de calcio y calmodulinas (Oldroyd & Downie, 2008).

Los genes CSP operan en una vía de señalización temprana en la que se produce la estimulación de parte de los factores de transcripción tras reconocer a los simbiosis, incluidos factores transcripcionales propios de la vía de señalización de la nodulación (*NSP1* y *NSP2*) (Smit et al., 2005). Uno de estos factores transcripcionales activados, *NSP1*, se combina con promotores de los genes tempranos de la nodulina, como *NIN*, *ENOD* y *ERN1* (Hirsch et al., 2009). Lo anterior inicia la infección y la formación de nódulos primordios y nódulos (Oldroyd & Downie, 2008).

Las células del cortex comenzarán a realizar un proceso de desdiferenciación y posterior división para acabar formando un nódulo primordio (Brewin, 1991; Truchet et al., 1991; Stokkermans & Peters, 1994; Oldroyd & Downie, 2008)

El que se produzcan nódulos determinados o indeterminados dependerán de si el nódulo se origina en la corteza externa o interna de la raíz, respectivamente. Tras la formación del meristema, posteriormente se produce la formación de la zona de infección con células que incluyen hilos de infección que se encuentran en continua proliferación, desde los que se emitirán bacterias hacia el citoplasma de las células de la planta. Las bacterias estarán cubiertas por una membrana peribacteroide que organizan en simbiosomas.

En los simbiosomas se producirá finalmente la diferenciación de las bacterias en bacteroides que poseen la capacidad de fijar el nitrógeno (Mylona et al., 1995).

4.2 Transformación transitoria de *P. vulgaris* por raíces pilosas

Una gran diversidad de plantas es capaz de presentar una enfermedad inducida por la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* que causa el crecimiento de unas raíces denominadas raíces peludas. Estas raíces que se desarrollan tras la infección de *A. rhizogenes* son llamativas en el ámbito de la investigación debido a que pueden crecer *in vitro* sin la necesidad de administrar ningún tipo de fitohormona (Willmitzer et al., 1982). Por esta razón se utilizan como instrumento biotecnológico, utilizadas frecuentemente para inducir la producción, por ejemplo, de proteínas recombinantes o metabolitos secundarios (Veena & Taylor, 2007). Además, las raíces pilosas se utilizan para profundizar en interacciones como son planta-patogeno o planta-simbionte (Christey, 2001). Realizando una sustitución de su ADN dentro del plasmido *Ri* por el ADN de elección que codifique una determinada proteína, se consigue producir las proteínas deseadas.

Viendo la gran aplicación que tiene esta tecnología con vistas a investigación sugiere que siempre ha sido así, pero la realidad es que no siempre se tenían las bases técnicas que existen hoy en día para poder aprovechar esta tecnología (Veena & Taylor, 2007). A partir del protocolo propuesto de generación de raíces pilosas en *Phaseolus vulgaris* hiriendo plántulas en el nodo cotiledón con *Agrobacterium rhizogenes* y manteniéndolas en un ambiente de alta humedad (Estrada-Navarrete et al, 2007) se iniciaron alternativas de transformación/investigación para la especie *P. vulgaris*, apareciendo una amplia variedad de estudios que utilizan este protocolo.

Este método de transformación produce raíces pilosas en plantas como *Phaseolus vulgaris* y además de otras especies de *Phaseolus* con una eficiencia significativa (70-90%). Las raíces pilosas comienzan a desarrollarse de forma rápida de provocar los pinchazos en los hipocotilos de plántulas jóvenes con *Agrobacterium rhizogenes* y mantener las plantas en condiciones de alta humedad.

4.3 Genes expresados de forma específica durante la simbiosis frijol-rizobia

Recientemente se llevaron a cabo transcriptómicas comparativas de raíces de *Phaseolus vulgaris* infectados por rizobios. Se analizaron los perfiles globales de expresión génica y se evidenciaron genes únicos, observándose 2,645 (1,247 upregulated y 1,398 downregulated) unigenes que se manifestaron diferencialmente debido a la infección rizobial, comparándolo con raíces no inoculadas (Nanjareddy et al., 2017a). Complementariamente se obtuvieron a partir de este estudio perfiles de expresión cuantitativos de genes únicos y compartidos relacionados con la simbiosis rizobial.

En este repositorio se buscó los miembros recientes del gen relacionados con los rizobios, siendo en este caso específico, los integrantes de la familia *SnRK*.

4.4 Función de los genes *SnRK* en la simbiosis

El gen *SnRK* presenta una función principal en la señalización del azúcar además de estar inmerso en la activación redox postraduccional de la *ADP-glucosa- pirofosforilasa*, por lo que también participará en el metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de almidón (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009).

Cabe destacar que no solo están inmersos en las rutas anteriores, sino que además participan en la señalización de ABA y la fosforilación de enzimas como *HMG-CoA* reductasa, trehalosa-fosfato sintasa, sacarosa fosfato sintasa y nitrato reductasa. Dentro de la ruta del mevalonato, la *HMG-CoA* reductasa es una enzima de gran importancia.

En el caso de *M. truncatula*, existe una asociación fundamental para la señalización de los FN, desarrollo de nódulos maduros y la posterior fijación del nitrógeno entre la *HMG-CoA* y la quinasa similar al receptor *DMI2*. Esto indica que las quinasas *SnRK* pueden interaccionar en la señalización de los FN mediante la ruta de ABA o incluso en la ruta de los isoprenoides.

Atendiendo a otros estudios, después de aplicar un tratamiento con FN a las raíces de *M. truncatula* se incrementa el estado de fosforilación de la quinasa *SnRK1* (van Ness et al., 2016).

Es bien sabido que la quinasa *SnRK1* participa en la señalización del azúcar. La fosforilación directa de enzimas propias del metabolismo de la sacarosa es llevado a cabo por quinasas *SnRK*; son fosforiladas enzimas como la trehalosa-fosfato sintasa y la sacarosa sintasa (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009).

En el caso de los nódulos maduros, la expectativa es que los requisitos energéticos (sacarosa) sean altos para mantener las bacterias fijadoras de nitrógeno en su interior (Kavroulakis et al., 2000). Dando como resultado que genes que participan en la señalización del azúcar se activen en los nódulos funcionales. Estudios muestran como el silenciamiento del gen *PvTRE1* produce una mejora en la condición de la masa de los nódulos y en la cantidad que existe en *P. vulgaris* de bacteroides (Barraza et al., 2013). Por otro lado, el gen *PvTPS9* está implicado en la regulación en el metabolismo en los nódulos de la trehalosa. No obstante, siguen sin haber reportes experimentales directos sobre la función durante la simbiosis de las quinasas *SnRK*.

5. Metodología

5.1 Medios de cultivo

Los medios de crecimiento empleados para el cultivo de microorganismos que se emplearon durante este trabajo son:

-Medio LB (*Luria-Bertani*): Medio utilizado para el cultivo de *Escherichia coli*. Muestran una composición de triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%. Para la obtención de medio sólido es necesaria la adición de 2% de agar. A este medio se le adiciona el antibiótico bacteriostático Espectomicina cuando se desea restringir el crecimiento bacteriano.

-Medio PY (Peptona-Yeast extract): Medio utilizado para el cultivo de bacteria *Rhizobium*. Presenta una composición de peptona 0.5% y extracto de levadura 0.3%. A este medio se le adicionan 20 mg/ml de Nal (ácido nalidíxico), 50 mg/ml de Kanamicina y 700 mM/ml de CaCl₂ y se incubó a 28°C en agitación (200 rpm) durante 48 horas para un correcto crecimiento de *Rhizobium*.

5.2 Cepas de microorganismos

En los estudios recientes nosotros usamos la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599 para inducir hairy raíces pilosas en *P. vulgaris* (Najareddy et al., 2017b). Para inducir la nodulación en *P. vulgaris*, nosotros usamos la cepa *Rhizobium tropici* CIAT899 (OD₆₀₀ = 0.05).

5.3 Selección del gen candidato *SnRK* en *Phaseolus vulgaris*

Primeramente, se realizó a cabo un perfil global transcripcional de las raíces de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa colonizadas con esporas de *Rhizophagus irregularis*, o la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* (Najareddy et al., 2017a). Utilizando los datos transcriptómicos, se buscaron los genes *SnRK* que durante las condiciones simbióticas rizobiales incrementen su regulación y se seleccionó un integrante de la subfamilia *SnRK1*.

5.4 Material vegetal

Se realiza una esterilización de la superficie de las semillas *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa provenientes del Instituto de Biotecnología, UNAM, las cuales se utilizaron para la realización de todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

La esterilización de su superficie consistió en una inmersión de las semillas en etanol absoluto durante 1 minuto para la eliminación de cualquier patógeno de superficie, además de la posterior inmersión en hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos, para finalizar con tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. Se situaron las semillas en papel de filtro estéril humedecido con solución nutritiva Broughton & Dilworth (B&D) (Tabla A1), con una distancia entre ellas de 4 cm, produciéndose la germinación después de 2 días en condiciones de oscuridad a 28°C (Nanjareddy et al., 2017a).

Una vez que las semillas comenzaron a desarrollar raíz, se les inyectó *Agrobacterium rhizogenes* K599 tiene incluido el vector para inducir la formación de raíces pilosas, generando este sistema raíces pilosas de ≥ 2 cm de 10 a 12 días posteriores a la transformación (Nanjareddy et al., 2017b). Posteriormente, las plantas con raíces pilosas se transplantaron en vasos de vermiculita esteril para inocularles posteriormente *R. tropici* CIAT899 de acuerdo con Nanjareddy et al. (2017b).

5.5 Transformación de raíces pilosas en *Phaseolus vulgaris* con *A. rhizogenes*

Se realizará el protocolo de esterilización de semillas citado anteriormente hasta dejar las semillas en la charola que contendrá el papel esterilizado con solución nutritiva B&D. Una vez lista la charola, se colocarán las semillas y se incubarán a 28°C en condiciones de oscuridad, por lo que se cubrirá la charola con papel de aluminio (Nanjareddy et al., 2017b). Todo el proceso debe ser realizado en condiciones de esterilidad.

Al transcurrir dos días de incubación (Figura 2A-B), se procedió al ligero raspado de *A. rhizogenes* K599 que contiene *35S-SnRK1* con una punta de 200 μ l doblada (Figura 2C) y se añadió a un eppendorf con 200 μ l de H₂O estéril, y se inyectó en la región donde se sitúa el hipocotilo de plántulas con 2 días de germinación (Figura 2D), colocándose posteriormente en tubos de vidrio que contenían solución B&D y un segundo tubo dentro que también contiene solución B&D y se colocaron en la incubadora que presentaba un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 28°C (Figura 2E).

En las regiones donde provocamos las heridas en la inyección se originó el callo, observándose entre los días 5 y 7 (Figura 2F), formándose en este callo raíces pilosas de unos 2 cm a los 10-12 días posteriores a la inyección (Figura 2G) y consiguiente transformación. Las plantas estuvieron en una cámara de

incubación de plantas durante 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una humedad de 65% y una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Dos semanas después, se procedió a la retirada de la raíz no transgénica realizando un corte en el tallo, debajo de la región donde se localizan las raíces pilosas y por consiguiente el callo y se trasplantaron a macetas que contenían vermiculita previamente esterilizada (Figura 2). Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento con ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una temperatura de 28°C y se irrigaron con solución nutritiva B&D.

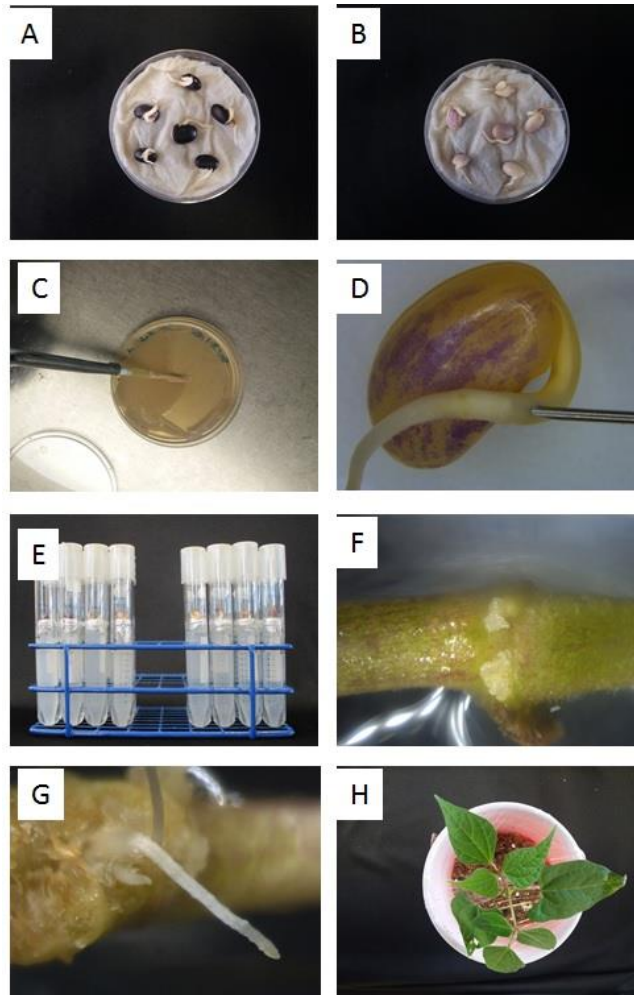


Figura 2. Proceso de transformación de raíces pilosas en *P. vulgaris* mediante inoculación de *A. rhizogenes*. **(A)** Semillas de *P. vulgaris* esteriles germinadas sobre papel filtro estéril humedecido con solución nutritiva. **(B)** Preparación de semillas esteriles para posterior inoculación. **(C)** Obtención de las bacterias de *A. rhizogenes* puestas en cultivo. **(D)** Inyección de las células bacterianas en el área del hipocótilo 2 días después de la inyección (dpiny). **(E)** Plántula de frijol en crecimiento tras la inyección con células bacterianas. **(F)** Callos formados en el sitio de la herida 5-7 dpiny. Plantas compuestas trasplantadas en vermiculita estéril. **(G)** Raíces pilosas 12 dpiny. **(H)** Plantas compuestas trasplantadas de tuvos a vermiculita estéril.

5.6 Utilización de la bacteria *Rhizobium* para la inducción de nódulos en las raíces de *P. vulgaris*

El cultivo de la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* para su correcto crecimiento es necesario para inducir nódulos radiculares en las raíces de las plantas deseadas (Nanjareddy et al., 2017b). La cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* se trata de una especie que presenta compatibilidad con el frijol común.

Partiendo de 100 ml de medio líquido PY (0.5 gr de peptona, 0.3 gr de extracto de levadura) adicionado con 20mg/ml de NaI (ácido nalidíxico), 50 mg/ml de Kanamicina y 700 mM/ml de CaCl₂, se procedió a la incubación a 28 °C en agitación a 200 rpm durante un periodo de 48 horas para un correcto crecimiento.

Cuando el cultivo presenta un crecimiento óptimo se procede a la utilización de este para la inducción de nódulos. Esto se realizará peleteando las células en una centrifuga durante 3 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y desechando el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 10 mM de MgSO₄, para posteriormente ajustar la OD de las células de rizobios a 0.05 a OD₆₀₀ por dilución con 10 mM MgSO₄. Una vez presenta una OD adecuada, se administra 2 ml de cultivo, siendo un ml en una zona de la raíz y otro ml en otra zona diferente de la raíz de las plántulas de frijol común que se encuentran en macetas con vermiculita estéril. Las plantas fueron expuestas a condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz a una temperatura de 28°C. Las plantas se humedecieron de forma constante con solución B&D con nitrógeno limitado (KNO₃ 2 mM) para incitar a la nodulación.

5.7 Ensayo histoquímico *GUS* en raíces transgénicas

Para inducir nódulos radiculares en las raíces de las plantas de interés se cultivará primeramente *Rhizobium tropici::GUS* (Se utiliza *Rhizobium tropici* debido a que presenta compatibilidad con el frijol común) en 100 mL de medio PY el cual presenta previamente una adición de 200 mg/ml de NaI (ácido nalidíxico), 50 mg/ml de Kanamicina y 700 mM/ml de CaCl₂ y se incubó a 28°C en agitación durante 48 horas a 200 rpm.

Una vez que el cultivo se encuentra con un buen crecimiento se lleva a cabo la adición de 2ml de *Rhizobium tropici::GUS* en zonas cercanas al tallo de cada planta para que comience el crecimiento de nódulos en las raíces pilosas. Las plantas se irrigarán con solución B&D en función de sus necesidades y la humedad que se observe, además, solo se le suministrará solución B&D sin nitrógeno para favorecer la necesidad de la planta por unirse con *Rhizobium* para así poder fijar nitrógeno.

En función de la rapidez con la que se necesiten las raíces para un experimento se comenzarán a obtener las raíces de las plantas, en torno a un tramo de tiempo de 3, 5, 7 o 21 días desde la inoculación

en función de que se pretenda estudiar. De 3 a 5 días post inoculación para observar los hilos de infección, 7 días post inoculación para observar los nódulos primordios y 21 días post inoculación para observar los nódulos maduros.

Para ello se lavaran las raíces hasta retirarles toda la vermiculita que contengan, para posteriormente adicionarles (en condiciones de oscuridad) un Buffer para poder analizar la actividad GUS (Tabla 1) y poder observar los estadíos de infección. Una vez adicionado el Buffer se introducirá en la incubadora en condiciones de oscuridad y a 37°C durante 12 a 16 horas.

Tabla 1. Composición del Gus Assay Buffer.

Gus Assay Buffer	Cantidad
1M K₂HPO₄	1.23 ml
1M KH₂PO₄	0.77 ml
1M dH₂O	17.18 ml
0.5M EDTA	400 µl
Triton X	20 µl
100mM K₃Fe (CN)₆	100 µl
100mM K₄Fe (CN)₆	200 µl
100mM x-Glucosa	200 µl

5.8 Extracción de ARN

Se produjo la extracción de las raíces de las plantas que se encontraban en vermiculita, necesitando dos raíces de planta con sobreexpresión de *SnRK1*, tanto inoculada con *R. tropici* como sin inocular, y las correspondientes raíces control con las que compararemos. El proceso de limpieza de las raíces en agua con el fin de retirar toda la vermiculita que quedará adherida en las raíces debía ser rápido, y, una vez lavadas las raíces se cortan del tallo y se procede seguidamente al secado de ellas para que no queden con agua que pueda congelarse cuando las almacenemos en -80°C. Una vez la raíz cortada y siendo secada el agua con papel, la guardamos dentro de papel de aluminio para posteriormente ser guardada en un termocol con hielo seco en -80°C. Además se guardó 4 morteros y 4 machacadores en -80°C también para que también estuvieran en condiciones de frío y no alteraran el ARN ni quedará pegados en ellos material vegetal en el momento de la extracción del ARN.

Cuatro días después se realizó el protocolo para la extracción de ARN de las raíces. Todos los materiales debían estar en condiciones de frío, por lo que se fue sacando cada mortero y cada raíz que hiciese falta de -80°C para que no se calentaran. En un termocol con hielo seco se introdujo los eppendorfs a utilizar, además de unas cucharas envueltas en papel de aluminio y el mortero que se utilizase en ese momento, todo para que estuviese en las mismas condiciones de temperatura.

Se comenzó con el molido de cada una de las raíces en el mortero que se encontraba sobre el hielo seco, produciéndose la acción de manera rápida para evitar que se pueda calentar la muestra y afectar al ARN o el mortero y que sea difícil retirar el material genético de él. El molido de la raíz tiene que realizarse de manera rápida e intensa hasta que la raíz quede en forma de polvo, en ese momento se trasladara con una cucharilla metálica previamente enfriada del mortero a el eppendorf, realizándose con cada una de las raíces. Cada eppendorf debe contener 100 mg de material vegetal para un correcto proceso de extracción de ARN.

Una vez los eppendorfs están preparados con el material vegetal se inicia el protocolo con el Spectrum^(TM) Plant Total RNA Kit (Sigma, Estados Unidos).

Previamente se han debido de preparar la solución de lavado 2 y la solución de lisis.

- La solución de lavado 2 se suministra como un concentrado. Antes de usarse, tiene que agregarse una cantidad adecuada de etanol al 100% a la botella de concentrado de solución de lavado 2 acorde con el protocolo.
- Una vez mezclado se almacena la solución de lavado 2 herméticamente, de forma que se evite la evaporación del etanol.
- La solución de lisis debe complementarse con 2-mercaptoetanol (2-ME) antes de su uso.
- Transferir una cantidad predeterminada de solución de lisis para limpiar el tubo cónico y agregar 10 µl de 2-ME por cada 1 ml de solución de lisis y mezclar brevemente. Cada preparación de ARN requiere 500 µl de la mezcla. Al trabajar con múltiples muestras, se necesitará alguna solución adicional para el pipeteado. Para obtener los mejores resultados, prepare la mezcla lo más cerca posible del tiempo de uso. El uso de una mezcla de solución de lisis / 2-ME más de un día después de la preparación puede resultar en una reducción en el rendimiento de ARN.
- Previo al comienzo del kit, se realiza el ensamblaje de columnas y tubo de de recogida, insertando una columna de filtración (anillo de retención azul) en un tubo de recolección de 2 ml y cerrar la tapa.
- El proceso comienza pipeteando 500 µl de la solución de lisis / 2-ME que se añadirá a los 100 mg de tejido en polvo y se agita en el vórtex de manera inmediata durante al menos 30 segundos.

- Posteriormente se incuban las muestras a 56°C (37°C) durante 3-5 minutos.
- Tras la incubación de las muestras se procede a su centrifugación a velocidad máxima durante
- Con el fin de obtener los desechos celulares, se centrifuga la muestra a la velocidad máxima en la centrifuga durante 3 minutos para sedimentar los desechos celulares, quedando así un pellet.
- Se pipetea el sobrenadante del lisado en una columna de filtración (anillo de retención azul) asentada en un tubo de recolección de 2 ml alejando la punta de la pipeta del pellet para no succionar también sedimento. Se cierra la tapa de la columna y se centrifuga a la velocidad máxima durante 1 minuto para eliminar los residuos. Guardar el lisado de flujo clarificado.
- Una vez tengamos el lisado de flujo clarificado, buscaremos unir el ARN a la columna, para ello debido a que los tejidos de las plantas pueden variar mucho en el contenido de agua y en el contenido de soluto, existen dos protocolos que se elegirán en función del tejido que tengamos.
- En este caso se utilizará un protocolo en el cual se añadirá 500 µl de solución aglutinante al lisado clarificado y se mezcla brevemente mediante el vórtex.
- Ahora se añadirán 700 µl de la mezcla a una columna de unión (anillo de retención rojo) asentada en un tubo de recolección de 2 ml. Se cierra la tapa y se procede a su centrifugación a la velocidad máxima durante 1 minuto para unir el ARN. Se decanta tras la centrifugación el líquido sobrante en un tubo para su posterior eliminación y se golpea el tubo de recolección sobre un papel absorbente limpio para eliminar los restos de líquido que puedan quedar en el tubo. Una vez nos hemos asegurado de que se eliminó el líquido de la columna, esta se devuelve al tubo de recolección y se añade el resto de mezcla que queda para centrifugarla de nuevo como en el paso anterior.
- Se procederá a pipetear 500 µl de solución de lavado 1 en la columna para posteriormente centrifugarse con la tapa cerrada durante 1 minuto. Una vez finalizada, se decanta el líquido sobrenadante y se le aplican unos golpes leves sobre papel absorbente para retirar completamente el líquido residual. Una vez terminado el proceso de eliminación del líquido, se devuelve la columna al tubo original.
- Se realizará un segundo lavado pipeteando 500 µl de la solución de lavado 2 en la columna. Se cierra la tapa y se centrifuga durante 30 segundos a velocidad máxima. Como en el paso anterior se retirará el sobrenadante y se golpeará boca abajo sobre papel absorbente para retirar todo el líquido residual, y, de la misma manera, se devolverá una vez concluido la columna al tubo de recogida.

- Se realizará un tercer lavado añadiendo otros 500 µl de solución de lavado 2 en la columna, repitiendo el paso anterior y cerrando la tapa para centrifugarlo a la velocidad máxima durante 30 segundos para posteriormente eliminar el sobrenadante y eliminar por completo el líquido residual con unos golpes sobre papel absorbente y volviendo a colocar la columna en el tubo de recogida.
- Se realiza un paso de secado mediante la centrifugación a la velocidad máxima de la columna durante 1 minuto.
- Se comenzará con la primera elución. Para ello se transfiere la columna a un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Se pipetearán 50 µl de solución de elución en el centro de la matriz de la columna, humedeciéndola, y cerrando la tapa para dejar 1 minuto de reposo desde que señaló la solución de elución. Una vez concluido el minuto, se centrifuga a la velocidad máxima durante 1 minuto para provocar la elución. El ARN purificado pasará a encontrarse en el eluido de flujo continuo y se encontrará listo para su uso o el almacenamiento a corto plazo a -20°C o un almacenamiento a largo plazo a -70°C.
- Se cuantificará la concentración de ARN que tenemos de nuestras muestras mediante la utilización de un NanoDrop® (Tabla A3). En tejidos vegetales, la relación de abasorbancia a 260 a 280 nm debe estar entre 1.8 y 2.2.
- La integridad del ARN se evaluará mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura A3).

5.9 Obtención de cDNA

- Inicialmente se necesita preparar eppendorfs con una mezcla que contenga 1 µl de Oligo dt (40 pmol), ARN dependiendo de la concentración que se tenga previamente medida por un nanodrop, en este caso 2.5 µl y por último H₂O libre de nucleasas hasta llegar a 12 microlitros, añadiéndose en este caso 8.5 µl.
- Posteriormente se mezcla y se le aplicará una breve centrifugación, una vez homogeneizado se colocará en el termociclador a una temperatura de 65°C por 15 minutos. Justo se acabe el tiempo en el termociclador, se colocarán las muestras en hielo.

- Una vez que han pasado 5 minutos en hielo las muestras, se les añadirá 4 µl de 5xBuffer, 1 µl de dNTP (10mM), 0.5 µl de enzima RT (2.5 Unidades) y por ultimo 4.5 µl de H₂O libre de nucleasas para posteriormente volver a colocar las muestras en el termociclador a una temperatura de 40°C durante una hora. Una vez terminado el tiempo en el termociclador, las muestras pasarán inmediatamente a hielo por 5 minutos.

5.10 Análisis por PCR

La amplificación de los genes diana se llevó a cabo mediante RT-PCR. Cada reacción de PCR tuvo un volumen de 20µL (0.5µL (100 ng) de cDNA de frijol, 15.5µL de agua, 2µL de 10X Roche PCR Buffer + Mg, 0.5 µL de 10 mM dNTPs Mix, 0.5µL de oligo-For. específico, 0.5 µL de oligo-Rev. específico, 0.5 µL de 1U de Taqpolimerasa Dream). Las condiciones de la PCR que se utilizaron fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 4 minutos a 94 ° C, amplificación para 28 ciclos de desnaturalización 45 segundos a 94 ° C, liquidación durante 45 segundos a 55 ° C, extensión del ciclo durante 1 minuto a 72 ° C, y extensión final durante 7 minutos a 72 ° C. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2%, se tiñó con SYBR Safe DNA Gel Stain y se visualizó bajo luz ultravioleta.

Los oligos específicos usados en este estudio se presentan en la Tabla A2

5.11 Crecimiento de *P. vulgaris* en tubos falcon

Para la observación del fenotipo de las raíces se producirá el traspaso de una planta germinada en tubos a ser colocada en un tubo Falcon. Las raíces pilosas que expresan el constructo 35S-*SnRK1* se generaron utilizando *A. rhizogenes* K599 como se describe en la sección 5.5 de materiales y métodos. A los 10 días posteriores a al germinación, se eliminaron las raíces no ultrasénicas y las plantas compuestas se transplantaron en una configuración de tubo como se muestra en la Figura 3. Las raíces pilosas se rodearán con papel de filtro y se introducirán dentro del tubo falcon, al que le añadiremos 15 ml de solución B&D con nitrógeno (5mM KNO₃), para que haya un crecimiento óptimo de las raices. Estas plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento de plantas y se cultivaron en condiciones óptimas.



Figura 3. Plantas de *P. vulgaris* creciendo en un sistema de tubos para el posterior estudio del fenotipo de las raíces.

5.12 Técnicas de microscopía

Las raíces transgénicas a las que se le aplicó el buffer GUS se les aplicó hipoclorito de sodio al 2% durante 1 hora, lo que producirá la clarificación de las mismas para que la localización de la actividad GUS a microscopio sea más precisa. Las raíces se analizan a través de un microscopio óptico (Leica, DMLB bright-field microscope, Buffalo Grove, IL, EE. UU.) con el fin de obtener el fenotipo de la simbiosis de los nódulos, incluidos nódulos primordios, los hilos de infección y las divisiones que se producen en las células corticales. Las preparaciones de las raíces transgénicas teñidas se montan en glicerol al 10% para posteriormente ser observadas en el microscopio.

Las raíces transgénicas que sobreexpresan *SnRK1* inoculadas con rhizobia *GUS* y estas muestras de las raíces fueron recogidas en diferentes tiempos y se les aplicó la tinción GUS. Se observó con un microscopio estereoscópico (Leica) mediante el cual se obtuvieron imágenes de los hilos de infección, primordios de los nódulos y los nódulos maduros. Con el fin de analizar la morfología de la raíz, se procedió al montaje con la preparación de montaje en el portaobjetos (buffer de fosfato de sodio 50 mM de pH 7.0 en glicerol al 40%). Se adquirieron con la ayuda del microscopio las imágenes del área de elongación de la raíz.

El vector *35S-SnRK1::YFP* se encuentra expresado en las raíces transgénicas por lo que se seleccionaron con la ayuda del estereomicroscopio de epifluorescencia (SZX7, Olympus, Japón),

haciendo un seguimiento de la fluorescencia que aporta el marcador proteico YFP. Esta microscopia de fluorescencia y la de campo brillante se efectuó con un microscopio Axioskop (Zeiss) o con un microscopio de barrido láser confocal LSM-510 META (Zeiss). Las imágenes confocales (planos simples o una serie de proyección en Z compuesta por 15-20 imágenes tomadas en incrementos de 1.2 μm) se procesaron utilizando el software LSM 5. Mediante un láser de argón se produjo la excitación de YFP (513 nm), captándose la fluorescencia emitida (527 nm). La actividad GUS se detectó siguiendo un método publicado con anterioridad (Jefferson, 1987).

6. Resultados

6.1 Analisis estructural y de dominio del gen *SnRK1* de *P. vulgaris*.

Para entender la estructura de la *SnRK1* de *P. vulgaris*, nosotros analizamos la distribución intron-exon y un analisis de los dominios y la estructura proteica usando herramientas bioinformáticas como Phytozome v12.1, ExPASy PROSITE y SWISS MODEL respectivamente. El gen *SnRK1* (Phvul.008G039400) presenta su ubicación en el cromosoma 8, el análisis del modelo genético mostró la existencia de 10 exones y 9 intrones, adicionalmente presenta un intron mas en 5' UTR. Presentando una longitud de 6983 pb además de una secuencia de transcripción de 2155 pb, una región 5' UTR (No traducida) de 246 pb y otra región UTR en 3' de 352 pb (Figura 4A). El gen *snrk1* codifica una proteína de 515 aminoácidos, la cual presenta una típica proteína quinasa serina/treonina, además de tres dominios, un primer dominio kinase-like, un dominio UBATS-N y un último dominio asociado a quinasa 1 (Figura 4B). La proteína de *SnRK1 P. vulgaris* muestra alta similitud con *Glycine max*, mostrando la mayor homología, con un total de 98.6% de aminoácidos similares, y compartiendo un 94.4% de similaridad con *Prunus persica*. Al observar el modelo tridimensional de *SnRK1* se observan claramente los tres dominios mencionados anteriormente (Figura 4C).

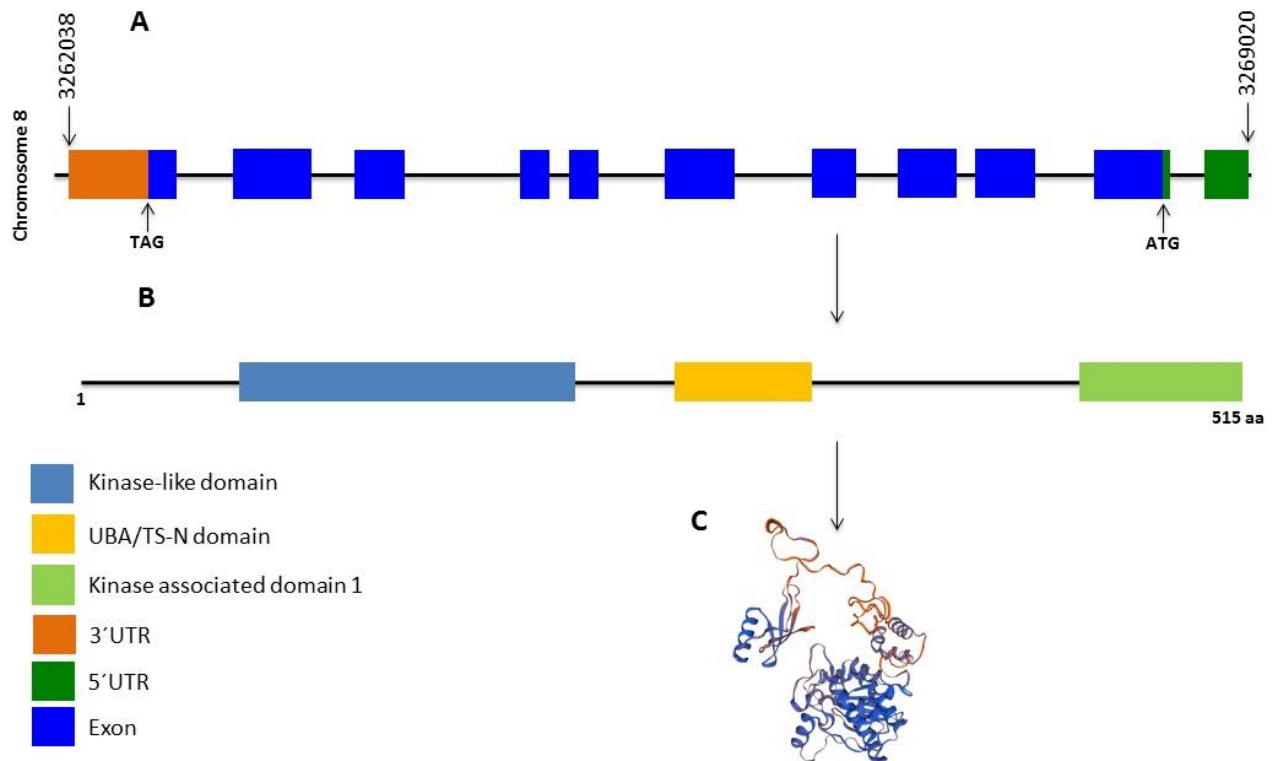


Figura 4. Esquema del gen *SnRK1* de *Phaseolus vulgaris* y la estructura de la proteína. (A), Representación esquemática de la estructura del gen *SnRK1* que muestra las UTR, 10 exones y 10 intrones en el cromosoma 8 del frijol. (B), la proteína *SnRK1* tiene la proteína quinasa Ser / Thr típica que contiene 3 dominios, como el dominio tipo quinasa (azul), el dominio UBA / TS-N (amarillo) y el dominio 1 asociado a quinasa (verde claro). aa, los aminoácidos. (C), modelado tridimensional del gen *SnRK1*.

6.2 Validación de la sobreexpresión de *SnRK1* y la localización de SnRK1 en los vectores y transformación en *A. rhizogenes*

En el proyecto actual, nosotros utilizamos dos vectores, 1) el vector binario (pH7WG2D) que sobreexpresa *SnRK1* y 2) el vector binario (pEARLEY104) que localiza la proteína SnRK1. Estas construcciones fueron clonadas en este laboratorio y trabajamos preparados para el análisis funcional. Primero se transformó pH7WG2D/35S-*SnRK1* y pEARLEY104/*SnRK1*::YFP en *A. rhizogenes* K599 separadamente. Las colonias positivas se almacenaron en stocks de glicerol en -80°C.

Aquí, nuestro objetivo fue validar ambos vectores mencionados anteriormente por PCR. Este experimento se realizó trabajando con dos bacterias, *E. coli* y *A. rhizogenes* K599, a las cuales se les extrajo los plásmidos. Se realizó la amplificación por PCR del fragmento de 1,548 pb del plásmido pH7WG2D/35S-

SnRK1 de *E.coli* (Figura 5A, columna1) y de *A. rhizogenes* (Figura 5A, columna 2) utilizando oligos específicos; Además se utilizó un vector vacío pH7WG2D como control en el plásmido de *A. rhizogenes* K599 (Figura 5A, columna 3). Similarmente para validar el vector de localización de *SnRK1*, también se emplearon estos oligos específicos, amplificándose el fragmento de 1050 pb del plásmido pEARLEY104/*SnRK1*::*YFP*, el cual se utilizará para localización, de *E. coli* (Figura 5B, columna 1) y de *A. rhizogenes* K599 (Figura 5B, columna 2). Los resultados muestran plásmidos positivos, presentando un tamaño de fragmento esperado de 1,548 pb. El plásmido positivo fue secuenciado por PCR con la ayuda de la tecnología Sanger y la utilización de oligos específicos para evidenciar la veracidad del inserto. La secuencia de pH7WG2D/35S-*SnRK1* mostró una identidad del 100% con Phvul.008G039400 (Figura A3). Debido a los resultados de nuestros experimentos, validamos las construcciones de sobreexpresión de *SnRK1* y localización y son positivos para PCR.

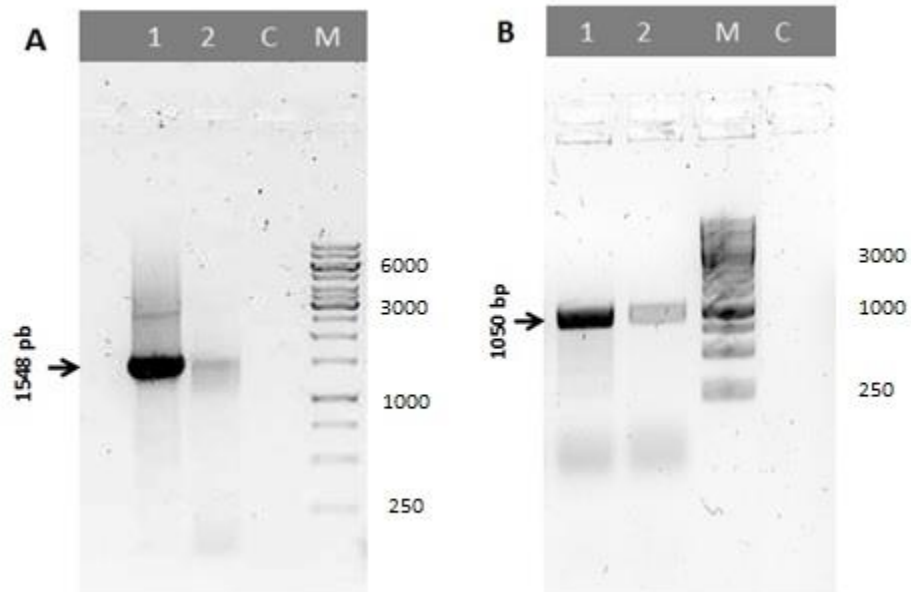


Figura 5. Amplificación por PCR del *PvSnRK1* de vectores plasmídicos. (A) Amplificación por PCR de plásmidos pH7WG2D/35S-*SnRK1* con oligos específicos de gen que muestran un fragmento de 1548 pb en plásmido de *E. coli* (Carril 1), plásmido de *A. rhizogenes* K599 (Columna 2). El carril 3 es un vector vacío de pH7WG2D (control) en el plásmido K599 de *A. rhizogenes*. (B) Amplificación por PCR del plásmido pEARLEY104/*PvSnRK1*::*YFP* con oligos genéticos específicos que muestran un fragmento de 1050 pb en el plásmido de *E. coli* (Carril 1), plásmido de *A. rhizogenes* K599 (Carril 2). El carril 4 es el vector vacío pEARLEY104 (control) en el plásmido K599 de *A. rhizogenes*. M: Marcador de peso molecular 1 kb.

6.3 Generación de raíces pilosas transgenicas que expresan sobreexpresión de *SnRK1* y *SnRK1::YFP* en *P. vulgaris*

La PCR positiva, *A. rhizogenes* K599 contiene el vector pH7WG2D/35S-*SnRK1* el cual fue inyectado al hipocotilo de la semilla germinada tras 2 días post inoculación, para inducir raíces pilosas como se menciona en el apartado 5.5 de material y métodos.

Como los resultados muestran, tras 7 días post inyección, nosotros obtenemos las raíces pilosas transformadas. Las raíces pilosas transgenicas fueron seleccionadas basandonos en el la expresión constitutiva del marcador GFP en plantas con sobreexpresión de *SnRK1* (pH7WG2D/35S-*SnRK1*) y plantas control (vector vacío) (Figura 6).

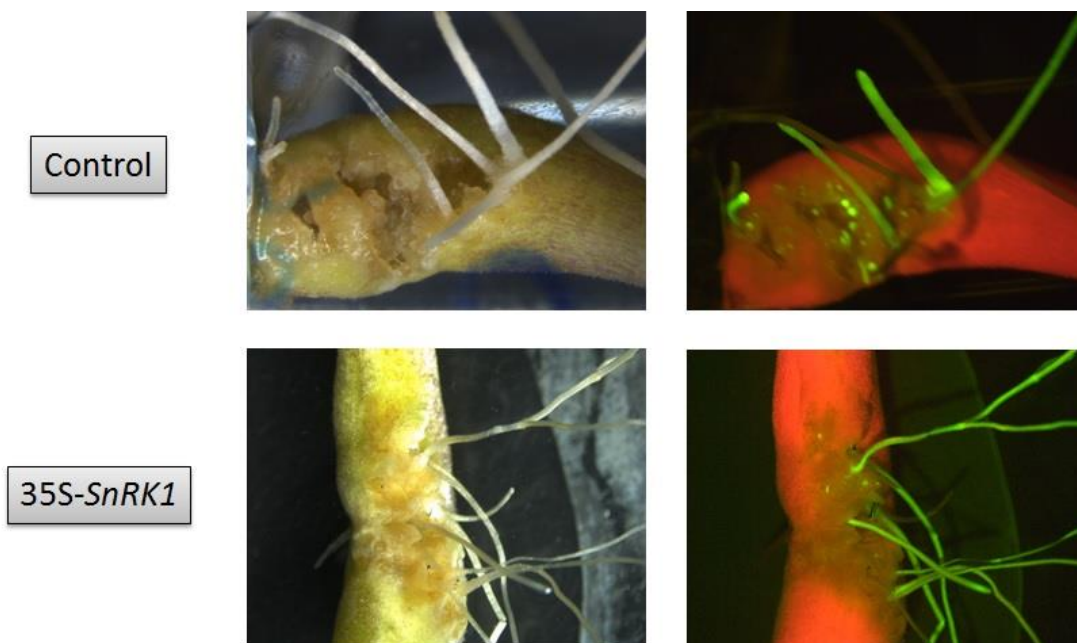


Figura 6. Raices transgenicas control y con sobreexpresión de *SnRK1* expresando el marcador GFP.

Para estudios sobre la localización, la PCR positiva, *A. rhizogenes* K599 que contiene el vector pEARLEY104/*SnRK1::YFP* fue usado para generar raíces pilosas en *P. vulgaris*. Como los resultados muestran, tras 7 días post inyección, nosotros obtenemos las raíces pilosas transformadas. Las raíces pilosas transgenicas fueron seleccionadas basandonos en el la expresión constitutiva del marcador YFP (Proteína fluorescente amarilla) en plantas que expresan el vector pEARLEY104/*SnRK1::YFP* (Figura 7).

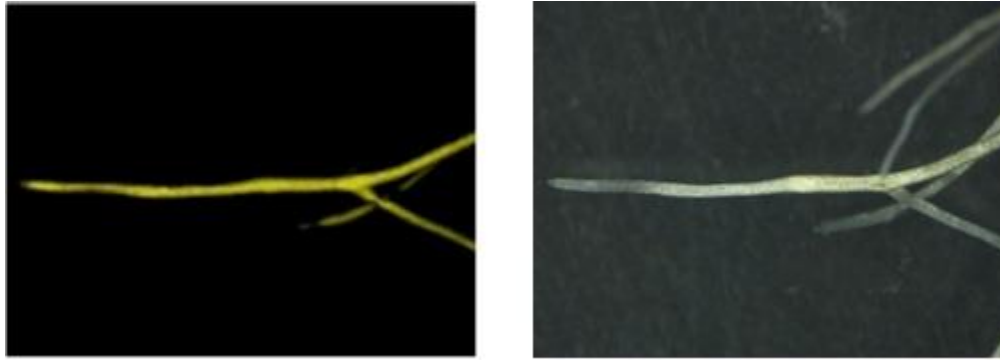


Figura 7. Raíces transgénicas expresando el marcador YFP en frijol que contienen el vector pEARLEY104/*SnRK1::YFP*.

6.4 Localización subcelular *in vivo* de *PvSnRK1::YFP* en raíces pilosas transgénicas.

La localización subcelular de la proteína SnRK1 fue analizada por experimentos *in silico* e *in vivo*. La secuencia completa de la proteína SnRK1 fue analizada por el programa CELLO v2.5 con el fin de proporcionar la predicción en cuanto a la localización subcelular usando programas *in silico* (Yu et al, 2004 y 2006).

Basado en CELLO v.2.5, la localización subcelular de la proteína SnRK1 se encuentra principalmente en el núcleo (1.967 up = unidades de predicción), seguido de mitocondrias (0.620 up), membrana plásmática (0.609 up) y citoplasma (0.601 up).

Posteriormente, para analizar la localización subcelular de SnRK1, un experimento *in vivo* fue realizado. La región codificadora *PvSnRK1* se clonó en pEarley104 (Karimi et al., 2002) para construir una fusión de YFP N-terminal, y se introdujo en las raíces pilosas de *P. vulgaris* por infección con *A. rhizogenes* K599 para determinar la localización subcelular.

Los resultados que obtuvimos con el microscopio confocal enseñan claramente que la señal fluorescente de YFP-PvSnRK1 fue fuertemente observada en núcleo, membrana plasmática y citoplasma de las raíces transgénicas de *P. vulgaris* (Figura 8). Estas observaciones en el microscopio están en consenso con el análisis *in silico* de *SnRK1* (Tabla 2).

Las raíces peludas que expresan el vector vacío sirvieron como controles. Se observó la fusión YFP-PvSnRK1 (fluorescencia amarilla) tanto en el núcleo como en la membrana plásmática y el citoplasma de las células de las raíces pilosas transgénicas de *P. vulgaris* (Figura 8B, C).

Basandonos en ambos experimentos, podemos decir que la proteína SnRK1 se encuentra distribuida en varias localizaciones subcelulares en la raíz de *P. vulgaris*.

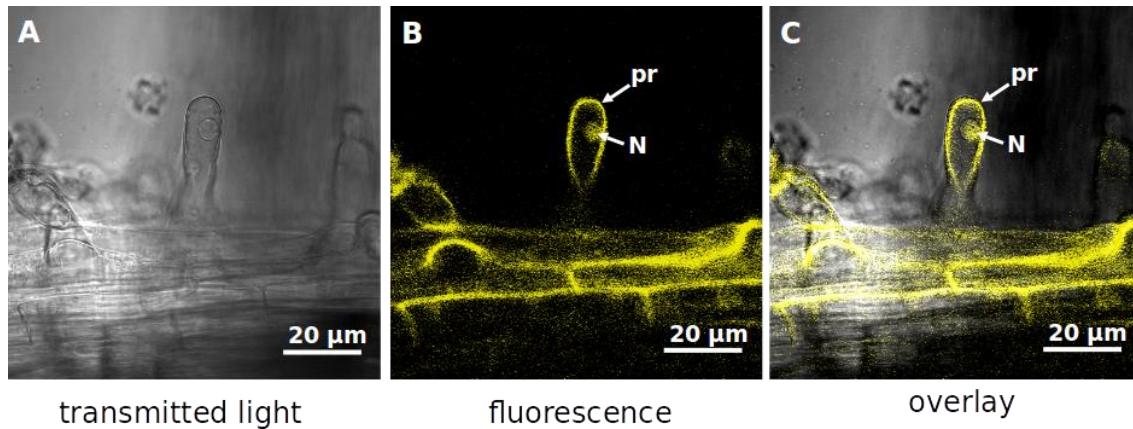


Figura 8. 1. Localización subcelular de PvSnRK1. La región de codificación *PvSnRK1* se clonó en pEarleyGate104 para construir una fusión de YFP N-terminal, y se introdujo en las raíces pilosas de *P. vulgaris* para determinar la localización subcelular. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal. (A) Imagen de la raíz con luz transmitida, (B) La construcción YFP-PvSnRK1 muestra la localización del núcleo, la membrana plasmática y el citoplasma en las raíces pilosas de *P. vulgaris*. (C) Superposición: transmite luz y fluorescencia amarilla. Pr, pelo radical; N, núcleo.

Tabla 2. Predicción sobre la localización subcelular de PvSnRK1 analizada por el programa CELLO v2.5

Localización	Unidades de predicción (up)
Nuclear	1.967
Mitocondrial	0.620
Membrana plasmática	0.609
Citoplasmático	0.601

6.5 Análisis por RT-PCR de raíces transgénicas para medir las transcripciones de *SnRK1*

Para medir los niveles de ARNm de *SnRK1*, aislamos ARN de raíces transgénicas de control y 35S-*SnRK1* en condiciones no inoculadas e inoculadas con *Rhizobium*. La RT-PCR se realizó en cDNA sintetizado a partir de ARN anterior (Tabla A3). Nuestros resultados de RT-PCR semicuantitativos muestran que las raíces pilosas transgénicas que expresan el constructo 35S-*SnRK1* revelaron un aumento en el transcrito de *SnRK1* en relación con las raíces de control en condiciones tanto sin inocular como inoculadas con *Rhizobium* (Figura 9). Los niveles de transcripción *SnRK1* se encontraron más altos en las raíces 35S-*SnRK1* inoculadas con *Rhizobium tropici* (7 días después de la inoculación) en comparación con las raíces 35S-*SnRK1* no inoculadas (Figura 9, carriles 2 y 4). Por lo tanto, confirma la expresión ectópica de *SnRK1* en las raíces transgénicas de *P. vulgaris*.

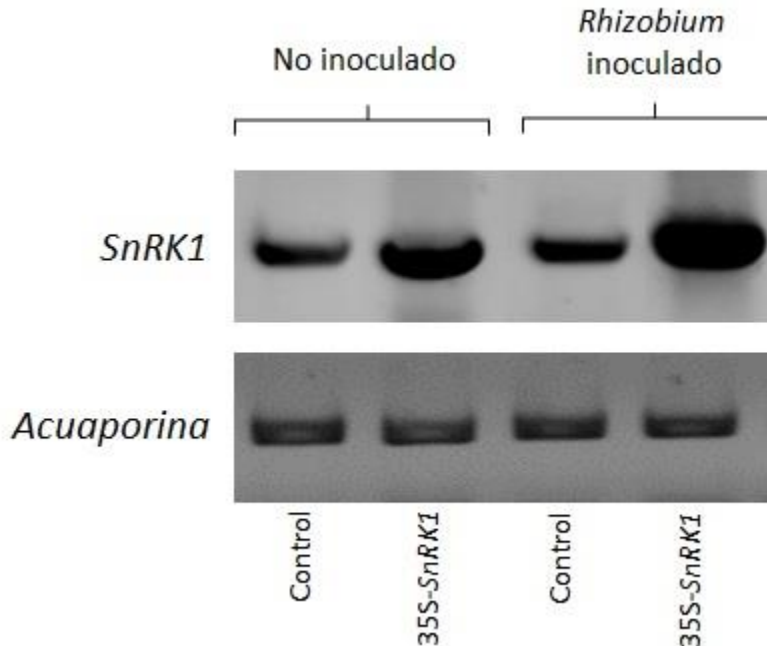


Figura 9. Análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión del ARNm de *SnRK1* en el control y raíces transgénicas 35S-*SnRK1* en condiciones no simbióticas y simbióticas de *Rhizobium*. RT-PCR se realizó en cDNA de diferentes raícesmuestras (cada muestra de raíz era un conjunto de 4 raíces transgénicas). Los niveles de ARNm de acuaporina sirven como control interno.

6.6 Estudios de fenotipo de la raíz en raíces 35S-*SnRK1* en raíces transgénicas.

Inicialmente la colonia positiva de *A. rhizogenes* K599 que lleva el plásmido pH7WG2D/35S-*SnRK1* creció frescamente en placas de medio LB sólido y se procedió a su inyección a las plántulas de *P. vulgaris* (2 días post germinación) de la forma que viene detallada en el apartado 5.5 de materiales y métodos (Figura 4). La zona donde inyectamos *A. rhizogenes* K599 lo absorbió y dio lugar (7 días tras la inyección) a callos frágiles por parte de las plantas (Figura 4E) y después de 12 días se observó el crecimiento de raíces pilosas (Figura 4F). Posteriormente, las raíces transgénicas que expresaron fluorescencia verde (GFP marcador proteico) a microscopio se seleccionaron, y se eliminaron las raíces no transgénicas (entonces, estas plantas son llamadas plantas compuestas, las cuales están compuestas por una parte silvestre y una parte transgénica, que son las raíces pilosas. Para todos los estudios

realizados utilizamos estas plantas compuestas). También se generó un conjunto de raíces pilosas control utilizando un vector vacío (*A. rhizogenes* K599 que lleva únicamente el vector pH7WG2D).

Con el objetivo de ver los efectos de la sobreexpresión de 35S-*SnRK1* en el desarrollo de las raíces, dos días posgerminación de las raíces pilosas, las plantas compuestas se transfirieron en papel de filtro y dentro de un sistema de tubos, como se describe en el apartado 5.12 de material y métodos (Figura 4). Se eliminó con cuidado las raíces no transgénicas de la planta compuesta. 10 días post trasplante de las plantas, se procedió a sacarlas de sus tubos y a realizar unas observaciones cualitativas y cuantitativas.

La longitud total de la raíz de las plantas 35S-*SnRK1* aumentó significativamente más del 96.7% en comparación con las raíces de control (Figura 10A). De manera similar, la densidad de la raíz lateral en las plantas 35S-*SnRK1* también se encontró significativamente alta en relación con los controles (Figura 10B). Las imágenes representativas de control y 35S-*SnRK1* (Figura 10D-G) apoyan los datos cuantitativos de la longitud total de la raíz y la densidad de la raíz lateral como se muestra en la Figura 10 A-B. Por otro lado, como se muestra en la Figura 10F, las raíces con sobreexpresión de *SnRK1* muestran un número significativo de raíces terciarias y cuaternarias en comparación de las raíces control (Figura 10C). Además, el peso fresco de la parte aérea en 35S-*SnRK1* eran significativamente más altos en comparación de la parte aérea de plantas control (Figura A2). Estos datos combinados sugieren que la sobreexpresión de *SnRK1* tiene un impacto significativo en el crecimiento y desarrollo de la raíz en *P. vulgaris*.

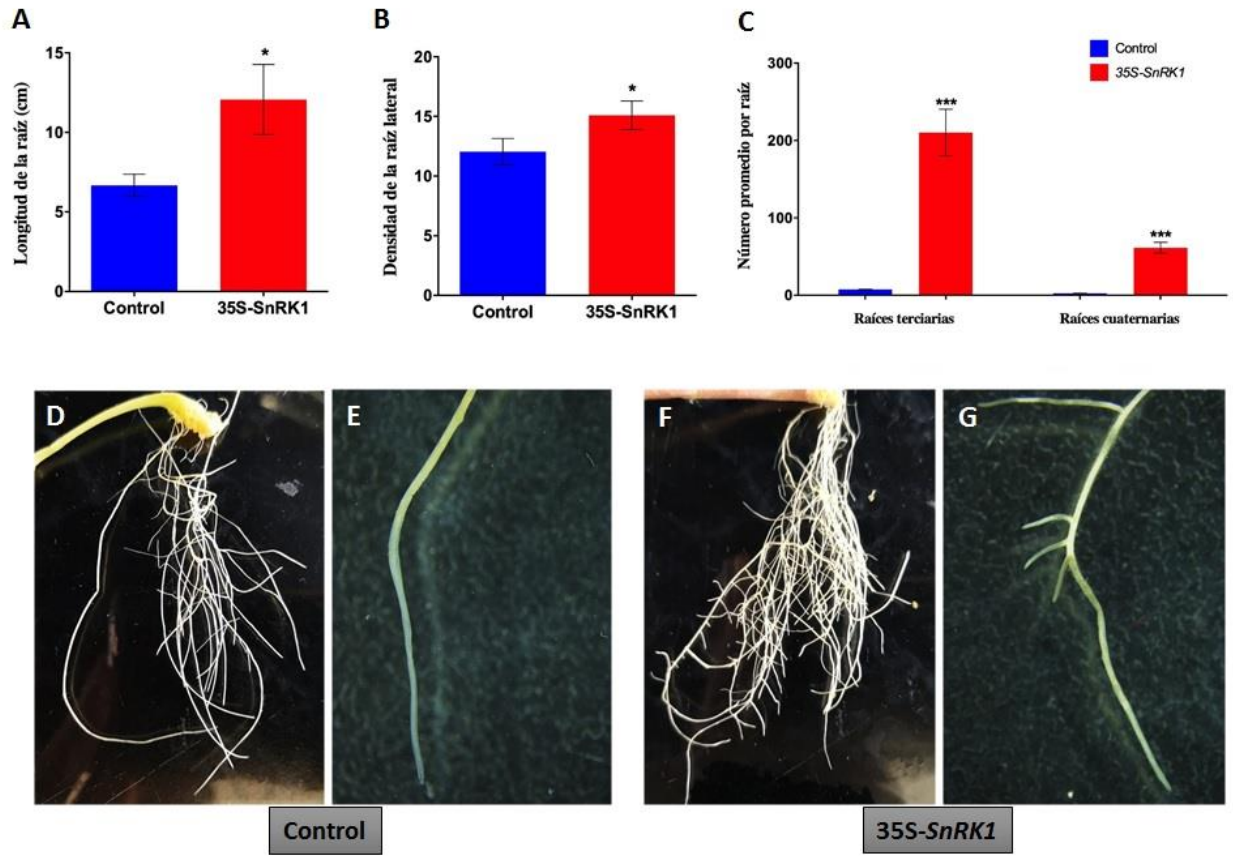


Figura 10. Diferencias entre plantas 35S-*SnRK1* y plantas control en el desarrollo de la raíz. Se observaron las raíces 10 días post crecimiento de las raíces transgénicas dentro de papel de filtro y un sistema de tubos. (A) Comparación en la longitud de las raíces entre plantas control y 35S-*SnRK1*. (B) Densidad de la raíz lateral, con valores de densidad de la raíz lateral >10 y ≤15 en las raíces pilosas control y en las que presentan sobreexpresión de *SnRK1* respectivamente. (C) Datos cuantitativos que muestran el número promedio de raíces laterales terciarias y cuaternarias en el control y 35S-*SnRK1*. (D y F) Análisis cualitativo de la densidad de la raíz en plantas control (D) y plantas 35S-*SnRK1* (F), además de las imágenes representativas (zona apical) del conteo de las raíces laterales de cada planta (E y G). La significación estadística de las diferencias entre el control y las raíces 35S-*SnRK1* se determinó utilizando una prueba *t* de Student de dos colas no pareadas (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Las barras de error representan medias \pm SEM.

6.7 Estudios de fenotipo de infección temprana (*Rhizobium*) en raíces transgénicas y nódulos.

Por otra parte, se buscó la determinación de los efectos de la sobreexpresión del gen *SnRK1* a lo largo de la simbiosis rizobial. Las plantas compuestas control y con sobreexpresión de *SnRK1* se trasplantaron en macetas con vermiculita estéril; estas plantas una vez trasplantadas a las macetas, se inocularon con un cultivo fresco de *Rhizobium tropici* que contiene un marcador GUS. Finalmente, tanto las raíces con sobreexpresión de *SnRK1* como las raíces control se les administró el ensayo histoquímico GUS. Tras el ensayo histoquímico se observó al microscopio que los pelos de la raíz que se encontraban infectados por *R. tropici* presentaban un rizamiento en su estructura.

Cinco días post inoculación, en las raíces pilosas transgénicas se mostraba una fuerte expresión de GUS en los hilos de infección y la bolsa de infección (Figura 11A, B y E). En las raíces control se evidenció un bajo número de hilos infectivos, en cambio las raíces de las plantas que presentan sobreexpresión de *SnRK1* incrementan de forma significativa en un 252% en comparación a las plantas control. Curiosamente, algunos de los hilos de infección en las raíces 35S-*SnRK1* muestran una ramificación atípica dentro de las células ciliadas de la raíz (Figura A5). Posteriormente, nosotros observamos el fenotipo de los nódulos primordios en las raíces transgénicas. Interesantemente, 5 días post inoculación, las raíces con sobreexpresión de *SnRK1* muestran buenas distinciones de los nódulos primordios (Figura 11E). Estos nódulos primordios son típicos que contengan claras divisiones de células corticales y la presencia de *rhizobium* en las células corticales en división. En esta etapa, ninguna estructura de nódulo primordio fue vista en raíces control (Figura 11D).

A los 7 días post inoculación, observamos distintivamente nódulos jóvenes en raíces con sobreexpresión de *SnRK1* (Figura 11H). Estos nódulos están presentes en todas las raíces con sobreexpresión de *SnRK1* de forma consistente. Como promedio, existe 2.9 nódulos por cada raíz transgénica de 35S-*SnRK1* (Figura 11I). Ninguna estructura de nódulos fue encontrada después de 7 días post inoculación en las raíces control (Figura 11G), esto es debido a que los nódulos normalmente aparecen tras 12 días post inoculación en frijol (Mendoza-Soto et al., 2015). Ambos resultados sugieren que la sobreexpresión de *SnRK1* regula positivamente eventos de infección, nódulos primarios y número de nódulos.

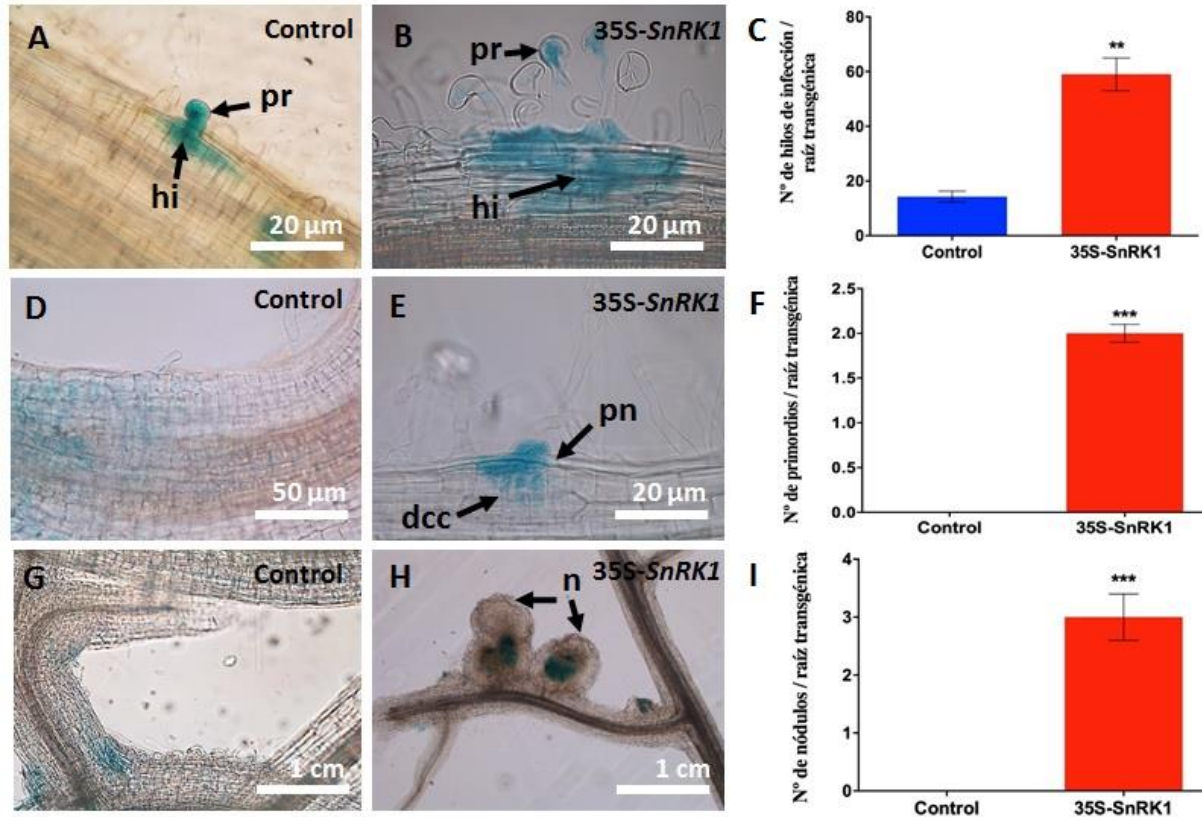


Figura 11. Las raíces pilosas transgénicas se inocularon con *R. tropici* que expresaba un marcador de b-glucuronidasa (GUS). Las raíces se tiñeron para GUS y se observaron usando un microscopio de luz a 5 dpi (A-B, D-E) y 7 dpi (G-H). A 5 dpi, las raíces transgénicas muestran una progresión de HI típica con la ramificación de las HI en el control (A) y (B) 35S-*SnRK1*. (C) Datos cuantitativos que muestran el número promedio de HI observados en las células cilindricas de la raíz y en la división de las células corticales. A 5 dpi, las raíces transgénicas que muestran nodulos jóvenes colonizaron con *R. tropici* en (H) 35S-*SnRK1*. Sin embargo, no se observaron estructuras de nodulos en el control a 7 dpi (G). (I) Datos cuantitativos que muestran el número de nodulos jóvenes de raíces transgénicas. Los valores representan los promedios de tres replicas biológicas [$n > 15$ para C, F e I]. La significación estadística de las diferencias entre el control y las raíces 35S-*SnRK1* se determinó utilizando una prueba *t* de Student de dos colas no pareadas (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Las barras de error representan medias \pm SEM. Pr, pelo radical; HI, hilo de infección; dcc, división celular cortical; pn, nódulo primordio; n, nódulos; dpi, días post inoculación.

6.8 Estudios de fenotipos de nódulos maduros en raíces transgénicas

En este estudio, evaluamos las características fenotípicas de los nódulos que sobreexpresan *SnRK1*. La mayoría de los nódulos transgénicos producidos tanto en el control como en las raíces de 35S-*SnRK1* eran de color rosa pálido (a 21 dpi), lo que indica la expresión de la leghemoglobina (Gage, 2004; Figura 12A y B). El análisis cuantitativo muestra un número significativamente alto de nódulos maduros en las

raíces transgénicas 35S-*SnRK1* en comparación con el control (Figura 12C). Las raíces 35S-*SnRK1* muestran un aumento de aproximadamente el 88,3% del número de nódulos sobre las raíces de control. La morfología de los nódulos 35S-*SnRK1* era típica como nódulos de control. Por lo tanto, estos datos sugieren que la sobreexpresión de *SnRK1* produjo un aumento en los números de nódulos.

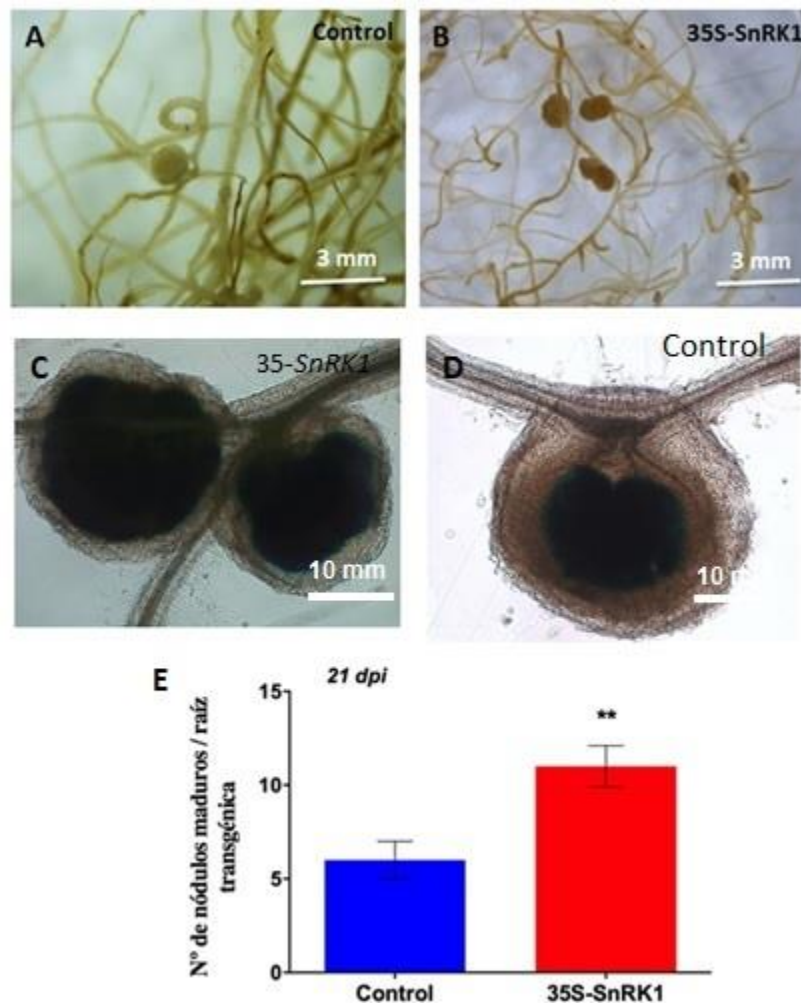


Figura 12. Análisis cuantitativo de nódulos en las raíces transgénicas de plantas compuestas de *Phaseolus vulgaris*. Una imagen representativa de (A) la raíz de control y (B) la raíz 35S-*SnRK1* que muestran nódulos maduros a los 21 días post inoculación (dpi). Imagen a mayor aumento que permite observar la estructura de los nódulos de las raíces (C) 35S-*SnRK1* y (D) Control. (E) Análisis cuantitativo del número total de nódulos maduros en el control y raíces 35S-*SnRK1*. Los datos son el promedio de dos réplicas biológicas ($n > 10$). La significación estadística de las diferencias entre el control transgénico y las raíces 35S-*SnRK1* se determinó utilizando una prueba *t* de Student de dos colas no pareada (**, $P < 0.01$). Las barras de error representan medias \pm SEM.

6.9 Expresión de sacarosa sintasa, ciclinas celulares y genes simbióticos en las raíces 35S-*SnRK1*

Por otra parte, la sobreexpresión de *SnRK1* dio como resultado un mayor crecimiento de la raíz en las raíces no inoculadas que en las raíces inoculadas con *Rhizobium*, los hilos de infección y el número de nódulos aumentaron significativamente. Sobre la base de estos hechos, medimos los niveles de ARNm de *sacarosa sintasa 1* (*SS1*), *ciclina D1* (progresión de la fase G1/S), *ciclina B1-1* (progresión de la fase G1/M) y genes simbióticos como el gen de *inicio de nodulación* (*NIN*) y *nodulina temprana 40* (*Enod 40*).

Los resultados semicuantitativos de la RT-PCR muestran que las raíces pilosas transgénicas que expresan el constructo 35S-*SnRK1* mostraron un aumento de la expresión del gen simbiótico de *NIN* y *ENOD40* en las raíces inoculadas con *Rhizobium* en relación con las raíces no inoculadas (Figura 13 Fila 1-2). Bajo las condiciones simbióticas de *Rhizobium*, *NIN* y *ENOD40* se expresan altamente en relación con las raíces de control inoculadas con *Rhizobium*. *SS1* altamente expresado en raíces sobreexpresadas en comparación con el control (Figura 13 Fila 3). *CycD1* muestra una expresión similar a pattern como *SS1*. Mientras que, *CyCB1-1* expresado en todas las muestras de raíz, sin embargo, la expresión de *CyCB1-1* fue mayor en las raíces sobreexpresadas en comparación con el control. Además, confirma que la sobreexpresión de *SnKR1* mejora los niveles de transcripción de *SS1* y ciclinas en *P. vulgaris*.

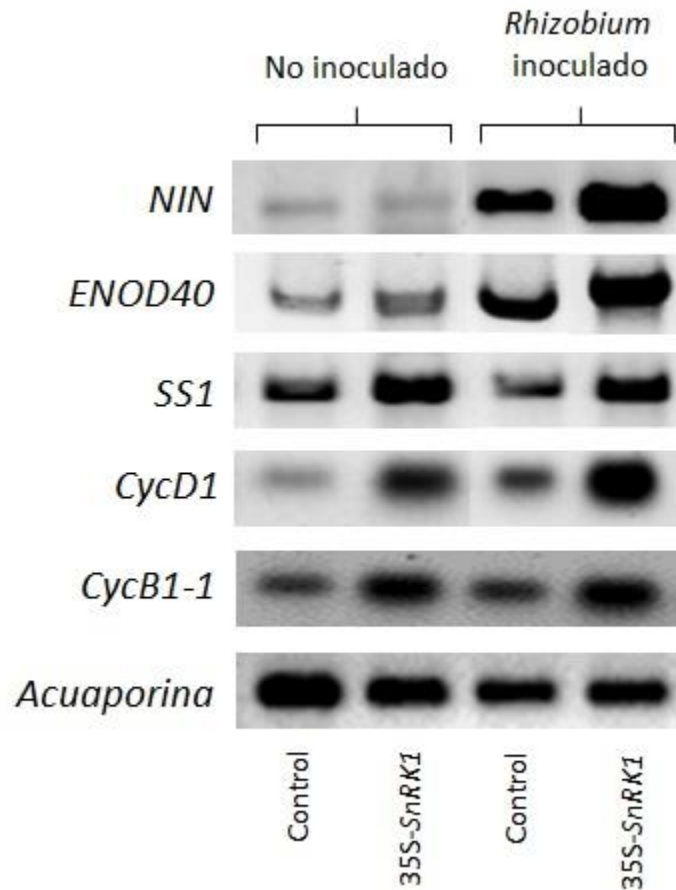


Figura 13. Análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión del ARNm de diferentes genes en el control y raíces transgénicas 35S-*SnRK1* en condiciones no inoculadas e inoculadas con *Rhizobium*. Acumulación de transcripción de *inicio de nódulo* (*NIN*), *nodulina temprana 40* (*Enod40*), *sacarosa sintasa 1* (*SS1*), *CyclinD1* (*CycD1*) y *CycB1-1*, analizadas en raíces transgénicas de 7 dpi del control y plantas 35S-*SnRK1*. Los niveles de ARNm de acuaporina sirven como control interno. La RT-PCR se realizó en cDNA de diferentes muestras de raíces (cada muestra de raíz fue un conjunto de 4 raíces transgénicas).

7. Discusión

7.1 La sobreexpresión de *SnRK1* aumenta el número de raíces laterales

La sobreexpresión de *SnRK1* en *P. vulgaris* aumentó la longitud de la raíz primaria y hubo un aumento en el número de raíces laterales. Cuando se compararon con los controles no inoculados, las plantas que expresaban en exceso *SnRK1* no inoculadas aumentaron el doble de la longitud de la raíz primaria y el número de raíces terciarias y cuaternarias aumentó de manera muy significativa. Este aumento podría deberse a la disponibilidad de condiciones nutricionales más altas y, por lo tanto, aumentar la capacidad de las células para dividirse. La expresión de un marcador visible bajo el control del promotor *SnRK1* podría mostrar actividad precisa durante la nodulación y también durante el desarrollo de las raíces laterales. El análisis de RT-PCR de ciclina demostró claramente un aumento transcripcional en *ciclina D-1*, mientras que la *ciclina B-1* muestra un aumento en el número de células meristemáticas. Las observaciones están de acuerdo con los informes anteriores en *Arabidopsis* (Baena-González et al. 2007, Hamasaki et al. 2019) donde, la sobreexpresión de *SnRK1* confiere mayor tolerancia al hambre y extensión de la vida útil, y altera la arquitectura y las transiciones del desarrollo.

7.2 La sobreexpresión de *SnRK1* incrementa el número de nódulos en *P. vulgaris*.

La interacción que se produzca entre la planta y la bacteria es clave para que la simbiosis se efectúe de forma correcta. En el área de elongación de la raíz es la zona donde se produce el primer reconocimiento planta-bacteria (Gage, 2004), concretamente en los pelos radicales, que reconocerán los factores NOD que la bacteria liberará para iniciar la etapa de infección. Existen genes que se encuentran implicados en la primera toma de contacto entre los dos organismos, activándose y silenciándose para que se pueda llevar a cabo el paso de la bacteria al interior de la raíz (Oldroyd & Downie, 2008).

En el estudio realizado, los resultados obtenidos evidencian que una sobreexpresión de *SnRK1* aumenta un significativamente el número de hilos de infección por 252% en comparación de controles en la raíz a los 5 días post inoculación con *Rhizobium*. La expresión tras la sobreexpresión de este gen evidencia la gran importancia de este en la relación simbiótica planta-bacteria.

Los rizobios debe integrarse en los pelos radiculares de la raíz, ingresando a través de la punta e iniciando así la generación de hilos de infección, los cuales ejercerán el papel de canales para los rizobios, avanzando hasta llegar al nódulo primordio donde se producirá la liberación de bacterias en las células huésped por un proceso que presenta parecido a la endocitosis (Gage, 2002). Este proceso provocará que el nódulo primordio se desarrolle a nódulo. En el interior de estos nódulos, se encontraran los rizobios en división, aumentando así su número, y, diferenciándose a su vez en bacteroides fijadores de nitrógeno.

Tras la observación en algunos pelos radiculares de la existencia de más de un hilo de infección en plantas 35S-SnRK1, se plantea la idea de que el gen DMI2 podría haberse visto activado tras la sobreexpresión de SnRK1. Trabajos previos en Medicago muestran que durante la formación de hilos de infección DMI2: GFP se localiza en puntas asociadas a la membrana plasmática y vesículas citoplasmáticas (Riely et al., 2013) que ayudan en la entrada de Rhizobium en la raíz. Como sabemos, la familia SnRK produce la regulación de enzimas como la HMG-CoA la cual producirá la activación del gen DMI2, por lo que una sobreexpresión de SnRK1 podría activar de forma anómala a DMI2 produciendo un incremento de su función, creando de esta forma más de un hilo de infección y provocando la entrada de más bacterias al pelo radical, esto quizás podría también influir tanto en la formación de nódulos antes de los ciclos normales de formación como en un mayor número de nódulos en comparación con las raíces control.

La actividad que presentaba la sobreexpresión de *SnRK1* se percibió en las divisiones mitóticas iniciales que se estaban produciendo en las células corticales, dando lugar a los nódulos primordios, que corresponden a los haces vasculares, los cuales sirven como puente entre la vasculatura del nódulo (que se encuentra en desarrollo) y el sistema vascular de la raíz.

Además se observó como en las plantas con sobreexpresión de *SnRK1* comenzaban a desarrollar nódulos tiempo antes del ciclo normal de infección, mientras que las plantas control no presentaban aun ningún nódulo, ni siquiera en formación, por lo que *SnRK1* está presente en la organogénesis de los nódulos, como podemos evidenciar gracias a la tinción GUS que tenían los rhizobios. Un informe reciente en Arabidopsis también demostró que los mutantes SnRK1 exhiben un índice mitótico más bajo que asocia directamente el papel de este gen en la regulación de la actividad proliferativa celular (Krasnoperova et al.2019).

Sabemos que la familia *SnRK* regula enzimas como la HMG-CoA la cual producirá la activación del gen *DMI2* el cual causa que se produzca el hilo de infección (Venkateshwaran et al., 2015). El silenciamiento de este gen provoca que no se produzca el hilo de infección, debido a que interacciona con los factores de nodulación; con estos conocimientos, y viendo nuestra PCR, observamos como la expresión genética es más fuerte en plantas con sobreexpresión de *SnRK1* inoculadas en comparación con las control, lo que favorecerá que se produzcan estos hilos infectivos en las raíces con mayor facilidad que en plantas control. Las raíces de las plantas 35S-*SnRK1* que en las etapas tempranas presentarán mas infecciones debido a la mayor estimulación de factores de nodulación, al desarrollar nódulos antes del tiempo normal que tarda en formarse un nódulo, harán que puedan fijar nitrógeno mucho antes y producir compuestos asimilables que otorgaran un mayor crecimiento a la planta. Además, atendiendo a genes como *NIN*, el cual produce la formación del hilo de infección, vemos como se encuentra con mayor fuerza en plantas con sobreexpresión de SnRK1, por lo que deducimos que tendrá esta sobreexpresión un efecto sobre la

expresión de este gen; de la misma manera, vemos mayor expresión del gen *Enod40*, un gen encargado de la división celular, por esta razón vemos la temprana división de las células corticales que formarán los nódulos primordios en las raíces de las plantas con sobreexpresión de *SnRK1* tras la formación de la bolsa de infección.

Una sobreexpresión de *SnRK1* podría influir sobre el gen CSP, el cual actúa en la vía de la señalización temprana, estimulando los factores transcripcionales, concretamente *NSP1*, combinándose con promotores de los genes tempranos de la nodulina como son *NIN*, *Enod* y *ERN1*, activándolos. Debido a la gran expresión de hilos de infección, nódulos primordios y nódulos maduros que muestran las raíces durante la simbiosis temprana de las plantas 35S-*SnRK1* podría tomar sentido.

Atendiendo a las ciclinas, tanto la *ciclina D1* (presente en la fase S del ciclo celular) y la *ciclina B1* (presente en la fase M) presentan una mayor expresión en sobreexpresión de *SnRK1* inoculada que en control, esto puede ser debido a las células corticales en división que presentan las raíces 35S-*SnRK1* infectadas por *R. tropici* en las etapas tempranas de simbiosis dando rápidamente como resultados nódulos primordios. Además en raíces no infectadas con *R. tropici* también existe más expresión de las ciclinas en 35S-*SnRK1* debido al gran crecimiento de raíces laterales que presentan las raíces de las plantas con sobreexpresión de 35S-*SnRK1*.

7. 3 Relación del azúcar y la sobreexpresión de *SnRK1*

Estudios previos en *Arabidopsis* han mostrado que la quinasa SnRK1 presenta un papel central en la señalización del azúcar (Jossier et al., 2009). Además la quinasa SnRK se encarga de la fosforilación de enzimas implicadas en el metabolismo de la sacarosa, entre las que se encuentran la *trehalosa 6-fosfato sintasa* y la *sacarosa fosfato sintasa* (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009). Por lo que una sobreexpresión de *SnRK1* se podría ver reflejada en aumento de azúcar disponible para la planta, la cual irá hacia tejidos demandantes, como las raíces, aumentando su tamaño en comparación a las plantas control.

La síntesis de sacarosa tiene lugar en el citosol y se lleva a cabo a partir de glucosa y fructosa que se encuentren fosforiladas, la enzima clave en la hidrólisis de sacarosa es la *sacarosa sintasa 1*, la actividad de esta podría verse incrementada debido a la sobreexpresión de *SnRK1*, debido a los altos niveles de azúcar que produce su sobreexpresión.

Los requerimientos de energía en forma de sacarosa son altos dentro de los nódulos maduros con el objetivo de sustentar a las bacterias fijadoras de nitrógeno que se encuentran dentro (Kavroulakis et al., 2000). Debido a las altas demandas hay genes encargados de la señalización del azúcar que se activan

dentro de ellos. Un gen implicado es el gen de la trehalosa 6-fosfato sintasa clase II el cual participa dentro de los nódulos en la regulación del metabolismo de la trehalosa (Barraza et al., 2016). En este trabajo podemos observar como el gen sobreexpresado de *SnRK1* se encuentra activo en los haces vasculares y células infectadas de los nódulos, potenciando el efecto de señalización de azúcares, aumentando su desarrollo.

7. 4 Desarrollo de más de un hilo de infección debido a la sobreexpresión de *SnRK1*

Tras la observación en algunos pelos radiculares de la existencia de más de un hilo de infección en plantas 35S-*SnRK1*, se plantea la idea de que el gen *DMI2* podría haberse visto afectado tras la sobreexpresión de *SnRK1*. El gen *DMI2* se encarga de producir el hueco en la membrana plasmática del pelo radicular infectado para formar el hilo de infección a través del cual pasará la bacteria. Como sabemos, la familia *SnRK* produce la regulación de enzimas como la HMG-CoA la cual producirá la activación del gen *DMI2*, por lo que una sobreexpresión de *SnRK1* podría activar de forma anómala a *DMI2* produciendo un incremento de su función, creando de esta forma más de un hilo de infección y provocando la entrada de más bacterias al pelo radical, esto quizás podría también influir tanto en la formación de nódulos antes de los ciclos normales de formación como en un mayor número de nódulos en comparación con las raíces control.

8. Conclusiones

La quinasa *SnRK1* tiene en las plantas un papel central en la señalización del azúcar y participación en la reacción redox postraducciona de la ADP-glucosa-pirofosforilasa y, por lo tanto, en la biosíntesis del almidón y el metabolismo de los carbohidratos. Además, tras lo observado, podemos decir que mediante la coincidencia entre las pruebas *in silico* e *in vivo* en plantas con el constructo pEARLEY104/*SnRK1::YFP* se pudo determinar que la proteína *SnRK1* está localizada en varias localizaciones subcelulares en la raíz de *P. vulgaris* como son núcleo, mitocondrias, membrana plasmática y citoplasma.

A los diez días postcrecimiento de las raíces transgénicas se demuestra como la sobreexpresión de *SnRK1* tiene un impacto significativo en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *P. vulgaris*. A los 5 días

post inoculación con *Rhizobium tropici* se observa como la sobreexpresión de *SnRK1* regula positivamente los efectos de infección, así como también los procesos de formación de nódulos primarios y la formación de un mayor número de estos observándose tras 7 días post inoculación. A los 10 días post inoculación podemos apreciar la variación en el número de nódulos, evidenciando el papel de fomento en el desarrollo de los nódulos al producir más y en menor tiempo que las plantas en las que no se sobreexpresó *SnRK1*.

Sobre la base de estos resultados, midiendo los niveles de ARNm de *sacarosa sintasa 1*, *ciclina D1*, *ciclina B1-1* y genes simbióticos como *NIN* y *Enod40* y se concluyó en que la sobreexpresión de *SnRK1* mejora los niveles de estos, estando este gen implicado de lleno en la simbiosis debido a la influencia que tiene sobre los genes que participan en ella.

El presente proyecto identifica el papel de *SnRK1* durante el establecimiento de la simbiosis del nódulo raíz en el frijol. Este trabajo muestra la participación de *SnKR1* en el inicio y la formación temprana de hilos de infección y también en el crecimiento y desarrollo de nódulos. El resultado de este estudio propone que *SnRK1* agudiza el proceso de nodulación en el frijol y este conocimiento puede tener una amplia aplicabilidad. La sobreexpresión de este gen producirá que exista un mayor número de nódulos en un menor tiempo, lo que junto a una mayor superficie de raíces en la que pueda albergar más nódulos, hace que la planta pueda fijar más nitrógeno y como resultado se obtengan unas mayores plantas, siendo estas más productivas. Se trata así de un proyecto ambicioso que bien aplicado en agricultura podría solucionar escasez de alimentos en zonas menos desarrolladas por problemas como pueden ser falta de terrenos cultivables. Al tener plantas más productivas se podría reducir notablemente el área de cultivo.

9. Bibliografía

- Arrighi, J. F., Barre, A., Amor, B. B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., ... & Geurts, R. (2006). The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology*, *142*(1), 265-279.
- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., ... Halford, N. G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(19), 8602–8605.
- Aragao, F. J. L., Vianna, G. R., Albino, M., & Rech, E. L. (2002). Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science*, *42*(4), 1298–1302.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., ... & Gough, C. (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal*, *34*(4), 495-506.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* *448*, 938–942.
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in plant science*, *13*(9), 474-482.
- Barraza, A., Estrada-Navarrete, G., Rodriguez-Alegria, M. E., Lopez-Munguia, A., Merino, E., Quinto, C., & Sanchez, F. (2013). Down-regulation of PvTRE1 enhances nodule biomass and bacteroid number in the common bean. *New Phytologist*, *197*(1), 194-206.
- Barraza, A., Contreras-Cubas, C., Estrada-Navarrete, G., Reyes, J. L., Juárez-Verdayes, M. A., Avonce, N., ... & Sanchez, F. (2016). The Class II Trehalose 6-phosphate Synthase Gene PvTPS9 Modulates Trehalose Metabolism in *Phaseolus vulgaris* Nodules. *Frontiers in plant science*, *7*, 1589.
- Beebe, S., Gonzalez, A. V., & Rengifo, J. (2000). Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bulletin*, *21*(4), 387-391.
- Belin, C., De Franco, P. O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J. M., Vavasseur, A., ... & Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant physiology*, *141*(4), 1316-1327.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., ... & Drost, L. (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *391*(6666), 485.

- Bohlool, B. B., & Schmidt, E. L. (1974). Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium—legume root nodule symbiosis. *Science*, 185(4147), 269-271.
- Borém, A. (2005). *Melhoramento de espécies cultivadas* (No. 631.53 BOR Mel. CIMMYT.).
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(6), 695–700.
- Boundsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biolical Chemistry*, 279, 41758-41766.
- Boudsocq, M., Droillard, M. J., Barbier-Brygoo, H., & Laurière, C. (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant molecular biology*, 63(4), 491-503.
- Blair, M. W., González, L. F., Kimani, P. M., & Butare, L. (2010). Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (Phaseolus vulgaris L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(2), 237-248.
- Brewin, N. J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annual review of cell biology*, 7(1), 191-226.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (Phaseolus spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Cárdenas, L., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P. K., & Quinto, C. (1999). Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal*, 19(3), 347-352.
- Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiology*, 123(2), 443-452
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 202-207
- Chaves-Sanjuan, A., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez-Rubio, J. M., Moreno, M., Ragel, P., Jimenez, M., ... & Albert, A. (2014). Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), E4532-E4541.

- Cheon, C.-I., Lee, N.-G., Siddique, A. B., Bal, A. K., & Verma, D. P. S. (1993). Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *The EMBO Journal*, *12*(11), 4125.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *37*(6), 687-700.
- Christou, P. (1997). Biotechnology applied to grain legumes. *Field Crops Research*, *53*(1–3), 83–97.
- Chun, J., Li, F. S., Ma, Y., Wang, S. H., & Chen, F. (2014). Cloning and characterization of a SnRK2 gene from *Jatropha curcas* L. *Genetics and Molecular Research*, *13*(4), 10958-10975.
- Chung, K. T., Jr, S. S., Lin, W. F., & Wei, C. I. (1993). Growth inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Letters in Applied Microbiology*, *17*(1), 29-32.
- Coello, P., Hey, S. J., & Halford, N. G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of Experimental Botany*, *62*(3), 883–893.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, *31*(4), 779-791.
- De Ruijter, N. C., Bisseling, T., & Emons, A. M. C. (1999). Rhizobium Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular plant-microbe interactions*, *12*(9), 829-832.
- De Velde, W., Mergeay, J., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2003). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Sesbania rostrata*. *Plant Science*, *165*(6), 1281–1288.
- D'haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, *12*(6), 79R-105R.
- Díaz, C. L., Spaink, H. P., & Kijne, J. W. (2000). Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(3), 268-276.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... others. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(12), 1385–1393.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Guillén, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., ... Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, *2*(7), 1819–1824.

- Emanuelle, S., Doblin, M. S., Stapleton, D. I., Bacic, A., & Gooley, P. R. (2016). Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1. *Trends in Plant Science*, 21(4), 341–353.
- Fang, R. X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S., & Chua, N. H. (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *The Plant Cell*, 1(1), 141-150.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *FAOSTAT statistics database*. Obtenido de <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>
- Fujii, H., & Zhu, J. K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8380-8385.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., ... & Kobayashi, M. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2123-2132.
- Franklin, C. I., Trieu, T. N., Cassidy, B. G., Dixon, R. A., & Nelson, R. S. (1993). Genetic transformation of green bean callus via Agrobacterium mediated DNA transfer. *Plant Cell Reports*, 12(2), 74–79.
- Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. *SIDA, Botanical Miscellany*
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
- Gelvin, S. B. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant biology*, 51(1), 223-256.
- Geurts, R., & Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S239-S249.
- Grant, J. E., Dommissé, E. M., Christey, M. C., & Conner, A. J. (1991). Gene transfer to plants using Agrobacterium. *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, 73.
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2004). The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in Arabidopsis. *Plant physiology*, 134(3), 919-926.

- Guilley, H., Dudley, R. K., Jonard, G., Balázs, E., & Richards, K. E. (1982). Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*, 30(3), 763-773.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J. K. (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell*, 13(6), 1383-1400.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.-P., Gong, D., Halfter, U., & Zhu, J.-K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 3(2), 233–244.
- Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3735-3740.
- Halford, N. G. (2005). Regulation of carbon and amino acid metabolism: Roles of sucrose nonfermenting-1-related protein kinase-1 and general control nonderepressible-2-related protein kinase. *Advances in botanical research*, 43, 93-142.
- Halford, N. G., & Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, 419(2), 247 LP-259.
- Hamasaki H, Kurihara Y, Kuromori T, Kusano H, Nagata N, Yamamoto YY, Shimada H and Matsui M (2019) SnRK1 Kinase and the NAC Transcription Factor SOG1 Are Components of a Novel Signaling Pathway Mediating the Low Energy Response Triggered by ATP Depletion. *Front. Plant Sci.* 10:503.
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience*. 13, 2408-2420.
- Hey, S., Mayerhofer, H., Halford, N. G., & Dickinson, J. R. (2007). DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10472-10479.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 21(2), 545-557.
- Hohn, T. (1982). Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 96, 194-236.

- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). Phaseolus vulgaris—Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1205–1215.
- Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H., Kondou, Y., ... & Fujita, M. (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *The Plant Journal*, 48(6), 974-985.
- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387–405.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., & Li, X. (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant*, 6(2), 275-286.
- Jiang, R., & Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and cellular biology*, 17(4), 2099-2106.
- Jones, A. L. (1999). Phaseolus bean: Post-harvest operations. *Post-harvest compendium*. (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome).
- Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., ... & Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 59(2), 316-328.
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, 7(5), 193-195.
- Kavroulakis, N., Flietakis, E., Aivalakis, G., & Katinakis, P. (2000). Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Molecular plant-microbe interactions*, 13(1), 14-22.
- Kevei, Z., Loughon, G., Mergaert, P., Horváth, G. V., Kereszt, A., Jayaraman, D., ... & Kondorosi, A. (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in Medicago truncatula. *The Plant Cell*, 19(12), 3974-3989.
- Krasnoperova O. E. & D. D., Buy & I.I., Goriunova & Isayenkov, Stanislav & Karpov, Pavel & Blume, Yaroslav & Yemets, Alla. (2019). The Potential Role of SnRK1 Protein Kinases in the Regulation of Cell Division in Arabidopsis thaliana. *Cytology and Genetics*. 53. 185-191. 10.3103/S0095452719030022.

- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., & Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1--related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant Cell*, *16*(5), 1163–1177.
- Koenig R, Gepts P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of diversity. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989, *78*: 809–817. DOI: 10.1007/BF00266663
- Kolukisaoglu, Ü., Weigl, S., Blazevic, D., Batistic, O., & Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, *134*(1), 43–58.
- Kondou, Y., Higuchi, M., Ichikawa, T., & Matsui, M. (2011). Application of full-length cDNA resources to gain-of-function technology for characterization of plant gene function. In *cDNA Libraries* (pp. 183-197). Humana Press.
- Kumar, S., & Fladung, M. (2001). Controlling transgene integration in plants. *Trends in plant science*, *6*(4), 155-159.
- Kulik, A., Wawer, I., Krzywińska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics: a journal of integrative biology*, *15*(12), 859-872.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grissem, W., & Luan, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(8), 4718–4723.
- Lee, N.-G., Stein, B., Suzuki, H., & Verma, D. P. S. (1993). Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *The Plant Journal*, *3*(4), 599–606.
- Li, L.-B., Zhang, Y.-R., Liu, K.-C., Ni, Z.-F., Fang, Z.-J., Sun, Q.-X., & Gao, J.-W. (2010). Identification and bioinformatics analysis of SnRK2 and CIPK family genes in sorghum. *Agricultural Sciences in China*, *9*(1), 19–30.
- Liu, J., & Zhu, J. K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, *280*(5371), 1943-1945.
- Ljunggren, I., & Fåhræus, G. (1961). The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. *Microbiology*, *26*(3), 521-528.
- Luan, S. (2009). The CBL--CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, *14*(1), 37–42.

- Lugtenberg, B. J. J. (1989). Root lectin as a determinant of host—plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. *Nature*, 338, 13.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., ... & Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425(6958), 637.
- Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., & Jing, R. (2009). TaSnRK2. 4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 61(3), 683-696.
- Mariotti, D., Fontana, G. S., & Santini, L. (1989). Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *J Genet Breed*, 43, 77–82.
- Mendoza-Soto, A. B., Naya, L., Leija, A., & Hernández, G. (2015). Responses of symbiotic nitrogen-fixing common bean to aluminum toxicity and delineation of nodule responsive microRNAs. *Frontiers in plant science*, 6, 587.
- Mitchell, K. I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., ... & Kemp, B. E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2361-2364.
- Mortier, V., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 245-258.
- Murray, J. D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(6), 631-639.
- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 7(7), 869.
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., ... & Shinozaki, K. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2. 2, SRK2E/SnRK2. 6/OST1 and SRK2I/SnRK2. 3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1345-1363.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Gómez, B. M., Blanco, L., & Lara, M. (2017a). Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PloS one*, 12(8), e0182328.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Aguirre, A. L., Gómez, B. M., & Lara, M. (2017b). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in the common bean. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), e56140.

- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M. K., Alvarado-Affantranger, X., Quinto, C., Sánchez, F., & Lara, M. (2016). A legume TOR protein kinase regulates rhizobium symbiosis and is essential for infection and nodule development. *Plant physiology*, 172(3), 2002-2020.
- Nguyen, T., & Sticklen, M. (2012). Genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with the gus color marker, the bar herbicide resistance, and the barley (*Hordeum vulgare*) HVA1 drought tolerance genes. *International Journal of Agronomy*, 2012.
- Odell, J. T., Nagy, F., & Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313(6005), 810.
- Ohtsuki, S., & Levine, M. (1998). GAGA mediates the enhancer blocking activity of the eve promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes & development*, 12(21), 3325-3330.
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519–546.
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics MGG*, 190(2), 204–214.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., & Tempé, J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(2), 245–250.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Pfeiffer, P., & Hohn, T. (1983). Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell*, 33(3), 781-789.
- Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 458-467.
- Quandt, H. J., Pühler, A., & Broer, I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 6(6), 699–706.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Grønlund, M., ... & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585.

- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., ... & Creelman, R. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105-2110.
- Riely BK, Larrainzar E, Haney CH, Mun JH, Gil-Quintana E, González EM, Yu HJ, Tricoli D, Ehrhardt DW, Long SR, Cook DR. (2013) Development of tools for the biochemical characterization of the symbiotic receptor-like kinase DMI2. *Mol Plant Microbe Interact*. 26(2):216-26.
- Sergeevich, S. A., Alexandrovich, Z. V., Yurievna, S. O., Yurievich, B. A., & Anatolievich, T. I. (2015). Nod-Factor Signaling in Legume-Rhizobial Symbiosis. In *Plants for the Future*. IntechOpen.
- Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45(3), 379-396.
- Singh, S. P., & Munoz, C. G. (1999). Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Science*, 39(1), 80-89.
- Singh, S. P. (1999). Integrated genetic improvement. *Common bean improvement in the twenty-first century* (pp. 133-165). Dordrecht: Springer.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *Atlas Agroalimentario 2012-2018*. Obtenido de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018.
- Shen, W., Reyes, M. I., & Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant physiology*, 150(2), 996-1005.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308(5729), 1789-1791.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., ... & Vymyslický, T. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104.
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 29-43.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R.-J., Chiurazzi, M., & Gresshoff, P. M. (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 48(7), 1357-1365

- Smeeckens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology*, 13(3), 273-278.
- Solís-Ramos, L. Y., Ortiz-Pavón, J. C., Andrade-Torres, A., Porrás-Murillo, R., Brenes-Angulo, A., & de la Serna, E. C. (2019). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) var. Brunca. *Revista de Biología Tropical*, 67(2 SUPL), S83-S94.
- Sugden, C., Crawford, R. M., Halford, N. G., & Hardie, D. G. (1999a). 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. *The Plant Journal*, 19(4), 433-439.
- Sugden, C., Donaghy, P. G., Halford, N. G., & Hardie, D. G. (1999b). 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 physiology*, 120(1), 257-274. (b)
- Shen, W., & Hanley-Bowdoin, L. (2006). Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1-and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant physiology*, 142(4), 1642-1655.
- Shen, W., Reyes, M. I., & Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant physiology*, 150(2), 996-1005.
- Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., Jez, J. M., & Schachtman, D. P. (2007). Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2. 8 reveals a connection to metabolic processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6460-6465.
- Shi, J., Kim, K. N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., ... & Kudla, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *The plant cell*, 11(12), 2393-2405.
- Stokkermans, T. J., & Peters, N. K. (1994). Bradyrhizobium elkanii lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on Glycine soja Siebold et Zucc. *Planta*, 193(3), 413-420.
- Tepfer, D. (1990). Genetic transformation using Agrobacterium rhizogenes. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 140-146.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G., & Geigenberger, P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal*, 35(4), 490-500.

- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., ... & Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, *351*(6328), 670.
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004). SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17306–17311.
- Van Ness, L. K., Jayaraman, D., Maeda, J., Barrett-Wilt, G. A., Sussman, M. R., & Ané, J. M. (2016). Mass spectrometric-based selected reaction monitoring of protein phosphorylation during symbiotic signaling in the model legume, *Medicago truncatula*. *PLoS one*, *11*(5), e0155460.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*(5), 383-403.
- Venkateshwaran M, Jayaraman D, Chabaud M, Genre A, Balloon AJ, Maeda J, et al. A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. Epub 2015/07/23. pmid:26199419.
- Walden, R., Fritze, K., Hayashi, H., Miklashevichs, E., Harling, H., & Schell, J. (1994). Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant molecular biology*, *26*(5), 1521-1528.
- Wang, L., Hu, W., Sun, J., Liang, X., Yang, X., Wei, S., ... & He, G. (2015). Genome-wide analysis of SnRK gene family in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of BdSnRK2. 9. *Plant Science*, *237*, 33-45.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blázquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., ... & Nguyen, J. T. (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *122*(4), 1003-1014.
- Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E., & Schell, J. (1982). DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Molecular and General Genetics MGG*, *186*(1), 16-22.
- Ying, S., Zhang, D. F., Li, H. Y., Liu, Y. H., Shi, Y. S., Song, Y. C., ... & Li, Y. (2011). Cloning and characterization of a maize SnRK2 protein kinase gene confers enhanced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, *30*(9), 1683-1699.
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., & Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(28), 26146-26158.

- Yu, C. S., Lin, C. J., & Hwang, J. K. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein science*, 13(5), 1402-1406.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Zhang, J. Z. (2003). Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 430-440.

10. Anexos

10.1 Figuras Anexo

>Phvul.008G039400

```
TGGTAATAACGCATTAAAAATAGATGGTTTAGAATTAGAATCCAACGATTAGCCAAAGCATCTGAGATTGAAACGCACCGTCTTTG
TCGCGTAATAGCATCGCTGACGCAGAAGCAAACATCGAAGGAGAACCGGATGCTTTGTTCCCTCTTTGTTCTTCCTCTTTCTAAATT
TCAACTTTAGGGTTCTTTTAATCTCAACGTTCCCTCAATCTCAAGCTCCGTTCACTCCAACAACACTCCGAAATGGACGGACCAG
CTGGCCGAGGTGGTGGCTGGACATGTTTACCAAATTATAAATTGGGAAAAACTCTTGGGATTGGATCTTTTGGCAAGGTGA
AAATTGCAGAACATGTATTGACTGGTCATAAGGTTGCAATCAAGATCCTTAATCGGCGCAAGATAAAGAGCATGGAAATGGAGAAA
AAGTGAGAAGAGAAATCAAAATCTTAAGATTATTCATGCATCCTCACATTATACGACTTTATGAAGTCATAGAACTCCATCTGACA
TATATGTTGTTATGGAGTATGTGAAATCTGGAGACTCTTTGATTACATAGTAGAGAAGGGTAGGTTGCAGGAAGATGAAGCCGTA
ATTTTTTCAACAGATAATCTCTGGTGTGGAGTACTGTACAGAAATATGGTGGTTCATAGAGATTTGAAGCCTGAGAATTTACTTT
TGGACTCCAATGTAATGTCAAGATTGCTGATTTGGCTTGAGCAACATCATGCGTGATGGTCACTTTCTCAAAACCAGTTGTGGAA
GCCCTAATTATGCAGCTCCCGAGGTTATCTCCGGGAAATTGTATGCTGGACCTGAAGTGGATGTCTGGAGCTGTGGTGTAAATTTAT
ATGCTCTTCTTTTGGTACTCTCCCTTTGATGATGAAAACATCCCAATCTCTTCAAGAAGATAAAGGGTGGGATATACACCCCTC
CCAGTCATCTATCACCTGGTGTAGGGATTTGATACCAGGGATGCTTGTGGTTGATCCTATGAGGAGAATGACCATACTGAGATCC
GTCAACACCCATGGTTCCAAGCTCGTCTTCCACGTTATTTAGCTGTGCCCCACCAGATACATTGCAACAGGCCAAAAAGATTGATG
AGGAGATCCTTCAGGAAGTGGTGAAGATGGGATTTGACAGGAATCAATTGGTTGAATCTCTTCGGAACAGGATACAAAATGAGGGTA
CTGTAGCATACTATTTGTTATTGGACAATCGATTCCGTTGTTCCAGTGGTTATCTTGGGGCTGAGTTTCAGGAGTCCATGGATTCCA
GTTTTAACCAAAATGCACCTCAGTGAAGTTGCTTCTCAGTTGTTGGACAACGCTTTCCAGGCTATATGGATTATCCAGGAGTAGGAT
CGAGGCCACAGTTCCCTGTTGAAAGGAAATGGGCCCTTGGTCTCAGTCTCGAGCCATCCTAGAGAAATAATGACAGAGTCCCTTA
AAGCTTTGCAAGAGTTAAATGTTTGTGGAAAGAAAATAGGACACTACAACATGAAGTGCAGGTGGGTTGCTGCCATTTCCCGTCTC
ACGAAGGAATGGTTAACATAATGTGCATAGTAACCATTACTTTGCAGATGATTCACAATTTATTGAGAACGAAGCTGTTTCTACTA
CTTCAAACGTGGTCAAATTTGAAGTGCAGCTTTACAAAACCTCGGAAGAAAAGTATCTGCTTGATCTTCAAAGGGTGCAGGGCCAC
AGTTTCTTTTCTGGATCTGTGTGCTGCTTTCCCTTGACAGCTTCGTGTCCCTCAGCAAAGAGCTTAGGATCACAAGAGACTTGA
ATATGCCTTGTGTTTATGTGAATAAGCTTTCAATGTACATACAAGTATATTTCTGTCCGAGCGAATCCTCCGGTACCCGTTTTTC
TTTGGGTAACATTATAATGAGCCAATCCTAAATATGGGATTTGCTTCATTAACAATGGTGTCAACTAGTTGTTCCTATCTCTTGG
TCATTTAAAAAATTAGTCCCAACTGACAGTGATATGTATGATTTTCAACCAAGTGCTGTAATGACTGTTCCCTATTTGGAAGGATG
CTAGGCTGCCTCTAACTTTTGCAGATTATCTCTTGTATCCTATAAATCTAATTTACATA
```



Figura A1. Secuencia genómica del gen *SnRK1* (Phvul.008G039400). La secuencia incluye ATG, 5'UTR, TAG y 3'UTR.

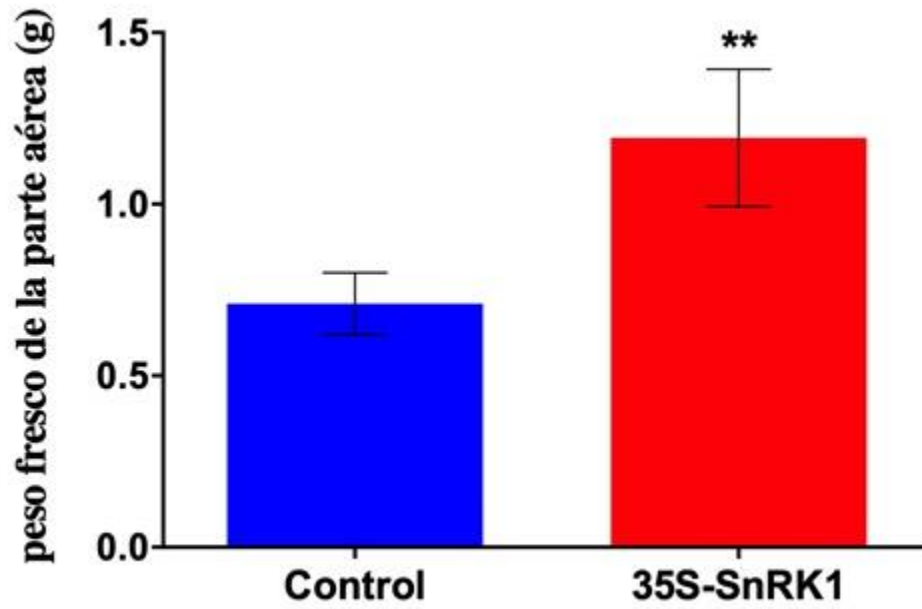


Figura A2. Diferencias de peso (en gramos) de la parte aérea en plantas con sobreexpresión de SnRK1 y plantas control. La significación estadística de las diferencias entre el control y las raíces 35S-SnRK1 se determinó utilizando una prueba *t* de Student de dos colas no pareadas (** $P < 0.01$). Las barras de error representan medias \pm SEM.

Results for job muscle-I20190518-051236-0679-79330507-p2m

[Alignments](#)
[Result Summary](#)
[Phylogenetic Tree](#)
[Submission Details](#)

[Download Alignment File](#)
[View result with Jalview](#)
[Send to Simple Phylogeny](#)
[Send to MView](#)

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8); 100% identity

```

pH7WG2D/35S-SnRK1      ATGGACGGACCAGCTGGCCGAGGTGGTGTGGCTGGACATGTTCTACCAAATTATAAA
Phvu1.008G039400.1     ATGGACGGACCAGCTGGCCGAGGTGGTGTGGCTGGACATGTTCTACCAAATTATAAA
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      TTGGGAAAAACTCTGGGATTGGATCTTTTGGCAAGGTGAAAATTGCAGAACATGTATTG
Phvu1.008G039400.1     TTGGGAAAAACTCTGGGATTGGATCTTTTGGCAAGGTGAAAATTGCAGAACATGTATTG
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      ACTGGTCATAAGGTTGCAATCAAGATCCTTAATCGGCAGATAAAGAGCATGGAAATG
Phvu1.008G039400.1     ACTGGTCATAAGGTTGCAATCAAGATCCTTAATCGGCAGATAAAGAGCATGGAAATG
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      GAAGAAAAAGTGAGAAGAGAAATCAAAATCTTAAGATTATTCATGCATCCTCACATTATA
Phvu1.008G039400.1     GAAGAAAAAGTGAGAAGAGAAATCAAAATCTTAAGATTATTCATGCATCCTCACATTATA
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      CGACTTTATGAAGTCATAGAACTCCATCTGACATATATGTTGTTATGGAGTATGTGAAA
Phvu1.008G039400.1     CGACTTTATGAAGTCATAGAACTCCATCTGACATATATGTTGTTATGGAGTATGTGAAA
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      TCTGGAGAGCTCTTTGATTACATAGTAGAGAAGGGTAGGTTGCAGGAAGATGAAGCCCGT
Phvu1.008G039400.1     TCTGGAGAGCTCTTTGATTACATAGTAGAGAAGGGTAGGTTGCAGGAAGATGAAGCCCGT
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      AATTTTTTCAACAGATAATCTCTGGTGTGGAGTACTGTCACAGAAATATGGTGGTTCAT
Phvu1.008G039400.1     AATTTTTTCAACAGATAATCTCTGGTGTGGAGTACTGTCACAGAAATATGGTGGTTCAT
.....

pH7WG2D/35S-SnRK1      AGAGATTTGAAGCCTGAGAATTTACTTTTGGACTCCAAATGTAATGTCAAGATTGCTGAT
Phvu1.008G039400.1     AGAGATTTGAAGCCTGAGAATTTACTTTTGGACTCCAAATGTAATGTCAAGATTGCTGAT
.....
    
```

Figura A3. Resultados de alineación de la secuencia de pH7WG2D/35S-*SnRK1* y Phvu1.008G039400. El plásmido pH7WG2D/35S-*SnRK1* se secuenció utilizando la tecnología Sanger y se alineó con la secuencia del gen original utilizando la herramienta en línea <https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/>. La secuencia se encontró con una identidad del 100 %.

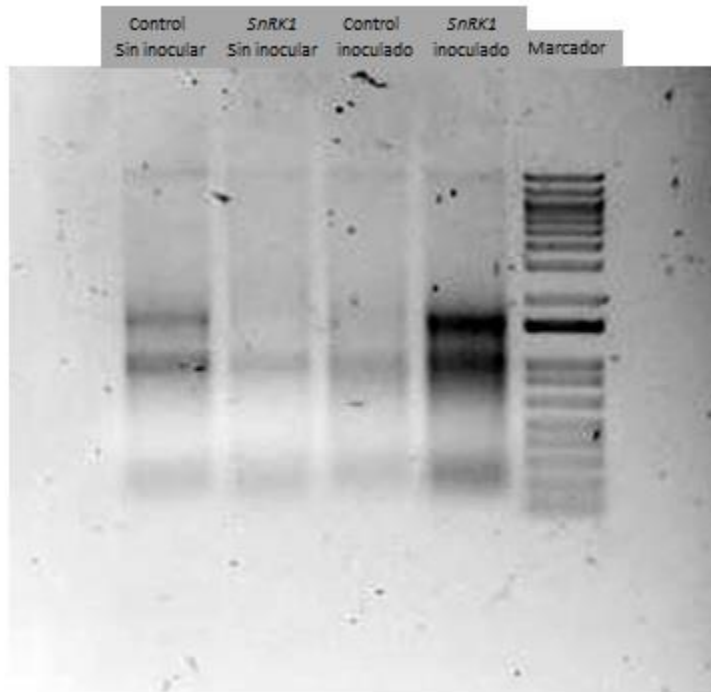


Figura A4. Resultado de la electroforesis de un gel de agarosa con el objetivo de comprobar la integridad del ARN.



Figura A5. Ramificación atípica del hilo de infección a lo largo del pelo radicular en raíces de plantas 35S-SnRK1.

10.2 Tablas Anexo

Tabla A1. Composición de la solución nutritiva B&D.

Solución		Molaridad Final (μM)	Fórmula
A	Ca	1000	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
B	P	500	KH_2PO_4
C	Fe	10	Citrato de Fe
D	Mg	250	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	K	1500	K_2SO_4
	Mn	1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	B	2	H_3BO_4
	Zn	0.5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Cu	0.2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	Co	0.1	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Mo	0.1	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Tabla A2. Primeras secuencias de los genes de *Phaseolus vulgaris* utilizados para realizar RT-PCR.

Gen		Secuencia Oligonucleotídica
<i>Aquaporina</i>	F	5'-CGC CGC TGT TTG AGC CCT CG-3'
	R	5'-TTG CGC ATC GTT TGG CAT CG-3'
<i>PvSnRK1</i>	F	5'-ATGGACGGACCAGCTGGCCG-3'
	R	5'-GTGGTACTCTTCCCTTTGATGATG-3'
<i>YFP</i>	F	5'-CCC GCG CCG AGG TGA AGT TCG-3'
<i>PvENOD40</i>	F	5'-AGTTTTGTTGGCAAGCATCC-3'
	R	5' -TAAGCACAAGCAAACCTGTTG-3'
<i>PvNIN</i>	F	5' -GGGGATTCAGAGATTTGCAG-3'
	R	5' -AACCCACTCTTGAGCATCGT-3'
<i>PvSSI</i>	F	5'-TGGTATCCAGATTTTCCATCCACAATG-3'
	R	5' -CCTTTGTGCAGCCTGCAGTTTATGAA-3'
<i>CycD1</i>	F	5'- GCT CCA ACT GCC TCC CAG ATT C-3'
	R	5' - ATC CGG CGA TGG AAT CCT CCT C-3'
<i>CycB1-1</i>	F	5'- AGTGTTGTCAAGTGCTTTGCTGGAG-3'
	R	5' - GGATTGCGCCAAAAACCTAGT-3'

Tabla A3. Concentraciones de los ARNs obtenidos de las raíces de plantas control y 35S-SnRK1 inoculadas con *R. tropici* y sin inocular.

Muestras	260/280	ARN Concentración (ácido nucleico)
Control sin inocular	2.14	198.3 ng/μl
35S-SnRK1 sin inocular	2.16	114.2 ng/μl
Control inoculada	2.14	151.8 ng/μl
35-SnRK1 inoculada	2.09	3.597 ng/μl