



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN**

Identificación y análisis comparativo de expresión de familias de genes *SWEET* y *SULTR* involucradas en simbiosis micorrízica y rizobial en frijol

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

**JOAQUÍN ALBERTO GARCÍA REYNOSO**

TUTOR: Dr. Manojkumar Arthikala

ASESORA: Dra. Kalpana Nanjareddy



**ENES UNAM**  
UNIDAD LEÓN

LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO

2022



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.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>8</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1. Simbiosis.....	11
1.2. Señalización en la simbiosis.....	11
1.2.1. Simbiosis de leguminosas-rizobios.....	11
1.2.2. La invasión a la raíz de las leguminosas por los rizobia.....	13
1.2.3. Simbiosis de leguminosas-micorriza.....	15
1.3. <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	17
1.3.1. Estudios de micorrizas en <i>P. vulgaris</i> .....	18
1.3.2. Estudios de rizobios en <i>P. vulgaris</i> .....	19
1.3.3. Rendimiento y crecimiento de <i>P. vulgaris</i> por asociación simbiótica.....	19
1.4. Familia de genes transportadores <i>SWEET</i> .....	20
1.5. Familia de genes transportadores <i>SULTR</i> .....	22
1.6. La bioinformática.....	23
1.7. Estudios de transcriptómica en simbiosis.....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. General.....	26
2.2. Particulares.....	26
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	<b>29</b>
5.1. Simbiosis de <i>P. vulgaris</i> con rizobio y micorriza.....	29
5.1.1. Rizobio.....	30
5.1.2. Micorriza.....	32
5.2. Estudio de transcriptómica y moléculas de señalización durante la simbiosis de <i>P. vulgaris</i> con micorriza y rizobia.....	33
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
6.1. Identificación, alineación y análisis de filograma de los genes <i>SWEET</i> y <i>SULTR</i> en <i>P. vulgaris</i> .....	36
6.2. Características estructurales de los genes y localización en los cromosomas.....	37

6.3.	Hélices transmembranales y análisis de hidrofobicidad de las proteínas SWEET y SULTR.....	37
6.4.	Análisis del promotor y anotación GO de los genes SWEET y SULTR.....	38
6.5.	Análisis <i>In Silico</i> de los perfiles de expresión de los genes de las familias SWEET y SULTR en distintos tejidos y los patrones de expresión en ríces noduladas y micorrizadas.....	39
6.6.	Interactoma proteína-proteína de las familias SWEET y SULTR con los factores de nodulación y micorrización .....	41
7.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
7.1.	Se clasifican en clados los genes de las familias SWEET y SULTR de <i>P. vulgaris</i> .....	42
7.2.	Los genes de las familias SWEET y SULTR se están distribuidos a lo largo de los cromosomas de <i>P. vulgaris</i> .....	46
7.3.	Análisis estructural de los genes SWEET y SULTR de <i>P. vulgaris</i> .....	48
7.4.	Regiones transmembranales de las proteínas SWEET y SULTR.....	50
7.5.	Las proteínas SWEET y SULTR de <i>P. vulgaris</i> en membranas subcelulares	50
7.6.	Identificación de los dominios y motivos de secuencias de proteínas SWEET y SULTR.....	51
7.7.	Análisis del promotor en las familia de genes SWEET y SULTR .....	54
7.8.	Ontología de genes SWEET y SULTR.....	59
7.9.	Las familias de genes SWEET y SULTR se expresan en diferentes tejidos de <i>P. vulgaris</i> bajo las condiciones simbióticas de micorriza y rizobio. ....	61
7.10.	Interactoma proteína-proteína de las proteínas putativas SWEET y SULTR con proteínas de señalización en simbiosis .....	68
8.	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
8.1.	Identificación de los genes SWEET y SULTR.....	73
8.2.	Análisis de expresión de los genes SWEET y SULTR bajo las condiciones simbióticas .....	76
8.3.	Interacción proteína-proteína de proteínas de señalización simbiótica .....	77
9.	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
10.	<b>PRODUCTOS GENERADOS .....</b>	<b>80</b>
10.1.	Congresos Internacionales .....	80
10.2.	Congresos Nacionales .....	80
11.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>
12.	<b>ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Infección de células de corticales de la raíz por rizobios.	14
<b>Figura 2.</b> Modelo de simbiosis entre hongos micorrícicos arbusculares (MA) y plantas huésped.	16
<b>Figura 3.</b> Topología de transportadores <i>SWEET</i> .	22
<b>Figura 4.</b> Topología de transportadores <i>SULTR</i> .	23
<b>Figura 5.</b> Análisis de filograma de los genes <i>PvSWEET</i> y <i>PvSULTR</i> en <i>P. vulgaris</i> .	45
<b>Figura 6.</b> Distribución cromosómica de las familias de genes <i>PvSWEET</i> y <i>PvSULTR</i> en el genoma de <i>P. vulgaris</i> .	47
<b>Figura 7.</b> Análisis de la estructura genética de los transportadores de azúcar ( <i>SWEET</i> ) y transportadores de azufre ( <i>SULTR</i> ) en <i>P. vulgaris</i> .	49
<b>Figura 8.</b> Identificación de dominios en las secuencias de proteínas <i>SWEET</i> y <i>SULTR</i> .	51
<b>Figura 9.</b> Identificación de motivos en las secuencias de proteínas <i>SWEET</i> .	52
<b>Figura 10.</b> Identificación de motivos en las secuencias de proteínas <i>SULTR</i> .	53
<b>Figura 11.</b> Distribución y repeticiones de los motivos identificados en la región del promotor de 2,000 pb en los genes <i>SWEET</i> de <i>P. vulgaris</i> .	57
<b>Figura 12.</b> Distribución y repeticiones de los motivos identificados en la región del promotor de 2,000 pb en los genes <i>SULTR</i> de <i>P. vulgaris</i> .	58
<b>Figura 13.</b> Anotación de ontología genética de los genes <i>SWEET</i> en <i>P. vulgaris</i> .	59
<b>Figura 14.</b> Anotación de ontología genética de los genes <i>SULTR</i> en <i>P. vulgaris</i> .	60
<b>Figura 15.</b> Perfiles de expresión <i>in silico</i> de los genes <i>SWEET</i> en diversos tejidos de <i>P. vulgaris</i> .	63
<b>Figura 16.</b> Perfiles de expresión <i>in silico</i> de los genes <i>SULTR</i> en diversos tejidos de <i>P. vulgaris</i> .	64
<b>Figura 17.</b> Perfiles de expresión de los genes de la familia <i>SWEET</i> en <i>P. vulgaris</i> durante la simbiosis con micorriza y rizobio,	

y gráfico de expresión a la alza y a la baja.	66
<b>Figura 18.</b> Perfiles de expresión de los genes de la familia <i>SULTR</i> en <i>P. vulgaris</i> durante la simbiosis con micorriza y rizobio.	67
<b>Figura 19.</b> Diagrama de Venn Euler de interacción proteína-proteína.	69
<b>Figura 20.</b> Interacción proteína-proteína de <i>PvSULTR2</i> y <i>PvSULTR3</i> con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y durante la nodulación.	70
<b>Figura 21.</b> Interacción proteína-proteína de <i>PvSWEET22</i> con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y de nodulación.	71
<b>Figura 22.</b> Interacción proteína-proteína de <i>PvSWEET23</i> con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y de nodulación.	72
<b>Figura A1.</b> Filograma de unión de vecinos de genes <i>SWEET</i> en diversos organismos.	94
<b>Figura A2.</b> Filograma de unión de vecinos de genes <i>SULTR</i> en diversos organismos.	95
<b>Figura A3.</b> Hidrofobicidad de las proteínas <i>SWEET</i> de <i>P. vulgaris</i> .	97
<b>Figura A4.</b> Hidrofobicidad de las proteínas <i>SULTR</i> de <i>P. vulgaris</i> .	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genes de la familia del gen <i>PvSWEET</i> en <i>P. vulgaris</i> .	43
<b>Tabla 2.</b> Genes de la familia del gen <i>PvSULTR</i> en <i>P. vulgaris</i> .	44
<b>Tabla 3.</b> Definición de las muestras de los tejidos utilizados para el análisis de expresión de los genes <i>SWEET</i> y <i>SULTR</i> en el mapa de calor.	62
<b>Tabla A1.</b> Lista de proteínas <i>SWEET</i> de <i>P. vulgaris</i> con puntuaciones GRAVY.	99
<b>Tabla A2.</b> Lista de proteínas <i>SULTR</i> de <i>P. vulgaris</i> con puntuaciones GRAVY.	100
<b>Tabla A3.</b> Lista de las interacciones proteína-proteína entre las proteínas de señalización y las proteínas putativas de micorrización ( <i>PvSWEET22</i> y <i>PvSULTR2</i> ) y rizobio ( <i>PvSWEET23</i> y <i>PvSULTR3</i> ).	105

*“It is necessary to constantly remind ourselves that we are not an abomination”*

-Marlon Riggs

## **AGRADECIMIENTOS**

El camino de la universidad no hubiera sido fácil si no me hubiera encontrado a las personas correctas, por estas personas son los agradecimientos que más adelante dedico.

En primer lugar, quiero agradecer la parte de la familia. A José Luis García Cervantes (mi padre), a Ana Lilia Reynoso Gonzalez (mi madre), a Ana Daniela García Reynoso y a José Luis García Reynoso (mis hermanos) por su apoyo durante la licenciatura. Que a pesar de haber cambiado de escuela y carrera, me apoyaron y me alentaron a seguir adelante. Donde encontré su amor por cada decisión que tomé a lo largo de la carrera.

Por segundo lugar, quiero agradecer a la Dra. Harumi, que siempre creía en mi y aceptaba todas mis locuras que tenía en mente por hacer. Por aceptarme en el Servicio Social y verme crecer. También a la Dra. Cinthia, que desde el primer semestre hizo que me apasionara la carrera, además de extenderme la mano y su confianza.

Por mucho, quiero agradecer al Dr. Manojkumar Arthikala, que sin dudarlo y pensarlo me acepto en su grupo de investigación. Sus palabras y su apoyo durante el desarrollo de este trabajo fueron grandes pilares para creer en mi y terminar este.

A Rodrigo, Brenda y Gema por ser mis amigos durante este proceso. Que siempre me escucharon y me apoyaron, dandome consejos.

Mi agradecimiento va a todo Youth GTO, donde encontré a muchos amigos. En ellos encontré la mayor reserva de esperanza, amor y solidaridad. Con ellos encontré a un nuevo Alberto, donde pude ver que podía lograr todo lo que quería hacer. Donde los sueños se hacen realidad. Igual a la Sociedad Científica Juvenil – León, que apostaron mi amor en la divulgación científica, Liz y Jona, esto también va para ustedes.

A mis compañeros de Agrobioteg: Ale, Betty, Ernesto, Mónica, Cristóbal, Abi, Lore, Toño y Luis, por aceptarme en este gran equipo. Donde hay apoyo, amor, motivación y amistad. Hagamos que las cosas sucedan.

Y por último, agradezco a la DGAPA/PAPIIT, UNAM por el financiamiento parcial de esta investigación y por la beca (Beca no. IN213221 a MKA, IN216321 a KN) y el proyecto CF-MI-20191017134234199/316538 de CONACyT a MKA.

Este trabajo se realizó en el laboratorio nacional PlanTECC.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a todo aquel que en algún momento se ha sentido solo, abandonado y sin amor. A aquellos que día con día se levantan para ser mejores personas y crecer en cualquier sentido de la vida. Además, quiero dedicarme este escrito de aquel Alberto de unos años anteriores que cada día al levantarse era una lucha constante con la depresión y la ansiedad, y que a pesar de ello salió adelante cumpliendo las metas que en algún momento más pequeño se propuso y que hoy estaría muy feliz de todo esto.

El tema de la depresión es serio, no se cura solo diciendo que te mejores o con un simple abrazo. Esta condición casi acaba con mi vida, era un sentimiento muy fuerte que quiero comparti por aquí. Era muy complicado levantarme para asistir a la universidad, y cuando lograba hacerlo había una pequeña nube que me acompañaba y a lo largo del día se hacía más grande hasta llevar un momento del día que sentía una tormenta que me ahogaba, sin dejarme respirar, sin pensar y con muchas ganas de llorar. Pero sin duda, eso no era lo peor, ya que cuando llegaba la noche se sentía una soledad demasiado grande, donde solo te abrazaba un pensamiento, la muerte, que te quería con ella. Estas noches oscuras, donde el único sonido era el de mi mente y no me dejaban dormir, pensaba darme por vencido. Pero bueno, aquí sigo y en algún futuro volveré a leer esto.

Además, quiero dedicar a los que me hicieron sentir especial y amado en la escuela, todos los chicos que conocí por Youth GTO ahí en la ENES, que sin ellos, tal vez ya no existiera. Donde los escuché y me escucharon, sabiendo que todos estábamos luchando con algún fantasma, pero que estos se iban cuando nos reuníamos y nos dábamos el amor que a veces no encontrábamos en otro lado. No hago la lista de todos ellos porque sería muy larga, pero que siempre los llevo en el corazón y en la mente durante mis mejores y peores situaciones. Gracias a ellos la depresión era minúscula y yo podía más con ella.

También la dedico a los profesores que más me marcaron durante la carrera y que vieron algo especial en mí. La doctora Harumi que, sin duda, siempre estuvo para escucharme en cualquier momento y me aconsejaba bastante, y que sin su apoyo yo no hubiera cumplido algunos de aquellos sueños como el viaje a Canadá y el intercambio a Perú, ya que estuvo en todos los momentos. También a la doctora Cinthia Soberanes por apoyarme durante la incursión a la ciencia y hacer que amara bastante el tema, y por darme la primer oportunidad de hacer investigación. Además de ser una amiga en la que pude confiar y platicar. Y por último, pero no menos importante, al doctor Manojkumar Arthikala, que me aceptó para realizar este trabajo de investigación del cual podré titularme. Pero también le agradezco su comprensión durante este camino y que siempre estuvo atento de mi, nunca me dejó. Les agradezco mucho, ya que por profesores como ustedes, uno como alumno desea seguir en la ciencia, en la escuela y en esta vida.

## GLOSARIO

Abreviatura	Significado	Traducción al inglés
<b>aa</b>	Aminoácido	Aminoacid
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
<b>BLASTN</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (Nucleótidos)	Basic Local Alignment Search Tool (Nucleotides)
<b>BLASTP</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (Proteínas)	Basic Local Alignment Search Tool (Proteins)
<b>BPCP</b>	Bacterias promotoras de crecimiento en plantas	Plant Growth Promoting Bacteria
<b>CDS</b>	Región de codificación	Coding Sequence
<b>Chr</b>	Cromosoma	Chromosome
<b>FN</b>	Factores de nodulación	Nodulation factors
<b>GO</b>	Ontología génica	Gene Ontology
<b>GRAVY</b>	Media general de hidrofobicidad	Grand Average of Hydrophobicity
<b>GSDS</b>	Servidor de visualización de estructuras genéticas	Gene Structure Display Server
<b>HI</b>	Hilo infectivo	Infectious thread
<b>HMA</b>	Hongos micorrizicos arbusculares	Arbuscular mycorrhizal fungi
<b>HPI</b>	Hilo de preinfección	Pre-Infection Thread
<b>kDa</b>	Kilodalton	Kilodalton
<b>MEGA X</b>	Análisis de genética molecular evolutiva X	Molecular evolutionary genetics analysis X
<b>MW</b>	Peso molecular	Molecular weight
<b>NJ</b>	Unión de vecinos	Neighbor joining
<b>pb</b>	Pares de bases	Base pair
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico	Isoelectric point
<b>SEA</b>	Análisis de enriquecimiento singular	Singular Enrichment Analysis
<b>SMART</b>	Herramienta sencilla de investigación de la arquitectura modular	Simple modular architecture research tool
<b>STAS</b>	Antagonista del transportador de sulfato y del factor AntiSigma	Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist
<b>STRING</b>	Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes/proteínas que interactúan	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
<b>SULTR</b>	Transportadores de sulfato	Sulphate Transporters
<b>SWEET</b>	Transportadores de azúcar que eventualmente se exportarán	Sugar Will Eventually be Exported Transporters
<b>TMD</b>	Dominios transmembrana	Transmembrane domain
<b>TMH</b>	Hélice transmembrana	Transmembrane helix
<b>UTR</b>	Región no traducida	Untranslated region
<b>VSSC</b>	Vía de señalización simbiótica común	Common symbiotic signaling pathway

## RESUMEN

El azufre y los azúcares son elementos importantes para el desarrollo de las plantas que cumplen su función metabólica. Las familias *SWEET* (transportadores de azúcares eventualmente exportados) y *SULTR*, que transportan azúcares y azufre, respectivamente, han sido caracterizadas en varias especies de plantas, pero aún no se ha realizado un análisis de las mismas en la leguminosa frijol. En este estudio, realizamos un análisis de los genes portadores *SWEET* y *SULTR* en el genoma del frijol común (*P. vulgaris*) y, a continuación, examinamos los perfiles de expresión de los genes *PvSWEET* y *PvSULTR* durante la simbiosis micorriza-frijol y rizobio-frijol. El análisis de las relaciones de filograma, el número de hélices transmembranes (TMH), las estructuras de los genes y los motivos mostraron que los genes *PvSWEET* portaban 7 TMH y podían clasificarse en cuatro clados con 3 tipos diferentes de motivos en un dominio duplicado (MtN3\_saliva). Mientras que para la familia de genes *SULTR* se encontró que portaban 12 TMH y se clasificaban en 4 clados con 9 motivos diferentes en dos dominios (*STAS* y transportador de sulfato). Además, se tomaron los genes putativos de cada familia bajo condiciones de micorriza y rizobio, *PvSWEET22*, *PvSWEET23*, *PvSULTR2* y *PvSULTR3*, a través de un perfil de expresión de genes de un análisis transcriptómico y un perfil total de los diferentes tejidos en *P. vulgaris*. Y por último, un interactoma proteína-proteína de las proteínas de señalización para la nodulación y micorrización con las proteínas putativas elegidas. En conclusión, se proporciona un análisis completo de las familias *SWEET* y *SULTR* en *P. vulgaris*, así como las relaciones de filograma y las estructuras genéticas. Y el análisis de perfiles de expresión de los genes de ambas familias durante la simbiosis micorrizica y rizobio en la planta del frijol y un interactoma proteína-proteína con las proteínas de señalización.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Simbiosis

En el reino vegetal se presentan importantes interacciones mutualistas, en estas se lleva a cabo el intercambio de los recursos y servicios entre el **hospedador** y **hospedero** para un beneficio mutuo (Boucher, 2016). Hay varios mutualismos que implican interacciones por pares (Denison y Kiers, 2011), se llegan a presentar interacciones ecológicas que son importantes entre diferentes especies (Afkhami *et al.*, 2014). En el caso de las plantas, éstas pueden interactuar a la misma vez con diferentes socios microbianos localizados en el suelo (Larimer *et al.*, 2010).

La evolución de las plantas terrestres se produjo en presencia de microbios, "el fitomicrobioma"; la comunidad microbiana de la rizósfera es el subconjunto más abundante y diverso del fitomicrobioma y puede incluir tanto microbios beneficiosos como parasitarios/patógenos. En las plantas terrestres, el fitomicrobioma contribuye al crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre los microbios beneficiosos, los simbioses de hongos y bacterias simbioses se han estudiado ampliamente en la mayoría de las plantas modelo, incluidos los cultivos de leguminosas. Por ejemplo, los simbioses fúngicos "micorrízicos arbusculares" (MA) y el simbiote bacteriano "*Rhizobium*" (Goh *et al.*, 2013; Larimer *et al.*, 2014).

## 1.2. Señalización en la simbiosis

### 1.2.1. Simbiosis de leguminosas-rizobios

La simbiosis que tiene lugar entre las bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas es de gran importancia debido a la fuente de nitrógeno asimilable que les proporcionan las bacterias a las plantas.

Para el inicio de la simbiosis debe producirse un intercambio de señales previas entre los organismos (Oldroyd y 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 las bacterias (Perret *et al.*, 2000). Dentro del grupo de compuestos fenólicos que libera la planta, se encuentran los flavonoides y los isoflavonoides que actúan de forma conjunta con los glucósidos, las betaínas y los ácidos aldónicos desempeñando el papel de quimioatrayentes de las bacterias. Esto provoca 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 NodD, sobre la 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 y Bisseling, 2002).

En los pelos radicales se han encontrado la mayoría de las respuestas celulares y específicas que producen las raíces cuando se encuentran ante los FN. Estos compuestos FN desencadenan una serie de sucesos preinfectivos que incluyen un reajuste del citoesqueleto y un curvamiento en los pelos radiculares de la raíz (Murray, 2011). Además, esta presencia de FN provoca un incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  en los pelos radicales, justamente en el área apical de éstos, coincidiendo con la fragmentación y polimerización que tiene lugar en la misma zona de los microfilamentos de actina en raíces de *P. vulgaris* y *Vicia sativa* (Cárdenas *et al.*, 1998; 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, continúa con un redireccionamiento del

crecimiento apical del pelo radical que se producirá a las 6 horas y su ramificación en torno a las 12 horas (Cárdenas *et al.*, 2000). Los FN también influyen sobre las raíces en las leguminosas generando 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. Las respuestas anteriores son un requisito necesario para la infección por rizobia (Murray, 2011).

### **1.2.2. La invasión a la raíz de las leguminosas por los rizobia**

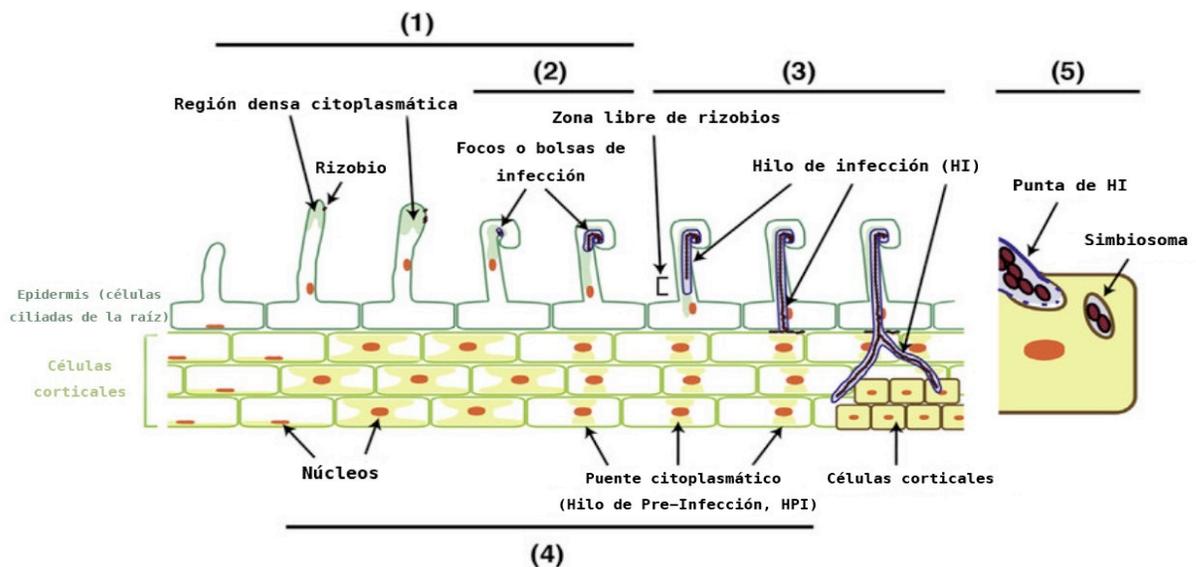
La emisión de las señales químicas y su reconocimiento permite que los rizobia se adhiera a las raíces, más concretamente a la región apical de los pelos radicales. En esta unión, la lectina juega un papel fundamental ya que reconoce y se une de forma específica a ciertos azúcares. La unión que se produce entre rizobia y las raíces desencadena en el hospedador una gran cantidad de cambios moleculares y celulares (Gage, 2004).

Uno de esos cambios es la deformación del pelo radical, debido al crecimiento del rizobio, éste va produciendo sustancias que harán que se produzca un enroscamiento en los pelos radicales de leguminosas. El siguiente paso es la formación del hilo infectivo (HI), el cual se producirá gracias al enroscamiento 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 enroscamiento, 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 (Figura 1; Murray, 2011).

Realizando una caracterización molecular dentro de dicho proceso se ha podido conocer que se requieren de elementos como los microtúbulos y los filamentos de actina propios del citoesqueleto. Además también se requiere de una remorina,

flotillas, receptores tipo cinasa, una vavirina, enzimas que medien procesos de ubiquitinación y factores de transcripción (Popp y 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 córtex externo en leguminosas que presentan nódulos determinados (Oldroyd y 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 córtex, se producirá una bifurcación de éste, liberando de esta forma bacterias, las cuales ingresan en el citoplasma de las células del córtex, presentando una membrana identificada como peribacteroidal.



**Figura 1.** Infección de células de corticales de la raíz por rizobios. (1) Inicio de deformación y rizado de la raíz por la adhesión de los rizobios y acumulación del factor Nod. (2) Se degrada la pared celular e inicia la invaginación de la membrana del HI en el pelo radicular curvado. (3) Se da la elongación del HI añadido al flujo citoplasmático y el movimiento nuclear. (4) Mientras ocurre la infección por el rizobio ((1) y (3)), se crea un puente citoplasmático o el hilo de preinfección (HPI), en las células corticales de la raíz, para orientar los HI durante la elongación. (5) La membrana del HI se colapsa una vez que este alcanza la célula cortical dividida, momento en el que los rizobios son liberados para crear el simbiosoma (orgánulo específico para la fijación del nitrógeno). (Imagen obtenida y modificada de Suzaki *et al.*, 2015).

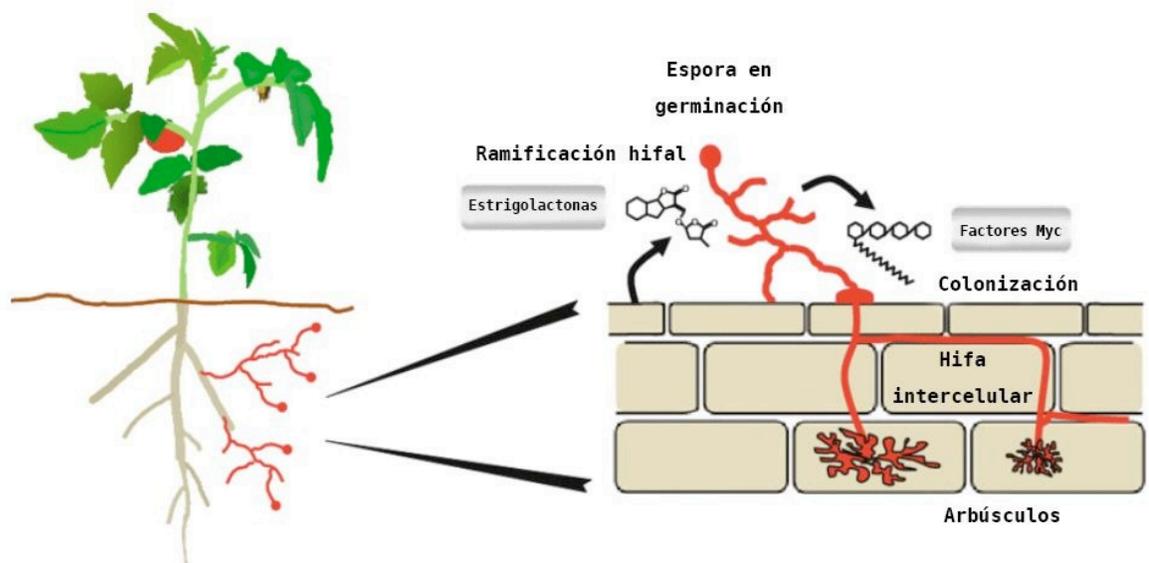
En este nuevo simbiosoma que se forma, las bacterias se transformarán en bacteroides que presentarán el complejo nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, con los que se logrará la fijación biológica del nitrógeno (Popp y Ott, 2011).

### **1.2.3. Simbiosis de leguminosas-micorriza**

Los hongos micorrícicos arbusculares (MA), biótros obligados pertenecientes al filo *Mucoromycota* y al subfilo *Glomeromycotina* (Spatafora *et al.*, 2016), son el grupo de simbiosomas más antiguo y quizá el más importante de la Tierra. Los registros fósiles y la datación del reloj molecular indican que las asociaciones de hongos MA surgieron hace 460 millones de años (Simon *et al.*, 1993), apoyando la idea de que la flexibilidad de las plantas para hacer estas asociaciones es una de las adaptaciones más notables y duraderas de la vida en la Tierra. La inmensa mayoría de las plantas vasculares pueden formar simbiosis con hongos MA (Wang y Qiu, 2006), que ayudan a las plantas hospedadoras a absorber y translocar macronutrientes (fósforo [P] y nitrógeno [N]), micronutrientes y agua del suelo (Govindarajulu *et al.*, 2005). A cambio, la planta hospedadora satisface las necesidades de carbono orgánico (Smith y Smith, 2011) y lípidos (Jiang *et al.*, 2017; Brands *et al.*, 2018) de los hongos MA. Los hongos MA también protegen contra los hongos patógenos y varios estreses abióticos (Lenoir *et al.*, 2016), lo que los hace de gran interés para la agricultura sostenible (Gianinazzi *et al.*, 2010).

La relación mutualista entre las plantas y los hongos MA comienza dentro de la rizósfera con un diálogo molecular entre los socios. En respuesta a las estrigolactonas presentes en el exudado de la raíz del hospedador (Besserer *et al.*, 2006), las esporas de hongos MA que germinan sintetizan y secretan factores Myc (Maillet *et al.*, 2011). Los citoooligosacáridos (Cos) y los lipocitoooligosacáridos (LCOs), que promueven la señalización de la simbiosis induciendo oscilaciones en el calcio asociado al núcleo e induciendo la expresión de genes de la planta que responden al hongo MA y que desencadenan cambios fenotípicos en las raíces del huésped (Maillet *et al.*, 2011; Genre *et al.*, 2008). El acontecimiento de los hifopodios

fúngicos establece el contacto célula a célula entre la raíz del huésped y, por tanto, el hongo MA, iniciando así la 'vía de señalización simbiótica común' (VSSC). La invasión de la hifa y la colonización de la base implica la formación de una clavija de infección desde el hifopodio, que media el crecimiento hifal en las células epidérmicas de la raíz, por lo que un aparato de pre-penetración, que dicta las vías intracelulares por las que el hongo atraviesa la epidermis (Genre *et al.*, 2008) (Figura 2).



**Figura 2.** Modelo de simbiosis entre hongos micorrícicos arbusculares (MA) y plantas huésped. Este proceso tiene inicio en la rizósfera de las raíces con la producción y liberación de moléculas, llamadas estrigolactonas, bajo una deficiencia de nutrientes (mayormente por la falta de fósforo). Estas moléculas estimulan la germinación mediante la ramificación hifal de las esporas de los hongos micorrícicos arbusculares, que ayudarán al contacto la raíz del hospedador. Al mismo tiempo, el hongo fabrica y exuda los factores Myc, los cuales actúan sobre las raíces incitando las respuestas moleculares para una triunfante colonización. Después de este contacto, las hifas del hongo crecen de manera intracelular hasta llegar a la corteza interna, y ahí forman el arbusculo típico para el flujo de nutrientes (Imagen obtenida y modificada de López-Ráez y Pozo, 2013).

Las hifas fúngicas crecen y se ramifican dentro de los espacios intra e intercelulares de la corteza de base y posteriormente invaden las células corticales internas. Dentro de estas células, las hifas fúngicas desarrollan estructuras finamente ramificadas llamadas arbusculos. Cada arbusculo permanece separado del

citoplasma de la célula vegetal por una extensión de la membrana plasmática derivada de la planta llamada membrana periarbuscular. Esta membrana rodea las ramas hifales y constituye una interfaz especializada para el intercambio de nutrientes entre los socios (Smith y Read, 2008). Dada la importancia de la simbiosis MA, las redes de señalización que subyacen a las interacciones micorrícicas están bien estudiadas. Hasta ahora, se ha informado de que varios genes y factores de transcripción son esenciales para las asociaciones simbióticas MA (Choi *et al.*, 2018), como *RAM1*, *RAD1*, *MIG1*, *ERF1*, *RAM2*, *STR1/2*, *PT4* y *PT11*, por citar algunos.

### **1.3. *Phaseolus vulgaris***

Hablando en el sentido botánico, la especie *P. vulgaris* L. (frijol) pertenece a la familia de las Leguminosae (Fabacea), subfamilia Faboideae (Papolionoideae), tribu Phaseolae y subtribu Phaseolinae. El frijol es considerado como una de las leguminosas de mayor relevancia en el mundo debido a su importancia como grano. Este cultivo se extiende a lo largo de los cinco continentes y a pesar de no ser considerado como uno de los cultivos prioritarios, sí es un alimento básico que no falta en la dieta de los pobladores de América Latina, El Caribe y unas regiones de África (Sangerman-Jarquín *et al.*, 2010).

El frijol tiene como centro de origen y domesticación América Latina, específicamente, en dos regiones geográficas, que son Mesoamérica y los Andes. Entre estas dos regiones, se pueden diferenciar genéticamente derivadas de un ancestro en común hace más 100,000 años. En México y América del Sur el frijol se domesticó de una forma independiente hace 8,000 años (Bitocchi *et al.*, 2013). Esto se ha ido fundamentando gracias a los registros que se tienen de semillas cultivadas de hace más de 3,000 años (Brown, 2006).

Para México, el frijol es un cultivo estratégico, debido a su alto valor proteico de un 20 a 25%, colocándolo sólo detrás de la soya y el cacahuate a nivel mundial (Singh

*et al.*, 1999). Como la mayoría de las leguminosas, contienen proteínas con escasos aminoácidos azufrados, como lo son la metionina y la cisteína.

El consumo de una porción regular de este cultivo puede apoyar en la reducción de los niveles de colesterol y hasta puede disminuir los riesgos de poder tener cáncer (Anderson *et al.*, 1984). En nuestro país, este alimento es la leguminosa de mayor consumo, ya que representa más del 36% de proteínas de la dieta diaria.

### **1.3.1. Estudios de micorrizas en *P. vulgaris***

Los hongos micorrízicos arbusculares (MA), durante la colonización de la raíz (intraradical), llevan a cabo una serie de procesos morfofisiológicos y bioquímicos regulados por la interacción de las proteínas codificadas entre las plantas (hospedador) y el hongo (huesped), y factores ambientales. Pero hay muchos procesos moleculares que aún no se conocen y son necesarios para moderar el proceso de colonización y el desarrollo de las micorrizas arbusculares (Lambais *et al.*, 2003). Muchos de los mecanismos de la simbiosis de estos dos organismos se han estudiado ampliamente para entender los pasos de la colonización.

En la mayoría de los cultivos, el frijol, bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, los resultan beneficiosos sin importar el cultivo. Las respuestas debido a las variaciones genéticas de las plantas a los MA son universales (Linderman y Davis, 2004; Sensoy *et al.*, 2007; Demir *et al.*, 2015). A continuación, se muestran algunas investigaciones realizadas de la simbiosis entre *P. vulgaris* y los hongos micorrízicos arbusculares.

En el frijol, la aplicación exógena de 10 y 50 mmol/L de nitrato aumentó el porcentaje de colonización de la longitud de la raíz de las micorrizas arbusculares, redujo concomitantemente el tamaño del arbusculo y mejoró el transporte de amoníaco sin afectar el transporte de fosfato (Nanjareddy *et al.*, 2014). Los estudios genómicos funcionales identificaron los genes de señalización simbióticos micorrízicos

tempranos en *P. vulgaris*. La regulación negativa de *PvRbohB*, un gen de NADPH oxidasa, aumentó significativamente la colonización de micorrizas (Arthikala *et al.*, 2013). Un estudio reciente muestra que el silenciamiento del gen *PvTOR* (Target of Rapamycin) en raíces peludas de frijol afectó el crecimiento y maduración del arbusculo (Arthikala *et al.*, 2021).

### **1.3.2. Estudios de rizobios en *P. vulgaris***

*P. vulgaris* es nodulado mayormente, en cualquier parte del mundo, por las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, pero podemos encontrar también a los géneros *Ensifer* (antes denominado *Sinorhizobium*), *Pararhizobium* (antes *Rhizobium*) y *Bradyrhizobium*. Sin embargo, hay una amplia gama de estudios enfocados principalmente en la investigación de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *Rhizobium*.

### **1.3.3. Rendimiento y crecimiento de *P. vulgaris* por asociación simbiótica**

Gracias a la asociación entre los rizobios y otras bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (BPCP o PGPB, por sus siglas en inglés), como *Rhizobium* y *Azospirillum*, apoyan al crecimiento y rendimiento de los cultivos. Esto está sustentado por diferentes estudios.

El primer estudio elaborado por Yadegari *et al.*, (2008), utilizaron de tratamiento, de manera combinadas o individuales, las cepas BPCP *Pseudomonas fluorescens* P-93 y *Azospirillum lipoferum* S-21, y dos cepas de *Rhizobium*. En dicho experimento se observó que todos los tratamientos dieron rendimientos, siendo la cepa de *Rhizobium* 133 combinada con *P. fluorescens* P-93 la que tuvo un mayor rendimiento en el peso de semilla, número de vainas por planta y concentración de proteína en la semilla.

Un segundo estudio en el 2021 por Filipini *et al.*, mostró un incremento en el rendimiento de los cultivos de *P. vulgaris*. Pudiendo observar que al aplicar *A. brasilense* directamente a las semillas o por aspersión foliar, y además inocular la semilla con *R. tropici*, hay un aumento directo sobre la biomasa y la concentración del nitrógeno, y sobre el peso y rendimiento de las semillas.

A nivel molecular, varios genes relacionados con la simbiosis de frijol-nódulos han sido funcionalmente validados usando tecnología RNAi en frijol común durante los últimos años como *PvNADPH*-oxidasa (Montiel *et al.*, 2012), *PvTRE1* (Barraza *et al.*, 2013), *PvSymRK* (Sanchez-Lopez *et al.*, 2011), *PvNodulin22* (Rodríguez-López *et al.*, 2014), *PvRACK1* (Islas-Flores *et al.*, 2011), *PvNF-YA* y *PvNF-YB* (Marsh *et al.*, 2007; Soyano *et al.*, 2013), *PvTOR* (Nanjareddy *et al.*, 2017), *PvRbohA* (Arthikala *et al.*, 2017), *PvBPS1* (Arthikala *et al.*, 2018) etc.

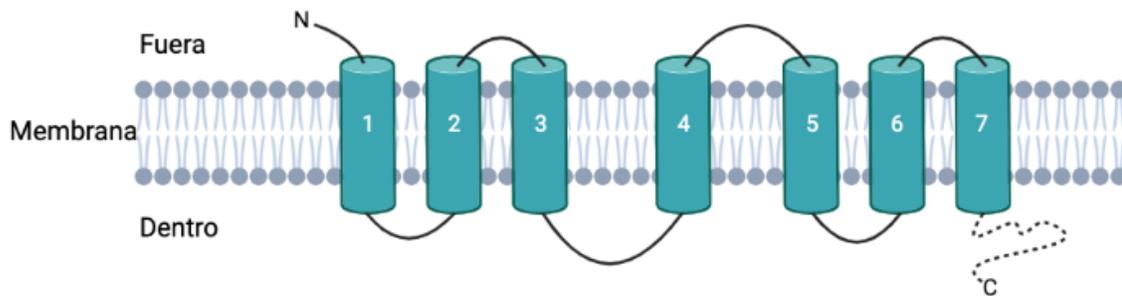
#### 1.4. Familia de genes transportadores **SWEET**

Los hidratos de carbono son de las más moléculas más importantes para los seres vivos, ya que sirven como almacenamiento de energía, de conformación básica para las paredes celulares y de funcionamiento en la señalización durante la homeostasis osmótica en ciertas condiciones de estrés abiótico (Feng *et al.*, 2015). Además, las plantas se ven obligadas a transformar su sistema de células, ya que los microorganismos biotróficos obligados se alimentan de ellas para liberar los azúcares al espacio extracelular. Hasta hace poco que se ignoraban los procesos moleculares de la liberación de estos azúcares, por las plantas, hacia el espacio extracelular, por lo que identificar a la familia de transportadores SWEET (del inglés **S**ugars **W**ill **E**ventually be **E**xported **T**ransporter) fue un hecho clave en este proceso (Chen *et al.*, 2010). Esta familia de genes, transportadores de azúcares, SWEET fueron hallados en *Arabidopsis* durante un cribado donde se emplearon sensores FRET de glucosa o sacarosa independientes del pH para identificarlos (Chen *et al.*, 2010, 2012; Lin *et al.*, 2014).

Los genes SWEET, son una familia caracterizada por transportar azúcar a través de membranas intracelulares o plasmáticas y muestran una baja afinidad hacia los azúcares (Chen *et al.*, 2010, 2012). En cuanto al análisis de filograma, una amplia variedad de plantas se ha podido comprobar que se agrupan en 4 clados, además de haberse organizado de esta manera en *Arabidopsis* por primera vez (Chen *et al.*, 2010; Chong *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2015; Patil *et al.*, 2015). Los genes SWEET que forman parte de los clados I y II son preferentemente transportadores de hexosas mientras que los del clado III transportan sacarosa y; siendo el clado IV el que presenta la menor cantidad de genes y los encargados de ser transportadores en las vacuolas regulando el tráfico de la fructosa por el tonoplasto (Chen *et al.*, 2010, 2012; Chardon *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014).

La familia de genes SWEET está conservada en todo el reino vegetal, según Eom *et al.* (2015) las angiospermas en promedio presentan un promedio de 20 genes SWEET, pero podemos encontrar en otros organismos diferentes cantidades como es el caso de la soya, *Glycine max*, con 52 genes (Patil *et al.*, 2015); 18 genes la pera blanca china, *Pyrus bretschneideri* (Li *et al.*, 2017); 30 genes la papa, *Solanum tuberosum*, (Manck-Götzenberger y Requena, 2016); la nuez, *Juglans regia*, con 25 genes (Jiang *et al.*, 2020); 55 genes en el algodón, *Gossypium hirsutum* (Li *et al.*, 2018); la vid, *Vitis vinifera*, cuenta con 17 genes (Chong *et al.*, 2014); 23 genes están presentes en el sorgo, *Sorghum bicolor* (Mizuno *et al.*, 2016); la planta de té, *Camellia sinensis*, cuenta con 13 genes (Wang *et al.*, 2018); incluyendo más tipos de plantas, como: *Oryza sativa* con 21 genes, *Brassica rapa* con 33, *Carica papaya* 11, *Populus trichocarpa* 26, *Zea mays* 23; y de investigación como *Arabidopsis thaliana* con 17 genes (Zhang *et al.*, 2019).

Cada proteína se compone de 7 dominios transmembranales, que catalizan la secreción y absorción de carbohidratos (Chen *et al.*, 2010; Chen, 2014), y estos hospedan a dos dominios conservados, el dominio MtN3/saliva, a su vez cada uno de estos dominios conservados es una triple haz de hélices (THB) formado por las tres hélices TM (Figura 3; Feng y Frommer, 2015).



**Figura 3.** Topología de transportadores SWEET. Las proteínas SWEET son uniportadores localizados en la membrana, por lo que permiten el transporte en una sola dirección. Cada uno de ellos representado por una hélice solitaria de 7 dominios transmembranales (TMH). Esta proteína está conformada por dos dominios *MtN3\_slv* (PF03083). (Imagen de elaboración propia).

### 1.5. Familia de genes transportadores SULTR

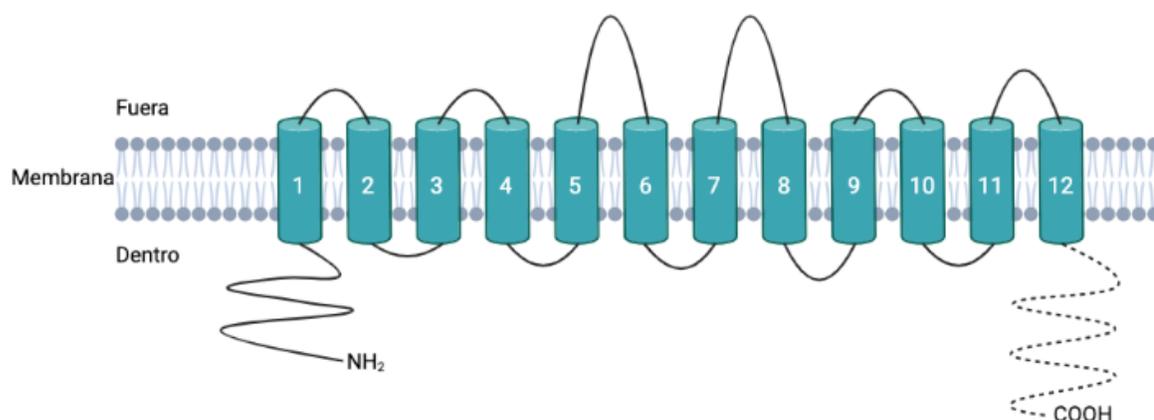
El azufre (S) es un macronutriente esencial para la vida de las plantas ubicado en el cuarto lugar sólo después de nitrógeno (N<sub>2</sub>), el fósforo (P) y el potasio (K) (Yi *et al.*, 2010; Anjum *et al.*, 2015; Vatansever *et al.*, 2016). El azufre está presente en varias rutas metabólicas como, la biosíntesis de proteínas, presente en aminoácidos como la cisteína (Cys) y la metionina (Met), en coenzimas y vitaminas, y los metabolitos secundarios (Gigolashvili y Kopriva, 2014; Anjum *et al.*, 2015). Debido al desarrollo de las plantas y la disponibilidad de nutrientes, el metabolismo del azufre se ha visto regulado por estos (Yoshimoto *et al.*, 2003; Buchner *et al.*, 2004).

SULTR fue el primer gen caracterizado en el transporte del azufre en plantas (Smith *et al.*, 1995). Se ha documentado que plantas superiores como *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *Populus* sp. presentan 11, 12 y 13 genes de SULTR, respectivamente. Por otro lado, plantas inferiores como *Physcomitrella patens* y *Selaginella moellendorffii* contienen solo 5 genes SULTR, (Kopriva *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2012).

Los transportadores SULTR se ordenan en cuatro grupos principales, SULTR I-IV. Los miembros de estos grupos se caracterizan por sus dos dominios: un

transportador sulfato y un antagonista del factor anti-sigma (STAS) en la región C-terminal; y por 12 dominios transmembranas (DTM). Encontramos en los grupos I y II los SULTR de alta y baja afinidad, respectivamente. En el grupo III se posicionan los transportadores que se les conoce o no aún su función y en el grupo IV se colocan los exportadores de sulfato vacuolar (Buchner *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2011) (Figura 4).

Hasta el momento, no se sabe nada sobre los genes de la familia SULTR en la leguminosa *P. vulgaris*. Además, la participación de los genes SULTR en la simbiosis de micorrizas y rizobios aún no se ha investigado. Por lo tanto, existe una necesidad de investigar y llenar los vacíos de conocimiento en el área de la investigación de la simbiosis de leguminosas.



**Figura 4.** Topología de transportadores SULTR. Proteína compuesta por 12 dominios transmembranales. Además comprendido por dos dominios, el antagonista del factor anti-sigma o STAS (PF01740) y el transportador de sulfato o *Sulfate\_transp* (PF01740). (Imagen de elaboración propia).

## 1.6. La bioinformática

Gracias a la secuenciación de diferentes genomas se ha descubierto el mecanismo de acción de algunos organismos, lo que ha favorecido en el desarrollo de técnicas, como el control microbiano (Bansal, 2005). El principal objetivo de la investigación bioinformática ha sido el desarrollo de bases de datos integradas de genómica y

proteómica, el análisis de secuencias genómicas, la comparación computarizada de los genes para identificar la función de los mismos, los análisis de vías metabólicas y de expresión génica, mejoramiento de técnicas estadísticas, el análisis de interacciones proteína-proteína y proteína-ADN, el desarrollo de modelos de 3D estructura de proteínas y acoplamiento 3D entre proteínas, el desarrollo de algoritmos de búsqueda evolutiva, entre otros (Bansal, 2005; Armañanzas *et al.*, 2008).

La revolución ómica de la última década ha transformado nuestra capacidad para comprender las simbiosis a nivel molecular. Ahora es posible, por ejemplo, construir un inventario de los genes codificados por cada socio, cuantificar patrones de transcripción en diferentes condiciones ambientales, establecer la relación entre la transcripción y la abundancia de proteínas para cada gen codificante de proteínas y determinar el conjunto de metabolitos que forman el grupo metabólico de los socios simbióticos que interactúan. Los investigadores de simbiosis han adoptado estas técnicas con gran celeridad, proporcionando muchas ideas novedosas.

### **1.7. Estudios de transcriptómica en simbiosis**

La profunda adaptación de vida simbiótica de las leguminosas implica cambios en la expresión de un extenso número de genes, donde se ha utilizado una tecnología prometedora para comprender la simbiosis de las leguminosas con sus huéspedes (por ejemplo, micorrizas o rizobios), siendo ésta la transcriptómica. Podemos definir a esta herramienta como el estudio de los ARN en todas sus formaciones dentro de una célula. La transcriptómica es utilizada para comprender cómo los genes se expresan en las diversas células que conforman al organismo.

Nuestro laboratorio ha analizado los perfiles de expresión génica global para identificar los genes de *P. vulgaris* expresados diferencialmente (DEG) únicos y compartidos que regulan las interacciones simbióticas frijol-rizobia y frijol-micorriza y los perfiles DEG comparados cuantitativamente. Este trabajo identificaron 3,219

genes (1,959 regulados positivamente y 1,260 regulados negativamente) y 2,645 genes (1,247 regulados positivamente y 1,398 regulados negativamente) que se expresaron diferencialmente en respuesta a la colonización de micorrizas o rizobios, respectivamente, en comparación con las raíces no inoculadas. Genes únicos y compartidos involucrados en procesos relacionados con la defensa, la estructura de la pared celular, el metabolismo del N y el metabolismo del P en raíces micorrizadas y noduladas (Nanjareddy *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Evaluar las familias de genes *SWEET* y *SULTR* involucradas en simbiosis micorrízica y rizobial en frijol mediante la identificación y análisis comparativo de expresión.

### 2.2. Particulares

- a) Identificar en el genoma de *P. vulgaris* los genes de las familias de transportadores *SWEET* y *SULTR* basada en los homólogos de *Arabidopsis*.
- b) Realizar un análisis filogenético de los genes de las familias *SWEET* y *SULTR*, individualmente.
- c) Localizar los genes de las familias *SWEET* y *SULTR* en los cromosomas de *P. vulgaris*.
- d) Realizar un análisis estructural de cada gen de las familias *SWEET* y *SULTR*.
- e) Localizar el sitio subcelular de las proteínas *SWEET* y *SULTR*.
- f) Identificar el motivo de las secuencias de proteínas de *SWEET* y *SULTR*.
- g) Hacer una ontología genética de datos transcriptómicos de frijol micorrizados y rizobios.
- h) Predicir y hacer un análisis funcional de elementos reguladores 'cis' sobre los promotores de genes de la familia *SWEET* y *SULTR*.
- i) Análisis de expresión específica de tejido de miembros de la familia de genes *SWEET* y *SULTR* en frijol.
- j) Realizar un análisis de redes de interacción proteína-proteína para identificar proteínas que interactúan con micorriza/rizobio-*SWEET* y micorriza/rizobio-*SULTR*.

### 3. HIPÓTESIS

Las plantas leguminosas participan en la asociación simbiótica mutualista con micorrizas y rizobios. La micorriza arbuscular es una relación simbiótica generalizada que capta los nutrientes del suelo (P, N) y el agua para alojar las plantas. Por otro lado, las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico para las plantas hospedador. A cambio, la planta huésped comparte carbono con estos simbiosistas. La simbiosis es un proceso de desarrollo complejo que involucra diferentes etapas, como la comunicación pre-simbiótica, invasión, diferenciación celular y colonización. Los genes esenciales del huésped para el establecimiento de la simbiosis se están estudiando ampliamente para comprender el mecanismo de la vía simbiótica. Hasta ahora, el papel funcional de varios genes específicos y factores de transcripción se han caracterizado en las legumbres (Roy *et al.*, 2020). Sin embargo, los transportadores inducidos por micorrizas y por rizobios que funcionan durante el establecimiento y desarrollo de la simbiosis frijol-micorrízica o frijol-rizobia, han sido poco estudiados. En una publicación reciente (Nanjareddy *et al.*, 2017), encontraron genes que son específicos para la simbiosis con micorrizas y rizobios en frijoles, se enumeraron utilizando el análisis transcriptómico global. SWEET y SULTR representan nuevas familias de proteínas de transportadores que se conservan en las plantas. SWEET media la translocación de azúcares a través de las membranas celulares y juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las respuestas al estrés. Las SULTR median la absorción y distribución de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) que es esencial para el crecimiento de las plantas. Sobre la base de los hechos anteriores, planteamos la hipótesis de que los miembros de SWEET y SULTR podrían estar involucrados tanto en la simbiosis micorrízica como en la rizobial. A través de análisis bioinformáticos de filogramas, localización cromosómica, análisis de estructura génica y análisis de motivos, así como perfiles de expresión génica de miembros SWEET y SULTR en raíces de frijol micorrizadas y noduladas, se colectó evidencia para apoyar dicha hipótesis. Además, predijimos las interacciones proteína-proteína de estos transportadores con los genes de la vía de la simbiosis.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

SWEET y SULTR representan nuevas familias de transportadoras transmembranales que se conservan en las plantas. Los transportadores SWEET media la translocación de azúcares a través de las membranas celulares y juega un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en las respuestas al estrés. Los transportadores SULTR median la absorción y distribución de sulfato ( $\text{SO}_4^2$ ) que es esencial para el crecimiento de las plantas. Por lo tanto, ambos transportadores son esenciales para su crecimiento y desarrollo. A diferencia de las otras plantas, las leguminosas establecen una simbiosis mutualista micorrícica y rizobial que beneficia a la planta huésped para obtener nutrientes importantes como fósforo y nitrógeno. Durante este proceso, las células de la raíz huésped se dividen, diferencian y re-organizan para facilitar la colonización de los simbioses. Lo más importante es que SWEET y SULTR han sido poco conocidos en relación con la simbiosis. Por este motivo, proponemos la posible implicación de transportadores SWEET y SULTR que regulen el establecimiento y desarrollo de la simbiosis frijol-micorrícica o frijol-rizobial.

Dilucidar los mecanismos de acción de los factores de transcripción responsables de la relación simbiótica sirve principalmente como reservorio que permitirá en el futuro comprender mejor cómo se lleva a cabo esta simbiosis específica y de esta manera dirigir los esfuerzos de mejoramiento genético hacia estos procesos, mejorando así la eficiencia en las plantas para atraer mejores candidatos para la captación de fosfato y fijación de nitrógeno y de esta manera beneficiar la producción de cultivos tan importantes como las leguminosas en México y el mundo.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Simbiosis de *P. vulgaris* con rizobio y micorriza

En el suelo podemos encontrar una gran cantidad y diversidad de microorganismos, por ejemplo, encontramos hasta  $10^4$  especies y  $10^9$  células por cada gramo de suelo (Turner *et al.*, 2013; Weinert *et al.*, 2011). Este sistema de microorganismos en el suelo se ven influenciados sustancialmente por las plantas que habitan ahí (Lundberg *et al.*, 2012; Tkacz *et al.*, 2015), ya que en la rizósfera llega a ser menor la carga bacteriana con respecto a otras porciones del suelo.

Un extenso número de leguminosas logran crear un tipo de simbiosis con microorganismos donde ambos comparten espacio y nutrientes, siendo principalmente con algunas Alphaproteobacterias o Betaproteobacterias (Remigi *et al.*, 2016). Este simbiosistema lleva millones de años donde han co-evolucionado y son elementales ya que proporcionan más de la mitad de los nutrientes nitrogenados en la agricultura sostenible para la alimentación (Gruber y Galloway, 2008).

El frijol común (*P. vulgaris*) es una de las leguminosas más importantes cultivada en una extensa gama de entornos y sistemas de cultivos. Este alimento fue domesticado desde hace aproximadamente 7,000 años a partir de una vid silvestre y teniendo como centro de origen los Andes del Sur y México/Centroamérica y que hoy en día forma parte de la dieta de muchas personas en el mundo, ya que aporta una alta cantidad de proteínas (Schoonhoven y Voysest, 1991; Broughton *et al.*, 2003). *P. vulgaris* es, hoy en día, cultivada en todo el mundo y es uno de los cultivos con mayor importancia junto a la soya (*Glycine max*) y el cacahuate (*Arachis hypogaea*) (Shamseldin y Velázquez, 2020). Se ha visto que bajo diferentes condiciones edafoclimáticas el frijol puede crecer, además de presentarse en variedad con un tiempo de maduración diferente, siendo las semillas de distintos colores, tamaños y formas (De Ron *et al.*, 2015). Su producción se ve reducida,

pese a su valor nutricional y económica, en comparación de otras leguminosas y esto debido a un factor clave limitante, la baja deficiencia de nitrógeno (Broughton *et al.*, 2003; Graham y Ranalli, 1997; Cernay *et al.*, 2016). A partir de que es de conocimiento que *P. vulgaris* puede fijar nitrógeno (N<sub>2</sub>) durante la simbiosis, donde interacciona con una bacteria de suelo que se conoce como rizobio. Aprovechando esta información, se ha utilizado dicha interacción para incrementar de manera significativa la producción de dicho grano (Hungria *et al.*, 2003).

La relación simbiótica entre el frijol y sus simbioses, como el rizobio o la micorriza, requiere de una comunicación a través de moléculas que intercambian señales específicas, lo que permite a la planta la asimilación del fósforo (P) y del nitrógeno (N<sub>2</sub>). Por ejemplo, *P. vulgaris* secreta unas sustancias que sirven de atracción y reconocimiento para los rizobios o el hongo micorrizico como lo son los flavonoides o las estrigolactonas, respectivamente. Estos compuestos inducen la expresión de genes específicos para proveer proteínas que servirán para la síntesis y creación de Factores de Nodulación para los rizobios o de los Factores Myc para el caso del hongo micorrizico (Andriankaja *et al.*, 2007).

### **5.1.1. Rizobio**

Uno de los organismos con más estudios durante la simbiosis es el rizobio, el cual hace esta interacción con algunas legumbres de consumo como la soya (*Glycine max*), el chícharo (*Pisum sativum*), la alfalfa (*Medicago sativa*), garbanzo (*Cicer arietinum*) y por supuesto, el frijol común (*P. vulgaris*) (Poole *et al.*, 2018). Esta bacteria es conocida por fijar el nitrógeno (N<sub>2</sub>) del suelo cuando hace simbiosis en las raíces de la planta a través de la formación de nódulos aportando de esta manera una porción importante de dicho elemento en la biósfera.

En otras partes del mundo se han encontrado microsimbioses de *P. vulgaris*, por ejemplo, *Rhizobium etli* se encontró en la testa de este grano y es debido por los centros de diversificación en América (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998), y que ha sido

encontrada esta bacteria en suelo Europeo, específicamente en España por Herrera-Cervera *et al.* (1999) y que su introducción fue probablemente hace cuatro siglos. En este mismo continente se han encontrado otras especies de *Rhizobium*, como lo son *R. leucaenae* y *R. hidalgonense*. Ahora bien, en África se han encontrado al igual que en Europa la especie *R. etli* y compartiendo con Asia esta misma, además de *R. phaseoli* y *R. tropici*, solo que con una especie más que es *R. leucaenae* (Valverde *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2014; Rouhrazi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Zinga *et al.*, 2017; Mwenda *et al.*, 2018; Rajnovic *et al.*, 2019).

Al grupo de las alfa-Proteobacterias es donde actualmente pertenecen las bacterias nodulantes de *P. vulgaris* siendo los géneros *Rhizobium*, *Pararhizobium*, *Ensifer* y *Bradyrhizobium* los que están particularmente en este grupo (Shamseldin y Velázquez, 2020). Pero se han observado que algunos géneros pertenecientes a las beta-Proteobacterias pueden nodular a este cultivo, específicamente están *Paraburkholderia* y *Cupriavidus* (Dall'Agnol *et al.*, 2017).

Como se había mencionado con anterioridad, la producción del grano de *P. vulgaris* se ve limitado por la fijación de N<sub>2</sub>, pero además este cultivo también se ve afectado en condiciones de fósforo (P) limitado en el suelo, por la sequía y la acidez del suelo incluida la toxicidad de dos elementos: el aluminio y el manganeso (Chianu *et al.*, 2011).

Para que la fijación del N<sub>2</sub> sea exitosa deben de suministrarse de manera exitosa los macro y micronutrientes ya que son importantes para el simbiosistema (Planta-Rizobio) (Musandu y Joshua, 2001). Siempre se ha hablado que para que esta fijación pueda ocurrir de una manera adecuada se asocia la planta con *Rhizobium* a través de la formación de nódulos, pero casi no se llega a mencionar que a pesar de ser competentes las diferentes especies de esta bacteria, llegan a ser en algunos casos ineficaces (Giller, 2001). Ahora bien, el fósforo es requerido para aumentar la eficiencia de nodulación y por la fijación del nitrógeno del suelo. Este elemento es utilizado en varios procesos del metabolismo, entre ellos la respiración, el proceso

de la fotosíntesis y la transducción de señales. En diferentes estudios se ha reportado que el fósforo aplicado al cultivo presenta una respuesta positiva incrementando el rendimiento, la materia seca, sobre el número de vainas (Turuko y Mohammed, 2014; Fageria y Baligar, 2016), además se vieron cambios a favor del número de los nódulos, incremento del peso y volumen (Singh *et al.*, 2008), lo que indica que este elemento sí ayuda en el proceso de fijación de  $N_2$ .

### **5.1.2. Micorriza**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son organismos que encontramos en el ecosistema presente en el suelo, estos pertenecen al linaje fúngico *Glomeromycota* (Bonfante y Genre, 2008). La importancia de estos hongos que forman la micorriza es para la obtención y el transporte de nutrientes desde el suelo hasta que la planta pueda obtenerlos y utilizarlos en sus diferentes procesos moleculares. Este tipo de interacción, donde el hongo le provee nutrientes (P, N, K, Ca, S, Zn, Cu, Sr, entre otros) que son necesarios para la planta y esta le otorga un espacio en su medio para abastecerlo de azúcares, se llama simbiosis mutualista. Dicho diálogo comienza con la exudación de estrigolactonas por parte de la planta para que con esto el hongo la reconozca, pero no todo es fácil como suena, ya que se activa una señalización de moléculas para la expresión de ciertos genes, comenzando con los factores Myc o los lipocitina-oligosacáridos y dar un extenso intercambio de nutrientes (Oldroyd, 2013).

Se conoce que los hongos pueden administrar la red transcripcional que regula el flujo y el metabolismo del nitrógeno dependiendo de su origen y la concentración en la que se encuentra bajo este elemento (ter Schure *et al.*, 2000). Nanjareddy *et al.* (2014) determinaron durante la simbiosis entre *Glomus intraradices* y *P. vulgaris* el cómo interviene el  $NO_3^-$  durante este proceso a las 3 y 6 semanas de aplicación con diferentes concentraciones de este elemento. Se encontró que hubo éxito en la infiltración de los hongos en las raíces, específicamente en la epidermis y corteza externa, además que la concentración de  $NO_3^-$  no influyó en la corteza interna para

la formación de arbusculos. También encontraron que una alta concentración de  $\text{NO}_3^-$  incita a un incremento significativo del transportador de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y de fósforo, por lo que la planta obtiene  $\text{NO}_3^-$  del exterior para dirigirlo al hospedador desde la rizósfera.

Muchas veces este tipo de colaboración resulta un total beneficio para la planta, pero hay ocasiones en las que llega a ser perjudicial para ésta, ya que se ve susceptible a un ataque de antagonistas como son tanto, microorganismos que consumen a la planta para su alimentación, o como infección (Agrawal, 2007; Walling, 2000). Por ejemplo, cuando *P. vulgaris* está en simbiosis con la micorriza y llega un patógeno, como lo es *Colletotrichum gloesporioides*, se ve que se reduce la colonización en las raíces en un 79% ó 76% (depende si son patógenos vivos o en fragmentos) a los 14 días de inoculación, según lo reportado por Ballhorn *et al.* en 2014.

## **5.2. Estudio de transcriptómica y moléculas de señalización durante la simbiosis de *P. vulgaris* con micorriza y rizobia**

Los organismos en diferentes estadios producen algunas moléculas para llevar a cabo procesos metabólicos; para producirlas existe una señalización la cual nos dirige a la producción de ARN. Es en este momento que sabemos, dependiendo el lugar, el tiempo y la condición en la que se presente, si algún gen es el que se expresa y con esto llegamos a conocer el estado bajo los factores mencionados. A este estudio sobre la concentración de ARN en la célula se le conoce como transcriptómica, dejándonos conocer como se transcribe el genoma dependiendo de las funciones celulares, y el como se ve alterada por sus diferentes estados (Fang *et al.*, 2012). ¿Para que sirve? nos detona varios fines, el primero es el clasificar los distintos tipos de ARN (ARNm, ARN no codificante y ARN pequeños); el segundo es el conocer la estructura en que los genes se transcriben, por ejemplo sus sitios de inicio 5' y 3', además de los cambios post-transcripcionales y conocer si hay algún patrón de empalme y, por último; el medir los niveles de expresión de

los genes dependiendo de el estadio de desarrollo y en la condición que se encuentre.

En un comienzo este estudio era realizado a través de microarreglos, pero debido a sus limitaciones se buscaron otras tecnologías como lo es el RNA-Seq que ayudó a bajar los costos, tenían un alta sensibilidad, mayor precisión y cobertura (Fang *et al.*, 2012).

Las plantas son seres complejos que adecuan su expresión génica como consecuencia de las señales que detectan del medio ambiente. Especialmente se nota en el momento que reconocen a los microorganismos a través de las moléculas secretadas, logrando diferenciar así entre organismos patógenos y beneficiosos. Por ejemplo, durante la simbiosis se exudan moléculas que permitirán el reconocimiento de la bacteria o el hongo y formar este simbiosistema para el hospedaje y transporte de nutrientes. Cuando se distingue esta señalización se da por comienzo a dos procedimientos genéticos guiados por la raíz, pero siendo independientes entre ellos, el primero permite la entrada de la bacteria a las células corticales y el otro, la formación del nódulo, donde se fija el nitrógeno (Oldroyd y Downie, 2008).

Dalla Via *et al.* (2015) perfilaron transcripcionalmente los genes de *P. vulgaris* regulados por las moléculas de señalización del factor de nodulación (NF), los lipopolisacáridos (LPS) o los exopolisacáridos (EPS) cuando está en simbiosis con *Rhizobium etli*. Además de caracterizar en el estudio transcriptómico con las cepas mutantes de esta bacteria durante la asimilación de LPS, EPS y NF las raíces son más susceptibles a la invasión. Sus resultados revelan que se ve alterada la expresión de genes por las moléculas de señalización situadas en la superficie o segregadas por los rizobios durante los procesos biológicos como la regulación transcripcional, la síntesis de fitohormonas, los ritmos circadianos y las respuestas de señalización. Así también, se deduce que la transcripción es regulada por las señales emitidas por la bacteria durante la simbiosis. Es importante mencionar que

se encontró que existe un sistema complejo que regula la captación de diferentes moléculas debido a la expresión diferencial de los genes durante este proceso integrado para detectar los diferentes microorganismos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Identificación, alineación y análisis de filograma de los genes *SWEET* y *SULTR* en *P. vulgaris*

La búsqueda de las secuencias génicas de *P. vulgaris* v2.1 fueron identificadas y descargadas de Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>). Para seleccionar los genes candidatos se utilizaron las secuencias de familias de genes de *SWEET* y *SULTR* de *Arabidopsis*, así como secuencias de consulta en la búsqueda de homólogos con BLASTN y BLASTP en *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Lotus japonicus*, *Populus trichocarpa* y *Vigna unguiculata* utilizando los parámetros predeterminados para *e-value* y el número de secuencias de aciertos. Todas las secuencias de proteínas no redundantes resultantes fueron comprobadas para detectar los dominios de *SWEET* y *SULTR* por SMART (Herramienta de Investigación de Arquitectura Modular Simple) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). La herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) se utilizó para analizar la longitud de las secuencias, el tamaño molecular y los valores teóricos del punto isoeléctrico (pI) de cada secuencia proteica de *SWEET* y *SULTR*.

Finalmente, la alineación de secuencias múltiple se realizó para cada familia *SWEET* y *SULTR* usando el programa ClustalW con los parámetros de defecto. El análisis de filograma de las secuencias alineadas se llevó a cabo usando el Análisis de Genética Evolutiva Molecular o MEGA X por su siglas en inglés (<https://www.megasoftware.net/>) con el método neighbor-joining (NJ), el modelo de sustitución JTT con una máxima verosimilitud con 1,000 réplicas de arranque manteniendo los parámetros de defecto. Se utilizó una herramienta bioinformática en línea para la visualización, anotación y la gestión de los filogramas resultantes, llamada iTOL V6: Interactive Tree Of Life (<https://itol.embl.de/>).

## **6.2. Características estructurales de los genes y localización en los cromosomas**

Para conocer cómo estaban estructurados los genes en los niveles de exón-intrón se analizaron las secuencias nucleicas con apoyo de una plataforma en línea denominada como el Servidor de Visualización de Estructura Genética o GSDS, por sus siglas en inglés (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). Además, se utilizaron las opciones de edición de este servidor para poder editarla en cuestión de cambio de colores y líneas para un mejor entendimiento.

Mientras tanto, para conocer en dónde se localizan cada una de las secuencias se determinaron las posiciones físicas de cada una de las secuencias genéticas de las familias *SWEET* y *SULTR* en los cromosomas de *P. vulgaris* de acuerdo con la base de datos en Phytozome v12 y comprobado con otras bases de datos para este mismo organismo como el Sistema de Información sobre Legumbres (LIS por sus siglas en inglés; <https://legumeinfo.org/>), el Centro Nacional para la Información (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=phaseolus+vulgaris>) y Ensembl Plants ([https://plants.ensembl.org/Phaseolus\\_vulgaris/Info/Index](https://plants.ensembl.org/Phaseolus_vulgaris/Info/Index)). Por otro lado, la posición de los centromeros de cada cromosoma se diseñó con base en el estudio de Fonsêca *et al.* (2010) y la escala se determinado con base en lo escrito por Wang *et al.* (2016).

## **6.3. Hélices transmembranales y análisis de hidrofobicidad de las proteínas SWEET y SULTR**

La predicción de las hélices transmembranales de las proteínas SWEET y SULTR en *P. vulgaris* fue por el servidor TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) utilizando las secuencias peptídicas. El carácter hidropático de las proteínas se analizó con el programa ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) con el parámetro de Kyte y Doolittle (1982). El

promedio de hidropaticidad de las familias de genes SWEET y SULTR se analizó con ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) utilizando los criterios de puntuación de Gasteiger *et al.* (2005). El gran promedio del valor de hidropaticidad (GRAVY) para las proteínas se calculó sumando los valores de hidropatía de los aminoácidos en su totalidad y dividido por la cantidad de los residuos de cada secuencia. A continuación, se utilizó la herramienta Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) para identificar la localización subcelular de las proteínas en diversos orgánulos y vías celulares.

#### **6.4. Análisis del promotor y anotación GO de los genes SWEET y SULTR**

Se tomaron de las secuencias de nucleótidos los 2,000 pares de bases de las regiones promotoras río arriba a la región codificadora de cada gen *SWEET* y *SULTR*, las cuales se descargaron de la base de datos Phytozome v12.1 del genoma de *P. vulgaris*. Para realizar el análisis *in silico* de las secuencias promotoras tomadas en el punto anterior se utilizó el programa bioinformático disponible en línea PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) para identificar los elementos reguladores en *cis* de los promotores de *SWEET* y *SULTR*. Todos los datos fueron enviados en formato HTML con los que se pudo visualizar cada secuencia y conocer estos elementos reguladores en *cis*.

Para conocer la Ontología Génica (GO) enriquecida, se realizó un análisis donde se usaron dos plataformas bioinformáticas en línea, la primera fue AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>), que está enfocada especialmente a especies de uso agrícola, donde se aprovechó la herramienta de Análisis de Enriquecimiento Singular (SEA) utilizando los número de indentificación tomados desde Phytozome v12.1 para cada una de las familias de este estudio en *P. vulgaris*. Después, los datos entregados se utilizaron en la plataforma REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) para

eliminar los términos de GO que son redundantes. Los resultados obtenidos de este proceso se representan más adelante de manera gráfica.

### **6.5. Análisis *In Silico* de los perfiles de expresión de los genes de las familias SWEET y SULTR en distintos tejidos y los patrones de expresión en raíces noduladas y micorrizadas**

Se realizó un perfil transcriptómico global de secuenciación nueva generación del Ion Torrent en raíces de *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa colonizadas con esporas de *Rhizophagus irregularis* [Symplanta®, Alemania], o con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* por Nanjareddy *et al.*, (2017), del cual se proporcionaron los datos obtenidos en dicho estudio transcriptómico para analizar los perfiles de expresión de los genes de las familias *SWEET* y *SULTR* bajo ambas condiciones de simbiosis (rizobia-frijol y micorriza-frijol) de esta investigación. En este estudio, los datos transcriptómicos se normalizaron utilizando el enfoque de lecturas por kilobases de transcripción por 1 millón de lecturas mapeadas (RPKM).

Adicional a este estudio, se consultaron en el atlas de *P. vulgaris* (<http://plantgrn.noble.org/PvGEA/>) los perfiles de expresión de estas dos familias de genes en los diferentes tejidos de la planta de interés con distintas condiciones (p.e.: provistas con fertilizantes, inoculadas con rizobio, etc.) en los diferentes estadios (p.e.: flores jóvenes, en la etapa trifoliar, antes de formación floral, etc.).

Para ambos casos, se contruyeron mapas de calor con los datos de los perfiles de expresión de ambos análisis mediante el lenguaje de programación Python (<https://www.python.org/>), utilizando como base el siguiente código:

### Instalación de bibliotecas:

```
In [1]: pip install pandas
```

```
In [2]: pip install seaborn
```

### Importación de bibliotecas:

```
In [3]: import pandas as pd

import seaborn as sns

import matplotlib.pyplot as plt

from pylab import savefig
```

### Conversión del archivo en formato *.csv* a un *Data Frame*

```
In [4]: df = pd.read_csv('C:\\Alberto\\...\\Transcript.csv', index_col=0)

df.head()
```

### Mapa de calor correspondiente

```
In [5]: plt.figure(figsize = (27, 5))

mapa = sns.heatmap ( df, cmap = 'GREEN')

figure = mapa.get_figure()

figure.savefig ('Mapa de Calor', dpi = 400)
```

## 6.6. Interactoma proteína-proteína de las familias SWEET y SULTR con los factores de nodulación y micorrización

Se realizó un análisis de interacción proteína-proteína, la cual se llevó a cabo mediante la herramienta en línea de búsqueda para la recuperación de genes que interactúan, STRING (<https://string-db.org/>). Como base de datos, se analizaron las secuencias de proteínas de cada una de ambas familias de genes, *SWEET* y *SULTR*, que estaban sobreexpresados en el análisis transcriptómico durante la micorrización y nodulación.

Las proteínas seleccionados fueron SWEET22 y SULTR2 para la condición de nodulación, mientras que para la condición de micorrización se seleccionaron los genes SWEET23 y SULTR3. Para hacer el estudio de la interacción, se seleccionaron las proteínas descritas por Roy *et al.* (2017) que fueron el resultado de un estudio sobre los SNF validados funcionalmente en diferentes leguminosas, como *M. truncatula*, *L. japonicus*, *G. max* y *P. vulgaris*, donde se validaron a través de un análisis mutacional (mutagénesis EMS, mutagénesis de rayos  $\gamma$ , LORE1, RNAi, CRISPR-Cas9, etc.) en distintas etapas de nodulación y fijación de nitrógeno.

Se realizaron un total de 207 interacciones por cada gen seleccionado con cada uno de los genes validados en el estudio de Roy *et al.* (2017). Se aceptaron los valores de referencia arrojados por la plataforma STRING utilizada en este ensayo.

Para finalizar, de todas las interacciones arrojadas se elaboró un Diagrama de Venn Euler para conocer las proteínas de interés que también interactúan con las de nodulación y micorrización mediante una herramienta en línea para bioinformática (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Se clasifican en clados los genes de las familias *SWEET* y *SULTR* de *P. vulgaris*

La identificación de los genes *SWEET* y *SULTR* en el genoma de *P. vulgaris* se realizó en base a la homología de proteína con los genes identificados de la familia *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2014; An *et al.*, 2019) y *Arabidopsis thaliana* (Buchner *et al.*, 2004; Xuan *et al.*, 2013). Un total de 24 miembros de la familia de genes *PvSWEET* y 15 para la familia *PvSULTR* fueron identificados en el genoma de *P. vulgaris* (Tabla 1 y 2). Los Modelos ocultos de Markov (HMM) para las proteínas *PvSWEET* se determinaron sobre la base de la presencia de dos dominios *MtN3/saliva*, y para las proteínas *PvSULTR* los dominios *Sulfate\_transp* y *STAS* (después del Transportador de Sulfato y el antagonista del factor AntiSigma, en inglés) en la base de datos de Pfam. Los miembros de ambas se nombraron de acuerdo a su posición cromosómica empezando por el cromosoma uno al once. La numeración fue desde el brazo corto hacia el brazo largo, comenzando por los extremos proximales y distales de los respectivos brazos. La longitud de las proteínas *PvSWEET* oscilaban entre 145 y 304 aminoácidos, mientras *PvSULTR* presentaba entre 625 y 709. El peso molecular (PM/kDa) para *PvSWEET* era de entre 22.14 y 34.5 kDa, y para *PvSULTR* entre 68.12 y 77.63 kDa. El punto isoeléctrico teórico (pI) de la mayoría de las *PvSWEET* era alcalino (7.55 - 9.80), y solo una, *PvSWEET14*, ligeramente ácida (6.58). Para *PvSULTR*, todas las secuencias peptídicas fueron alcalinas en un rango de 8.49 a 9.66.

Para entender las relaciones evolutivas de los genes *SWEET* y *SULTR* en *P. vulgaris*, se alinearon las secuencias proteicas mediante ClustalW que fueron utilizadas para contruir el filograma con MEGA X. Las 24 proteínas de *PvSWEET* se clasificaron en cuatro clados, siendo el clado I, el clado II y el clado III presentaban 6, 7 y 10 proteínas, respectivamente, mientras que en el clado IV solo

tenía 1. Entre las 15 proteínas *PvSULTR* estaban en también cuatro clados. El clado I contenía 3 miembros, el clado II 4 miembros, el clado III presentaba la mayoría de miembros con 7, mientras que el clado IV con la minoría, solo 1 miembro (Figura 5a y 5b). En la familia *PvSWEET* se encontraron 8 pares paralogos, y en la familia de genes *PvSULTR* hay 6 pares paralogos.

**Tabla 1.** Genes de la familia del gen *PvSWEET* en *P. vulgaris*.

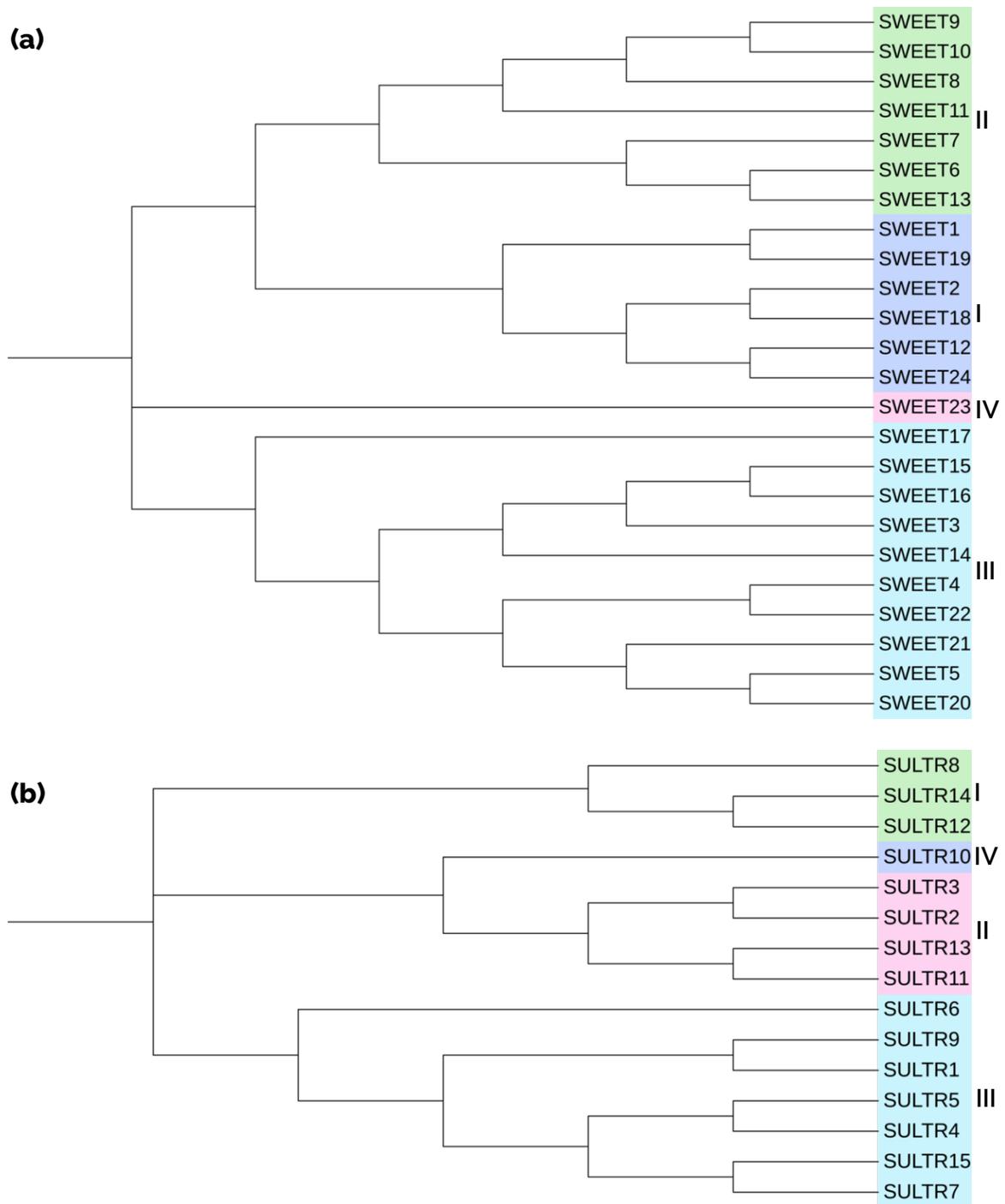
ID del gen *	Nombre del gen **	Tamaño del gen, pb	Tamaño del transcrito, pb	Tamaño CDS, pb	Tamaño de la proteína, aa	pl	PM (kDa)
Phvul.001G061900	SWEET1	2386	738	758	245	9.37	27.24
Phvul.001G064300	SWEET2	3279	756	1465	251	9.11	27.27
Phvul.002G203600	SWEET3	1975	822	945	273	8.76	30.41
Phvul.002G283800	SWEET4	2134	915	1342	304	9.16	34.5
Phvul.002G283900	SWEET5	2402	777	1274	258	9.73	28.87
Phvul.002G300900	SWEET6	3586	750	1171	249	9.47	27.58
Phvul.003G199300	SWEET7	1747	690	930	229	9.32	26.22
Phvul.004G017100	SWEET8	1738	735	735	244	8.75	27.29
Phvul.004G017200	SWEET9	1759	735	735	244	8.62	27.23
Phvul.004G017300	SWEET10	1255	687	687	228	8.94	25.77
Phvul.004G017400	SWEET11	9516	738	917	245	8.93	27.16
Phvul.005G076300	SWEET12	2999	708	1452	235	8.86	26.29
Phvul.006G000600	SWEET13	1164	780	780	259	9.08	28.54
Phvul.006G210800	SWEET14	2262	822	1097	273	6.58	29.92
Phvul.008G001100	SWEET15	2714	813	1117	270	8.93	30.47
Phvul.008G001200	SWEET16	1579	819	1026	272	8.64	30.73
Phvul.008G007600	SWEET17	1995	780	1102	259	8.63	29.05
Phvul.009G134300	SWEET18	2812	744	1357	247	9.68	27.25
Phvul.009G137700	SWEET19	1774	765	1093	254	9.07	28.23
Phvul.009G162700	SWEET20	2280	795	1290	264	9.31	29.79
Phvul.009G162800	SWEET21	7454	588	588	195	9.8	22.14
Phvul.009G162900	SWEET22	2186	876	1364	291	7.55	32.54
Phvul.009G249700	SWEET23	3305	738	1034	245	8.38	27.07
Phvul.011G168100	SWEET24	1868	708	1312	235	8.98	26.18

\*ID del gen de Phytozome; \*\*Nomenclatura basada en localización en cromosoma de *PvSWEET* (Figura X). bp – Pares de bases; CDS – Secuencia codificante; aa – Aminoácidos; pl – Punto isoeléctrico; PM - Peso molecular; kDa – Kilodaltons.

**Tabla 2.** Genes de la familia del gen *PvSULTR* en *P. vulgaris*.

ID del gen *	Nombre del gen **	Tamaño del gen, pb	Tamaño del transcrito, pb	Tamaño CDS, pb	Tamaño de la proteína, aa	pI	PM (kDa)
Phvul.001G154200	SULTR1	7288	2393	1962	653	8.81	72.29
Phvul.001G250700	SULTR2	6890	2340	1962	653	9.11	71.04
Phvul.001G250800	SULTR3	5666	2401	2016	671	9.35	73.29
Phvul.002G095200	SULTR4	5573	1887	1887	628	8.7	68.12
Phvul.002G095300	SULTR5	6952	2323	1944	647	9.21	70.67
Phvul.004G161600	SULTR6	6509	2377	1959	652	8.49	71.78
Phvul.005G171800	SULTR7	4524	2339	1965	654	9.66	72.03
Phvul.006G207800	SULTR8	3997	2323	1977	658	9.48	71.65
Phvul.007G174100	SULTR9	8208	2437	1983	660	8.83	73.41
Phvul.008G015600	SULTR10	8282	2548	2130	709	8.65	77.63
Phvul.008G170700	SULTR11	4560	2440	1965	654	9.38	71.55
Phvul.008G170800	SULTR12	7508	3017	1977	658	8.52	72.24
Phvul.009G028400	SULTR13	4418	2454	1965	654	9.38	71.55
Phvul.009G028500	SULTR14	6568	3034	1986	661	9.24	72.68
Phvul.010G151000	SULTR 15	4445	2342	1998	665	9.34	73.01

\*ID del gen de Phytozome; \*\*Nomenclatura basada en localización en cromosoma de *PvSULTR* (Figura 5b). bp – Pares de bases; CDS – Secuencia codificante; aa – Aminoácidos; pI – Punto isoeléctrico; PM - Peso molecular; kDa – Kilodaltons.

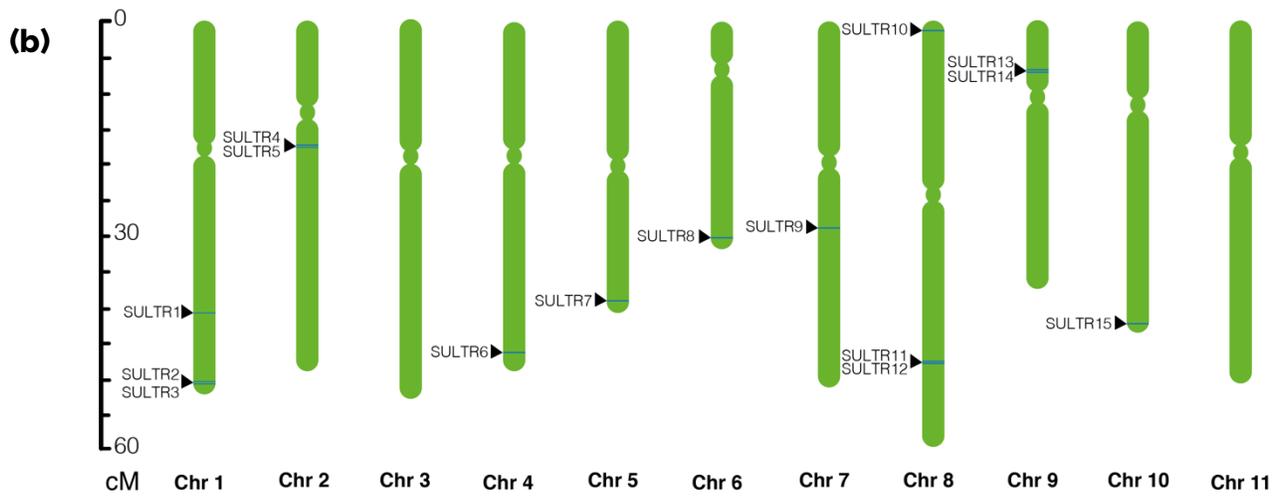
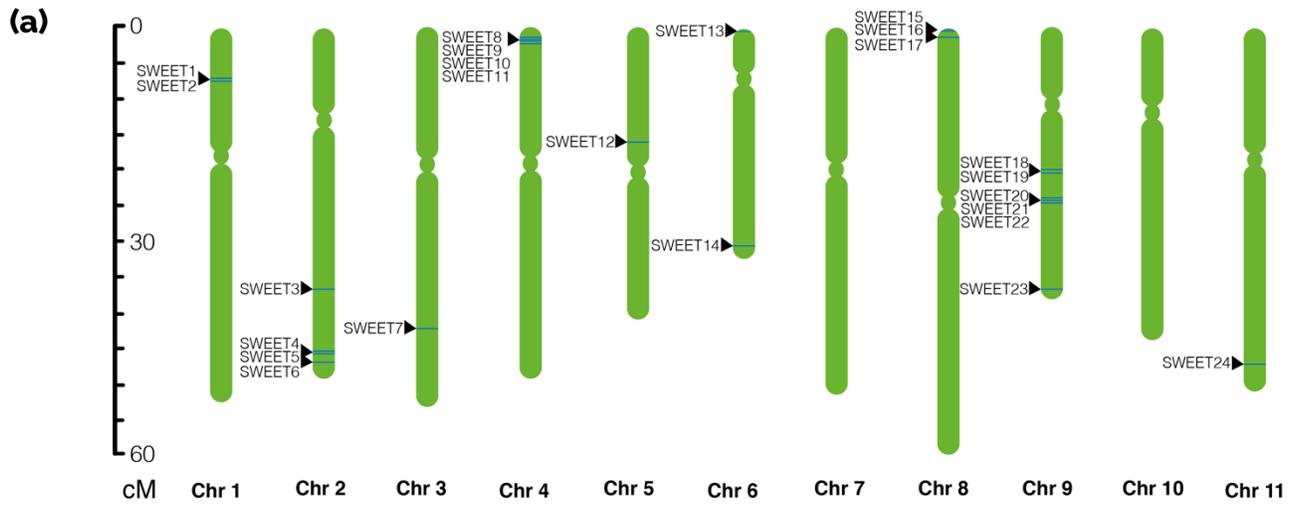


**Figura 5.** Filograma de los genes *PvSWEET* y *PvSULTR* de *P. vulgaris*. Las 24 secuencias identificadas por homología de (a) SWEET y las 15 secuencias de (b) SULTR de *P. vulgaris* se alinearon con ClustalW y se construyó un filograma utilizando MEGA X con el método de unión de vecinos (NJ) con 1000 valores de bootstrap.

## **7.2. Los genes de las familias SWEET y SULTR se están distribuidos a lo largo de los cromosomas de *P. vulgaris***

Se encontraron 24 genes de *PvSWEET* y 15 de *PvSULTR*, los cuales fueron ubicados en los cromosomas de *P. vulgaris* por medio de Phytozome v12.1. Se pudo observar que, entre los 11 cromosomas, chr3, chr5 y chr11 cuenta con un sólo gen *PvSWEET*. Dos de estos mismos genes estaban localizados en chr1, tres genes en chr8, cuatro genes estaban presentes en chr2 y chr4. Notamos que en el chr9 teníamos una mayor densidad de genes *PvSWEET* en el brazo largo, contando con 6 genes en total. Estos genes estaban ausentes en chr7 y chr10. Aproximadamente, el 54% de los genes *PvSWEET* estaban localizados en los brazos largos de los cromosomas (Figura 6a).

Pudimos notar que se encontraban 3 genes *PvSULTR* en los chr1 y chr8, dos genes en chr2 y chr9. Sólo se localizó un gen en los chr4, chr5, chr6, chr7 y chr10 en los brazos largos. Sin embargo, los genes *PvSULTR* estaban ausentes en los chr 3 y 11. Se encontró el 80% de los genes *PvSULTR* en los brazos largos de los cromosomas (Figura 6b).

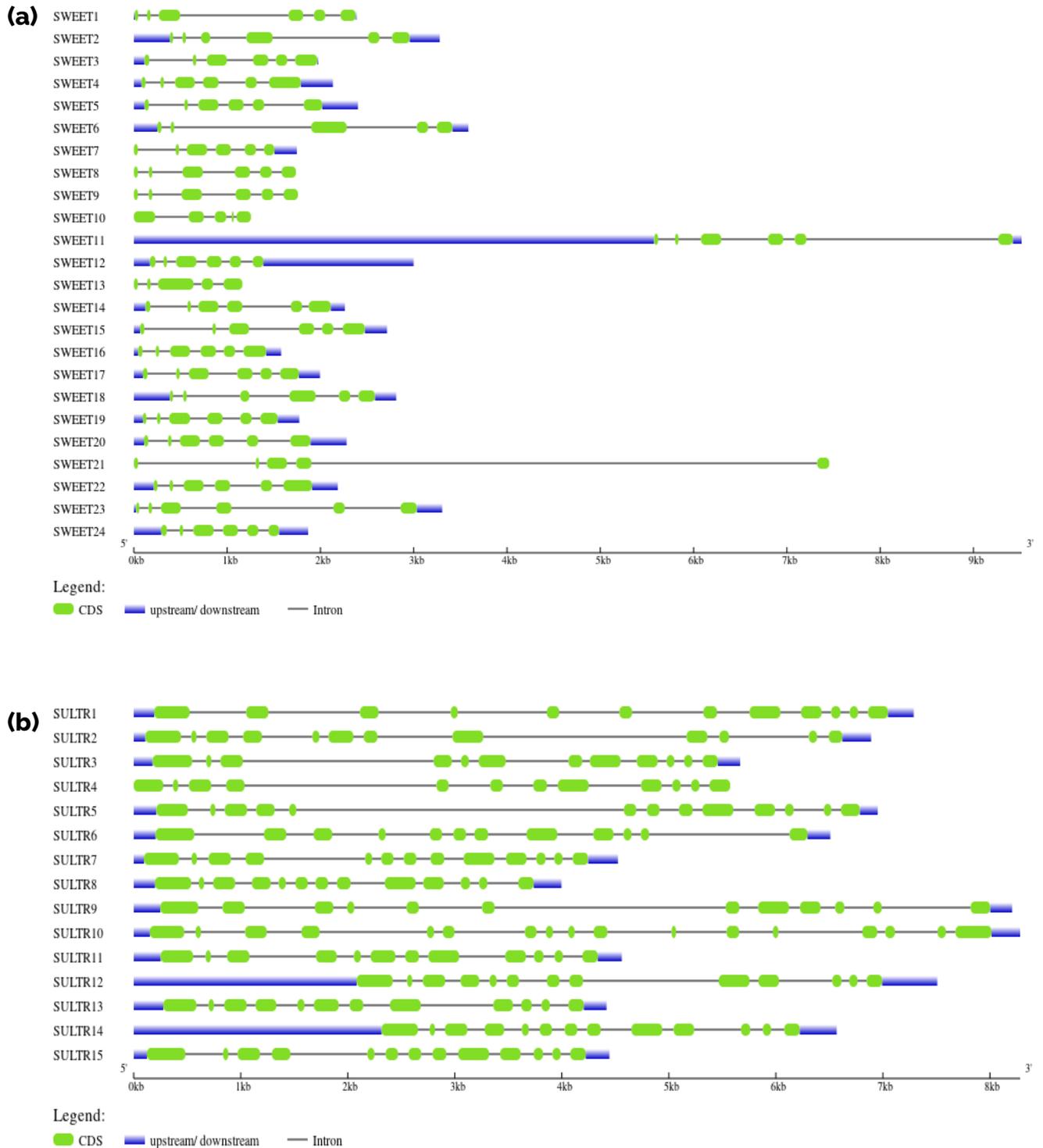


**Figura 6.** Distribución cromosómica de las familias de genes *PvSWEET* y *PvSULTR* en el genoma de *P. vulgaris*. Se identificaron las secuencias de 24 genes (a) *PvSWEET* y 15 genes (b) *PvSULTR*. Los cromosomas están representados por las barras verdes distribuidas numéricamente. Las bandas azules con triángulos negros señalan la ubicación de cada gen en el cromosoma.

### 7.3. Análisis estructural de los genes *SWEET* y *SULTR* de *P. vulgaris*

Para entender las características estructurales de los genes *SWEET* y *SULTR* de *P. vulgaris*, analizamos la distribución intrón-exón y los motivos conservados. El análisis de la localización de los exones intrínsecos utilizando la base de datos GSDS mostró que el número y la distribución de las localizaciones de los exones intrínsecos estaban muy conservados entre los homólogos de cada familia en *P. vulgaris* (Figura 7). Los genes *PvSWEET* exhibían 5 ó 6 exones por gen. *SWEET11* y *SWEET12* muestran intrones muy grandes en comparación con otros miembros. Mientras que los genes *PvSULTR* contaban con un rango de 12 a 17 exones por gen. Sin embargo, no se observaron diferencias contrastadas en la longitud del intrón entre los miembros de *PvSULTR*.

La predicción de la estructura secundaria de las 24 proteínas *PvSWEET* descubrió que el 41.63 % son  $\alpha$ -hélices, el 20.24 % son de cadena extendida y el 34.67 % son bobinas aleatorias. El mayor porcentaje de  $\alpha$ -hélice lo contenía la *PvSWEET24* con un 49.79 %, mientras que la *PvSWEET8* mostró la menor cantidad, con un 34.84 % de  $\alpha$ -hélice. El *PvSWEET8* tuvo el mayor porcentaje de cadena extendida con un 27.05 % y el *PvSWEET24* tuvo el menor con un 27.23 %. En el caso de de las proteínas de la familia *PvSULTR* se obtuvo un 50.55 % de  $\alpha$ -hélices, de cadena extendida son 19.55 % y para bobinas aleatorias se reveló el 30.47 %. La proteína que tuvo menor porcentaje de conformación  $\alpha$ -hélice fue *PvSULTR10* con 47.36 % y un mayor porcentaje fue de 53.65 % para *PvSULTR3*. En la conformación de cadena extendida *PvSULTR12* presentó el mayor porcentaje con 15.80 % y *PvSULTR5* el menor con 13.42 %.



**Figura 7.** Análisis de la estructura genética de los transportadores de azúcar (SWEET) y transportadores de azufre (SULTR) en *P. vulgaris*. Se analizaron las estructuras intrón-exón de los genes (a) *PvSWEET* y (b) *PvSULTR* utilizando la base de datos Gene Structure Display Server (GSDS). Los exones/secuencias codificantes (CDS) están representados por barras verdes, los intrones por líneas grises, y las regiones no traducidas (UTR) aguas arriba (5')/aguas abajo (3') son barras azules.

#### **7.4. Regiones transmembranales de las proteínas SWEET y SULTR**

Para las 24 proteínas SWEET y las 15 proteínas SULTR de *P. vulgaris* se analizaron las hélices transmembranales con el servidor Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>). Durante este análisis, se encontraron que 23 de las 24 proteínas descritas para la familia PvSWEET cuentan con 7 dominios transmembranales, mientras que sólo la proteína PvSWEET21 cuenta con 6 dominios transmembranales. Para el caso de la familia PvSULTR, el número de los dominios transmembranales estaban en un rango de 7 hasta 14. El análisis de hidrofobicidad se llevó a cabo para predecir si un segmento peptídico es suficientemente hidrofóbico para interactuar o residir en el interior de la membrana. Los resultados de GRAVY mostraron valores que oscilaban entre 0.285 y 1.032 para todas las proteínas PvSWEET (Tabla A1); y para las proteínas PvSULTR oscilaban entre 0.296 y 0.569 (Tabla A2). Para determinar las regiones hidrofóbicas de ambas familias de proteínas, PvSWEET y PvSULTR, se analizaron mediante ProtScale, donde los resultados coinciden con las hélices transmembranales ya descritas.

#### **7.5. Las proteínas SWEET y SULTR de *P. vulgaris* en membranas subcelulares**

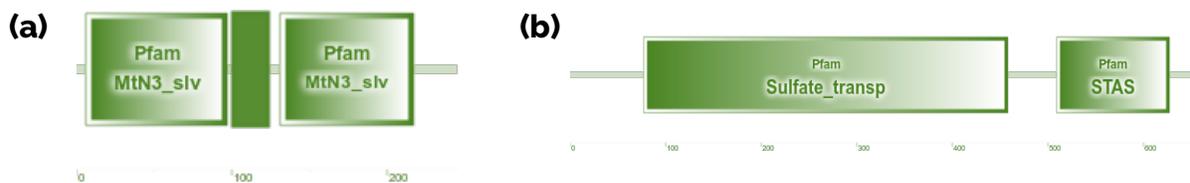
Para predecir la disposición y conocer la ubicación de los sitios de corte de la péptido señal de proteínas de ambas familias transportadoras, PvSWEET y PvSULTR, se utilizó el servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>), que se basa en la unión de una múltiple red neuronal artificial. El análisis anterior mostró que ninguna secuencia de aminoácidos de ambas familias contaban con la presencia de péptido señal (Figura A3 y Figura A4).

Para conocer la ubicación subcelular de las proteínas PvSWEET y PvSULTR se utilizó el software Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>).

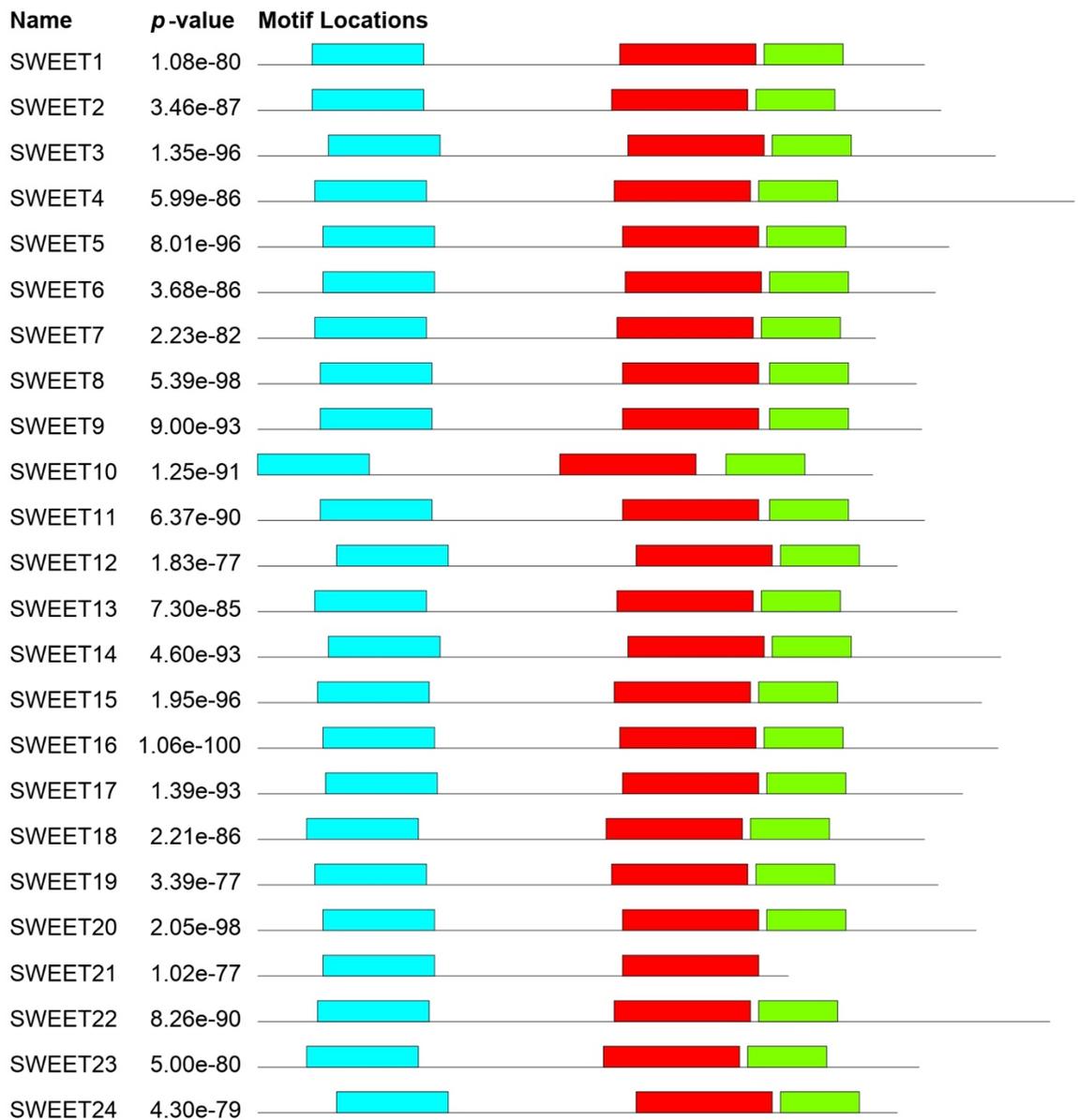
Este análisis nos señaló que la familia *PvSWEET* se situaba en la membrana plasmática la mayoría de sus proteínas, pero se encontró a *PvSWEET16* localizado en el cloroplasto, mientras que *PvSWEET4*, 17 y 22 estaban en ambos (membrana plasmática y cloroplasto). En el caso de la familia *PvSULTR*, encontramos también a la mayoría de las proteínas en la membrana plasmática, siendo sólo *PvSULTR10* la que se encontró en el cloroplasto.

## 7.6. Identificación de los dominios y motivos de secuencias de proteínas SWEET y SULTR

Los dominios obtenidos a través de la herramienta *SMART* destacan en las proteínas *PvSWEET* un dominio duplicado de *MtN3\_slv* (Transportador de eflujo de azúcar para intercambio intercelular; Pfam: PF03083; Figura 8a). Para la familia *SULTR* se obtuvieron dos motivos característicos (Figura 8b), el primero fue *Sulfate\_transp* (Familia de permeasas de sulfato; Pfam: PF00916) y el segundo *STAS* (Transportador de sulfato y el antagonista del factor anti-sigma; Pfam: PF01740). La alineación de las secuencias proteicas *PvSWEET* mostraron un dominio duplicado, y en *PvSULTR* resultaron 2 dominios. El análisis de los motivos conservados de las proteínas de la familia *PvSWEET*, mediante el servidor *MEME*, mostró 3 motivos (Figura 9). Para la familia *PvSULTR* se observaron 9 motivos (Figura 10).

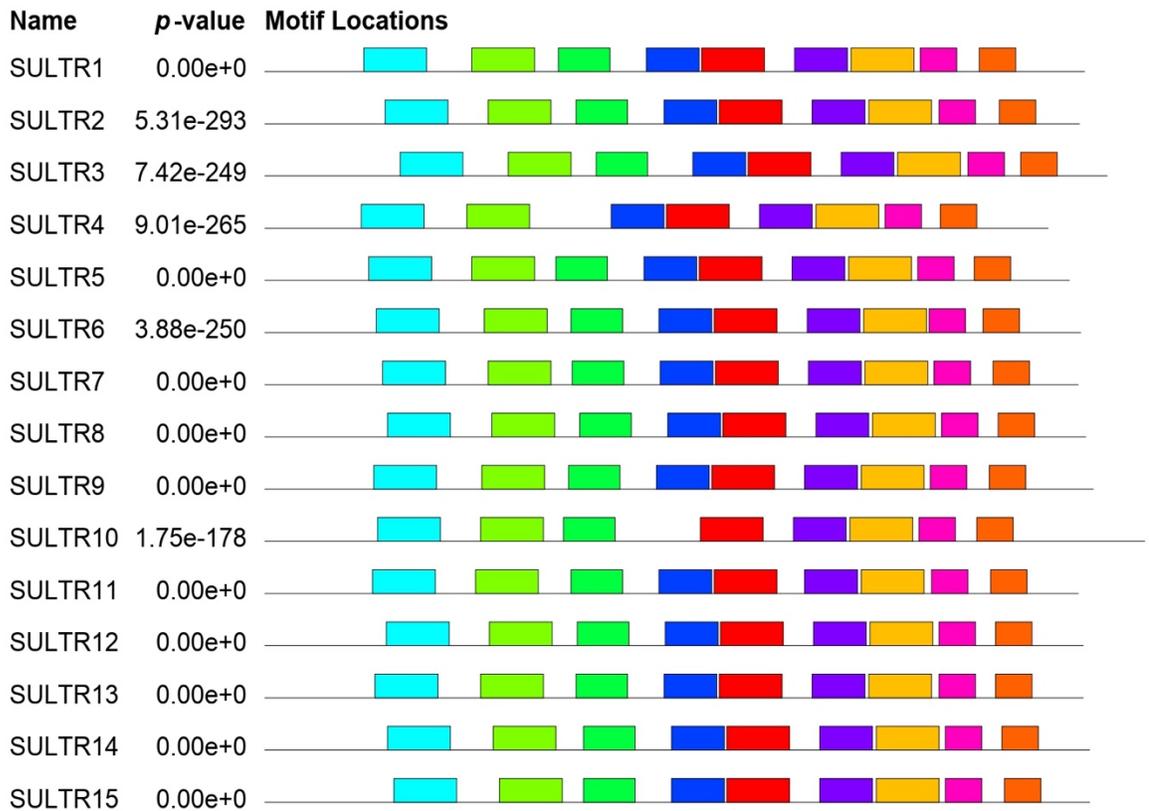


**Figura 8.** Identificación de dominios en las secuencias de proteínas (a) SWEET y (b) SULTR. Se utilizó SMART para identificar dominios en las familias proteicas de SWEET y SULTR de *P. vulgaris*. Se muestran el dominio duplicado de SWEET (*MtN3\_slv*) y los dominios de SWEET (*Sulfate\_transp* y *STAS*).



Motivo	Símbolo	Consenso de motivos
1.		GWICVFNISMYASPLSIMKKVIKTKSVEFMPFSLSLFLFLNAIMWFTYG
2.		LAPLPTFYRIIKKKSTEGFQSLPYIAALLNCMLWLYYGLPK
3.		RDIFVAIPNGLGTVLGLIQLILYAIYRNG

**Figura 9.** Identificación de motivos en las secuencias de proteínas SWEET. Se utilizó MEME para identificar motivos en los 24 genes SWEET de *P. vulgaris*. Los motivos significativamente sobrerrepresentados de manera gráfica con barras correspondientes a su posición predicha. Las barras azul, roja y verde representan los dominios *Mtn3\_slv* (PF03083).



Motivo	Símbolo	Consenso de motivos
1.		KNYQLDGNKEMMAJGLMNI VGS L TSCYVTTG S FSRSAVNYNAGCKTAVSN
2.		DLIAGLTIASLAIPQGISYAKLANLPPIYGLYSSFVPPLIYAVMGSSRDJ
3.		TFFAGIFQAALGILRLGFLIDFLSHATJVGFMAGAAI IIGLQQLKGLLGI
4.		I L A A I I I S A V I G L I D Y E A A I L J W K V D K F D F L A C L G A F F G V L F
5.		E I G L L I A V A I S F A K I L L Q V T R P R T A V L G K J P G T T I Y R B V E Q Y P E A T R V P G
6.		HHEWNWZTFVJGFSFLAFLLVTRYIGKKNPKLEFWVSAIAPL
7.		JNPPSVNKLYFHGPYLG LA I K I G L I T G I J A L T E G I A V G R S F A
8.		VDAPIYFANANYVKERILRWVSEEEERIK
9.		BIDTSGISALEELKKSLEKRGVQLVLANP

**Figura 10.** Identificación de motivos en las secuencias de proteínas SULTR. Se utilizó MEME para identificar motivos en las 15 proteínas SULTR de *P. vulgaris*. Los motivos significativamente sobrerrepresentados de manera gráfica mediante barras correspondientes a su posición predicha. Las barras roja, azul claro, verde, púrpura, verde oscuro y azul oscuro (motivos 1,2,3,4,6 y 7, respectivamente) representan el dominio *Sulfate\_transp* (PF00916). Las barras rosa y naranja (motivos 8 y 9, respectivamente) representan el dominio *STAS* (PF01740). La barra amarilla pertenece a la familia de dominios de función desconocida (DUF5493).

## **7.7. Análisis del promotor en las familia de genes *SWEET* y *SULTR***

Para conocer sobre la función potencial y regulación transcripcional de los genes *PvSWEET* y *PvSULTR* se estudiaron los elementos reguladores en *cis* de las secuencias promotoras usando los 2,000 pb río arriba de cada uno de los genes mediante un análisis en el software PlantCARE.

En la familia *PvSWEET* se identificaron 97 motivos (Figura 11) para estas regiones promotoras, clasificados en siete grupos funcionales: elementos que responden a la luz, regulación hormonal, respuesta al estrés, desarrollo celular, región promotora del núcleo y elementos de función desconocida; de los cuales hay 27 elementos implicados de respuesta a la luz, como 3-AF1 binding site, ACE, AE-box, AT1-motif, ATCT-motif, Box 4, G-box, GA-motif, GT1-motif, TCT-motif, Sp1 y I -box, lo que señala que estos genes de esta familia podrían intervenir sobre la actividad de la fotosíntesis. También se presentaron 10 elementos de respuesta hormonal, como los reguladores de auxina (AuxRE, AuxRR-core y TGA-element), los elementos de respuesta a giberelinas (P-box, GARE-motif y TATC-box), los elementos implicados en la capacidad de respuesta al jasmonato de metilo (CGTCA-motif y TGACG-motif), se notó un elemento de acción a la respuesta al ácido abscísico (ABRE) y también un elemento de respuesta al ácido salicílico (TCA-element).

Asimismo, se encontraron elementos específicos del desarrollo de órganos/tejidos de la planta (desarrollo celular), como CAT-box, circadian, GC-motif, GCN4\_motif, HD-Zip 1, MBSI, MSA-like, O2-site y RY-element. Y por último, en un cuarto grupo, tenemos 5 elementos regulados por las respuestas al estrés, como LTR implicado a la capacidad de respuesta a bajas temperaturas, el elemento MBS que es un sitio de unión de MYB participe en la inducibilidad de la sequía, el elemento regulador ARE esencial para la inducción anaeróbica, a TC-rich repeats involucrado en la defensa y la respuesta al estrés, y por último al elemento AT-rich repeats para la activación máxima mediada por inductores (2 copias).

Los elementos reguladores en *cis* más predominantes fueron los motivos TATA-box y CAAT-box encontrados en las regiones promotoras de *PvSWEET* con 2577 y 1526 cada uno, respectivamente.

Por otro lado, se identificaron un total de 83 elementos reguladores que actúan en el *cis* en los genes *PvSULTR* (Figura 12). Los elementos se clasificaron funcionalmente en siete grupos: elementos que responden a la luz, regulación hormonal, respuesta al estrés, desarrollo celular, región promotora del núcleo y elementos de función desconocida.

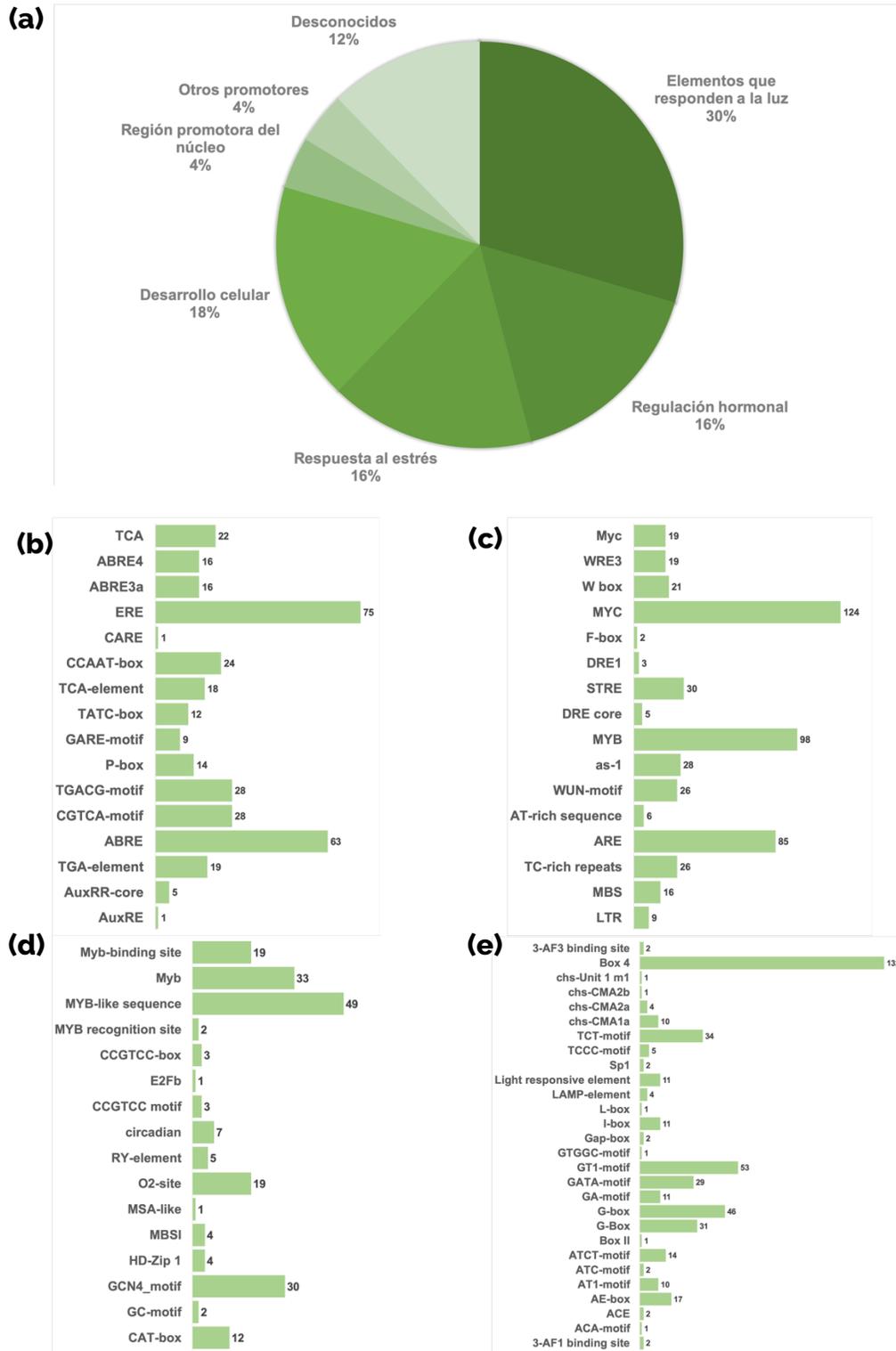
Entre los elementos involucrados en respuesta a luz se encontró al elemento Box4, que estuvo presente en la mayoría de los genes con excepción en *PvSULTR13*, así como los elementos regulatorios TCT-motif, G-box, GT1-motif, GATA-motif, entre otros.

En el grupo de regulación hormonal se identificaron aquellos elementos que participan en la respuesta a auxinas (AuxRR-core y TGA-element), ácido salicílico (TCA-element), jasmonato de metilo (CGTCA-motif y TGACG-motif), giberelina (GARE-motif, P-box, TATC-box y CARE), ácido abscísico (ABRE, ABRE3a y ABRE4) y al etileno (ERE).

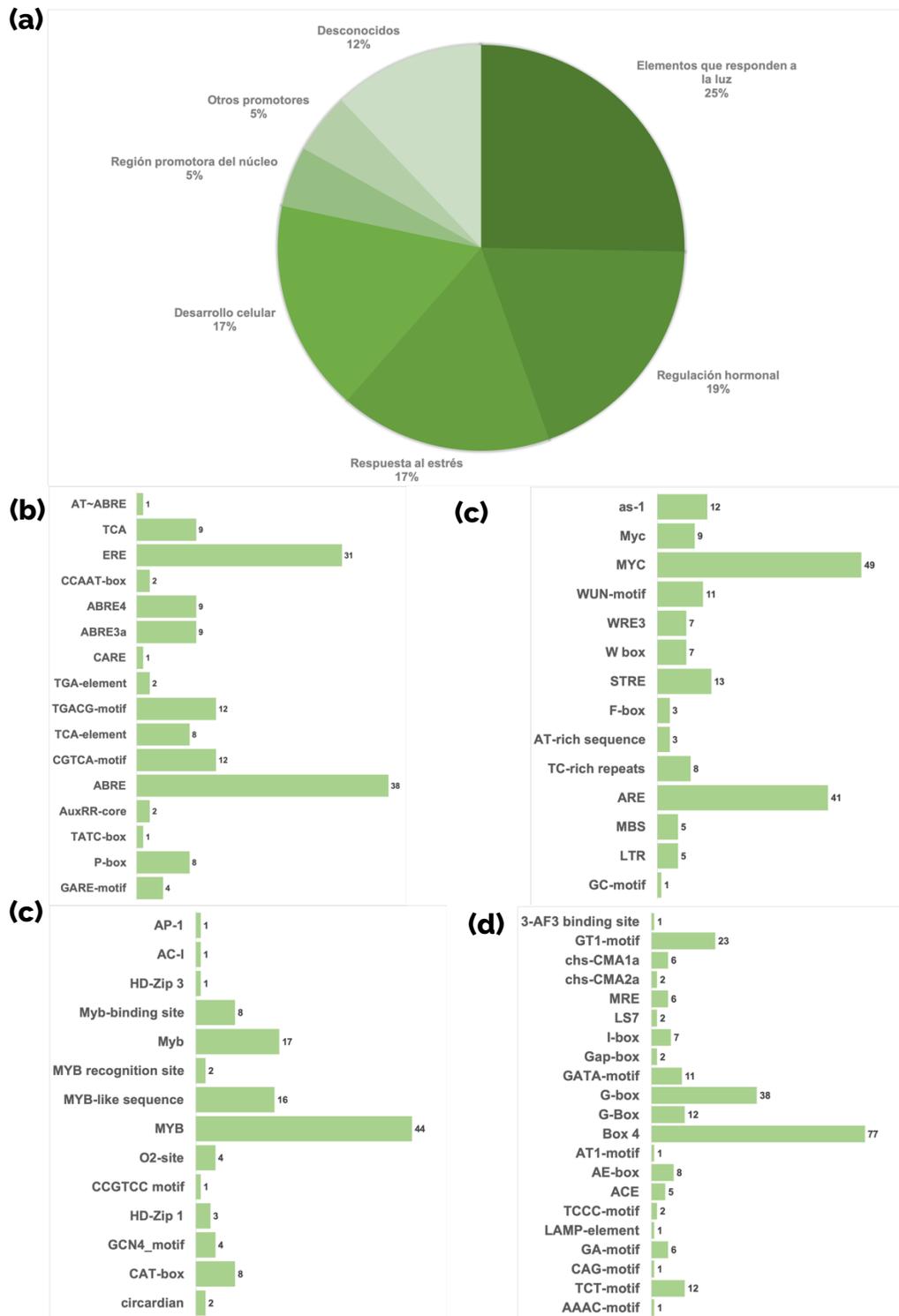
El grupo que responde al estrés comprende a 14 elementos (17% del total de los elementos encontrados en *PvSULTR*) que juegan un papel importante en la defensa y respuesta al estrés (TC-rich repeats y STRE), la capacidad de respuesta a bajas temperaturas (LTR), la inducibilidad específica a la anoxia (GC-motif), la inducibilidad a la sequía (MBS y as-1), la inducción anaeróbica (ARE), la respuesta al estrés por sal y metales pesados (F-box) y, la respuesta a heridas y patógenos (WRE3 y WUN-motif); igualmente se involucró el elemento W box que es sensible al inductor de hongos y un elemento para la activación máxima mediada por inductores (2 copias), AT-rich sequence.

También se encontraron elementos regulatorios interesantes que participan en el desarrollo celular como, el control circadiano (circadian), la expresión del meristemo (CAT-box), la expresión en el endospermo (GCN4\_motif), la diferenciación de las células del mesófilo en empalizada (HD-Zip 1), el implicado en el crecimiento y el desarrollo (CCGTCC motif), la regulación del metabolismo de la zeína (O2-site) y, la expresión específica vascular (AC-I).

Los motivos más abundantes fueron del grupo de región promotora del núcleo con una frecuencia de 574, 994 y 99 elementos que corresponden a las regiones promotoras y potenciadoras (CAAT-box), promotor central alrededor de -30 del inicio de la transcripción (TATA-box) y un sitio de unión de la región promotora central para la transcripción (AT~TATA-box), respectivamente.



**Figura 11.** Distribución y repeticiones de los motivos identificados en la región del promotor de 2,000 pb en los genes SWEET de *P. vulgaris*. (a) Clasificación funcional, (b) Motivos implicados en elementos de regulación hormonal, (c) Elementos sensibles al estrés, (d) Motivos implicados en el desarrollo celular y (e) Elementos sensibles a la luz.

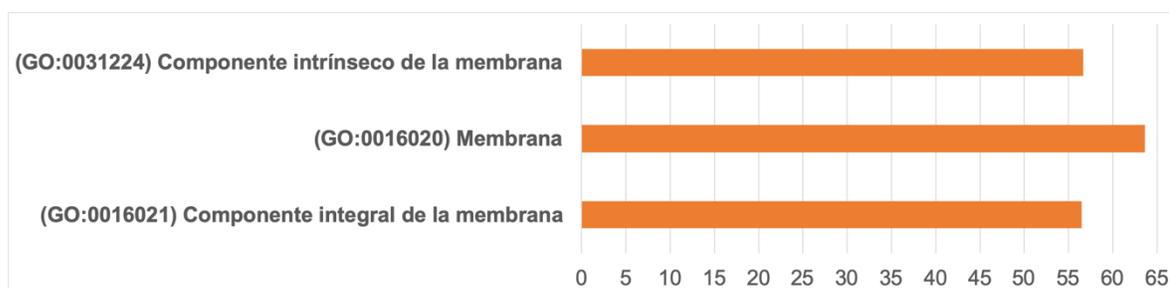


**Figura 12.** Distribución y repeticiones de los motivos identificados en la región del promotor de 2,000 pb en los genes SULTR de *P. vulgaris*. (a) Clasificación funcional, (b) Motivos implicados en elementos de regulación hormonal, (c) Elementos sensibles al estrés, (d) Motivos implicados en el desarrollo celular y (e) Elementos sensibles a la luz.

## 7.8. Ontología de genes SWEET y SULTR

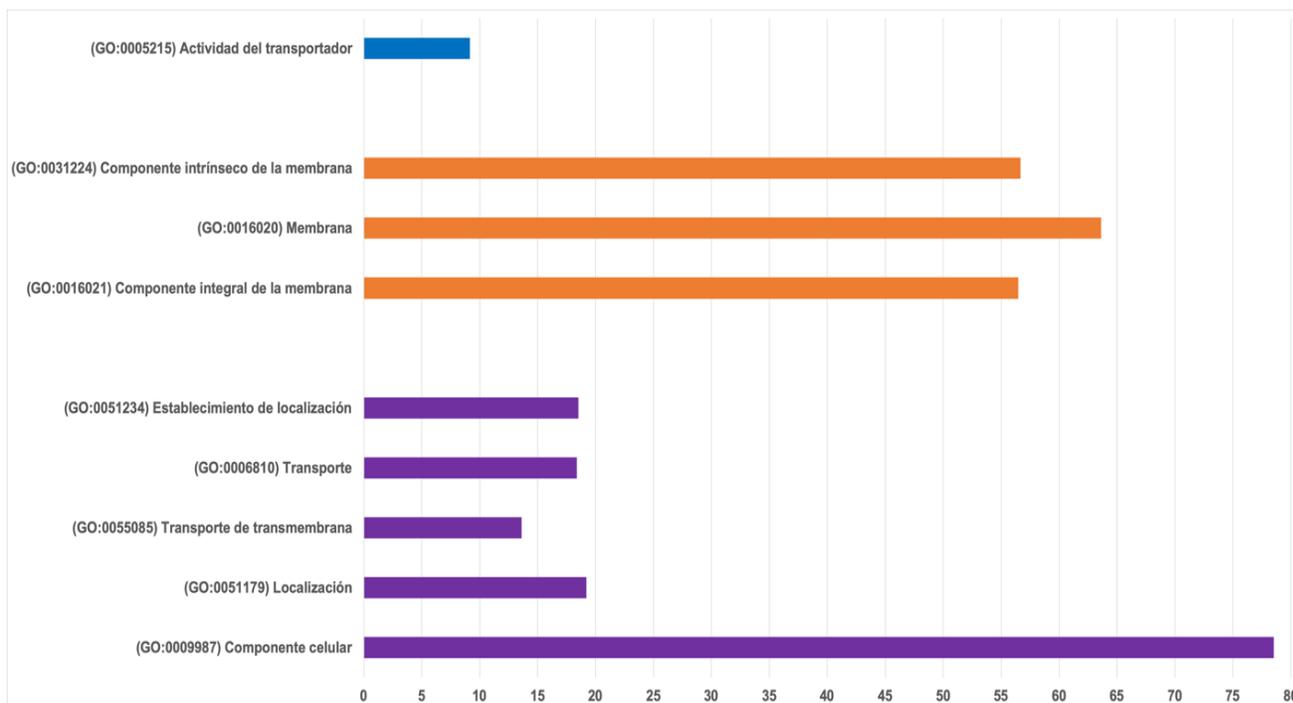
Se empleó la ontología genética (GO) para ordenar los 24 genes *SWEET* y los 15 genes *SULTR* de *P. vulgaris* en diversos grupos funcionales a través de las plataformas AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) y REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>). Los resultados obtenidos nos muestran que los genes *PvSWEET* fueron asignados a una categoría GO: Componente celular (Figura 13). Se hizo la clasificación de los genes *PvSULTR* con base en las tres categorías de GO: Proceso biológico, Componente celular y Función molecular (Figura 14).

La familia *PvSWEET* en su única categoría tiene tres términos GO representados, el de mayor frecuencia es la membrana (GO-0016020), seguido por el componente intrínseco de membrana (GO-0031224) y finalmente el componente integral de membrana (GO-0016021).



**Figura 13.** Anotación de ontología genética de los genes *SWEET* en *P. vulgaris*. La anotación del término GO de *SWEET* se resumió en una categoría principal de GO, componente celular. Análisis de enriquecimiento de GO realizado mediante plataformas AgriGO y REVIGO. Las barras indican la frecuencia de genes con el mismo término.

Mientras que la familia *PvSULTR* tiene el número máximo se asignó a función molecular, procesos biológicos y componentes celulares. En la categoría de función molecular solo presentó un término GO, la actividad transportadora (GO-0005215). Y respecto a la categoría componente celular, la membrana (GO-0016020) fue el término GO más representado, siendo el componente intrínseco de membrana (GO-0031224) y el componente integral de membrana (GO-0016021) los menos representados en esta categoría. Ahora, en la categoría componente celular, el término más abundante fue el proceso celular (GO-0009987), seguido por el término de localización (GO-0051179) y finalmente el de menor abundancia fue el término transporte transmembranal (GO-0055085) con dos subgrupos: el establecimiento de localización (GO-0051234) y transporte (GO-0006810).



**Figura 14.** Anotación de ontología genética de los genes *SULTR* en *P. vulgaris*. La anotación del término GO de *PvSULTR* se resumió en tres categorías principales de GO, función molecular (azul), componente celular (naranja) y proceso biológico (morado). Análisis de enriquecimiento de GO realizado mediante plataformas AgriGO y REVIGO. Las barras indican la frecuencia de genes con el mismo término.

### **7.9. Las familias de genes *SWEET* y *SULTR* se expresan en diferentes tejidos de *P. vulgaris* bajo las condiciones simbióticas de micorriza y rizobio.**

Del atlas de expresión de genes de frijol común (PvGEA: <http://plantgrn.noble.org/PvGEA>) basado en RNA-Seq, se obtuvo la bases de datos de las familias de genes *PvSWEET* y *PvSULTR* para realizar el análisis de los perfiles de expresión *in silico* de distintos tejidos en *P. vulgaris*. Estos perfiles de expresión de los 24 y 15 genes *PvSWEET* y *PvSULTR*, respectivamente, se compararon con un total de 25 muestras de tejidos con diversos estadios de la planta (Tabla 3) encontrando un patrón de expresión diferencial.

El patrón de expresión de los genes *PvSWEET* indica que la mayoría de los genes estaban expresados a niveles bajos en los tejidos analizados (Figura 15). Tenemos la máxima expresión en *PvSWEET20* en los tejidos PvRE, PvR5, PvRF, PvRT, PvN5, PvRI y PvNI; continuando por 3 genes en tres tejidos, *PvSWEET14* en PvSH, PS1 y PS2; *PvSWEET23* en PvST, PvL5 y PvY5; y *PvSWEET2* en PvPH, PvP1 y PvP2; después por 3 genes en 2 tejidos, *PvSWEET12* en PvYL y PvYR; *PvSWEET5* en PvFY y PvLF; y *PvSWEET22* en PvLI y PvLE; y por último dos genes con solo un tejido, *PvSWEET6* en PvNE; y *PvSWEET1* en PvPY. Se obtuvo una alta expresión de dos genes, *PvSWEET20* y *PvSWEET1*, en las raíces y durante la simbiosis con *Rhizobium*, lo que nos sugiere que estos dos genes putativos tienen un rol fundamental en el proceso de la simbiosis.

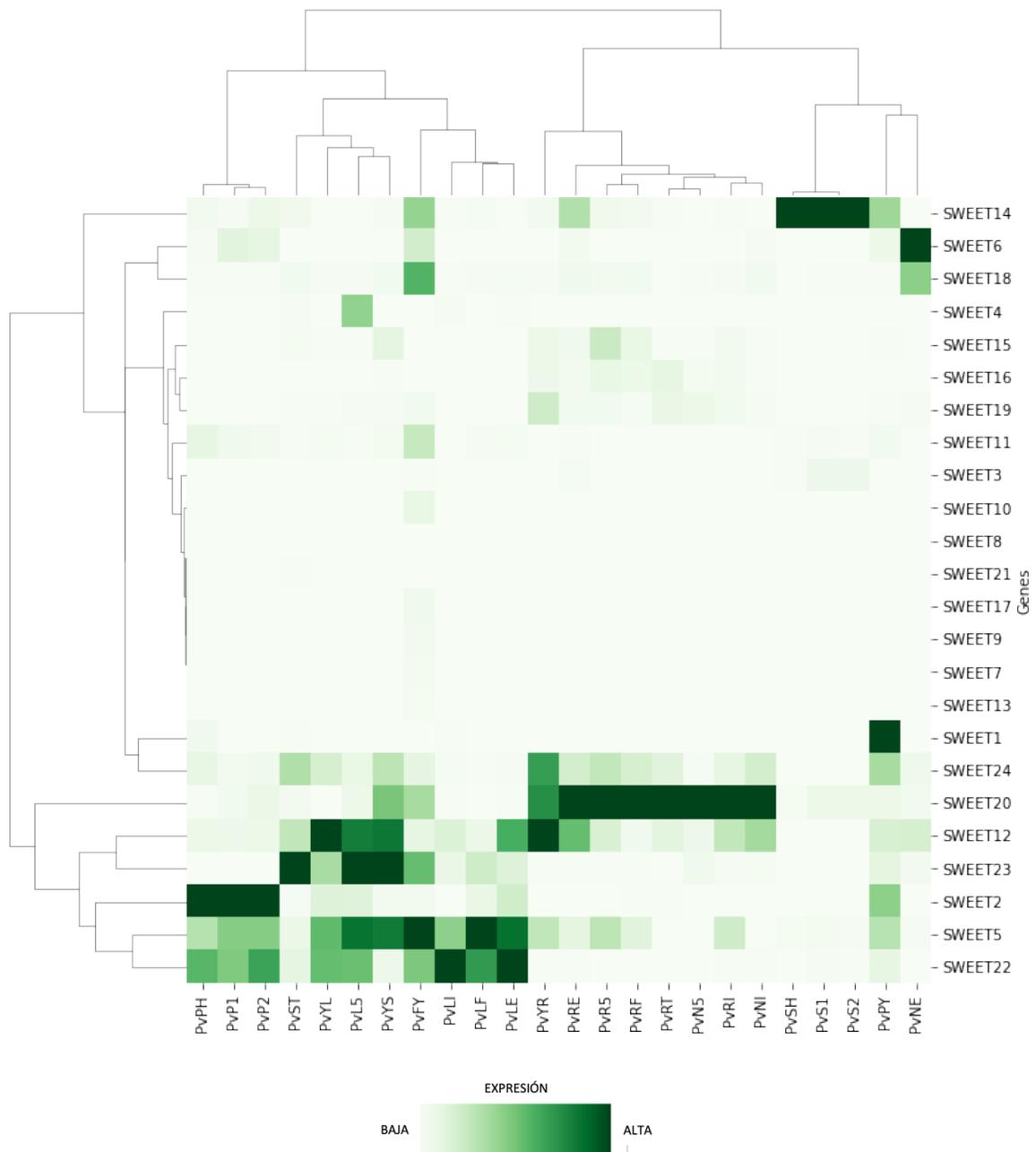
Así mismo, al analizar el patrón de expresión en la familia de genes *PvSULTR* podemos notar una mayor sobreexpresión de los genes en los diferentes tejidos (Figura 16). Resaltamos que el gen *PvSULTR1* tuvo una mayor sobreexpresión en los tejidos PvRT, PvR5, PvPH, PvP1, PvP2, PvLI, PvLF, PvL5, PvYL y PvLE; continuando por el gen *PvSULTR6* con expresión en 5 tejidos PvN5, PvRE, PvRI, PvNE y PvNI; después con tres genes teniendo sobre expresión en 3 tejidos,

*PvSULTR5* en *PvSH*, *PvS1* y *PvS2*; *PvSULTR13* en *PvST*, *PvFY* y *PvPY*; y *PvSULTR8* en *PvYR*, *PvRF* y *PvRT*. El gen *PvSULTR7* se sobrepresó en dos tejidos *PvYS* y *PvSH*. Finalmente, dos genes se sobrepresaron en un solo tejido, *PvSULTR12* en *PvSH*; y *PvSULTR2* en *PvYS*. Podemos notar que hay una clara tendencia hacia los tejidos que fueron recolectados cuando la planta se inoculó con *Rhizobium*, siendo los genes *PvSULTR1* y *PvSULTR8* los que tuvieron mayor sobrepresión en raíces y/o muestras inoculadas.

**Tabla 3.** Definición de las muestras de los tejidos utilizados para el análisis de expresión de los genes *SWEET* y *SULTR* en el mapa de calor.

Muestra	Definición
<b>PvYL</b>	Tejido de la segunda hoja trifoliada completamente expandida de plantas provistas de fertilizante
<b>PvL5</b>	Tejido foliar recogido 5 DAI con rizobio efectivo
<b>PvLF</b>	Tejido foliar de plantas fecundadas recogidas en el mismo momento de LE y LI
<b>PvLE</b>	Tejido foliar recogido 21 DAI con rizobio efectivo
<b>PvLI</b>	Tejido foliar recogido 21 DAI con rizobio ineficaz
<b>PvYS</b>	Todos los entrenudos del tallo por encima del cotiledón recogidos en la 2ª fase trifoliada
<b>PvST</b>	Punta del brote, incluido el meristemo apical, recogido en la 2ª fase trifoliar
<b>PvYF</b>	Flores jóvenes, recogidas antes de la emergencia floral
<b>PvPY</b>	Vainas jóvenes, recogidas de 1 a 4 días después de la senescencia floral. Las muestras contienen embriones en desarrollo en fase globular
<b>PvPH</b>	Vainas de unos 9 cm de longitud, asociadas a semillas en fase de corazón (sólo vaina)
<b>PvP1</b>	Vainas de entre 10 y 11 cm de longitud, asociadas a semillas del estadio 1 (sólo vaina)
<b>PvP2</b>	Vainas de entre 12 y 13 cm de longitud asociadas a semillas del estadio 2 (sólo vaina)
<b>PvSH</b>	Semillas en fase de corazón, entre 3 y 4 mm de diámetro y ~7 mg
<b>PvS1</b>	Semillas de la fase 1, entre 6 y 7 mm de diámetro y ~50 mg
<b>PvS2</b>	Semillas de la fase 2, entre 8 y 10 mm de diámetro y 140-150 mg
<b>PvRT</b>	Puntas de raíz, 0,5 cm de tejido, recogidas de plantas fertilizadas en la segunda fase trifoliada de desarrollo
<b>PvYR</b>	Raíces enteras, incluidas las puntas de las raíces, recogidas en la 2ª fase de desarrollo trifoliar
<b>PvR5</b>	Raíces enteras separadas de nódulos pre-fijados de 5 días
<b>PvRF</b>	Raíces enteras de plantas fertilizadas recogidas al mismo tiempo que RE y RI
<b>PvRE</b>	Raíces enteras separadas del fix + nódulos recogidos 21 DAI
<b>PvRI</b>	Raíces enteras separadas de nódulos fijos recogidos 21 DAI
<b>PvN5</b>	Nódulos de pre-fijación (fix+) recogidos 5 DAI
<b>PvNE</b>	Fix + nódulos recogidos 21 DAI
<b>PvNI</b>	Nódulos fijos recogidos 21 DAI

DAI = Días Después de la Inoculación, del inglés Days After Inoculation. Las definiciones fueron tomadas de O'Rourke *et al.* (2014).



**Figura 15.** Perfiles de expresión *in silico* de los genes SWEET en *P. vulgaris*. Mapa de calor de genes de la familia SWEET en diversos tejidos de *P. vulgaris*. Los datos para el análisis fueron extraídos del atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (PvGEA). El mapa de calor fue generado por Python normalizando los datos, va de 0 (nula expresión) a 1 (máxima expresión).

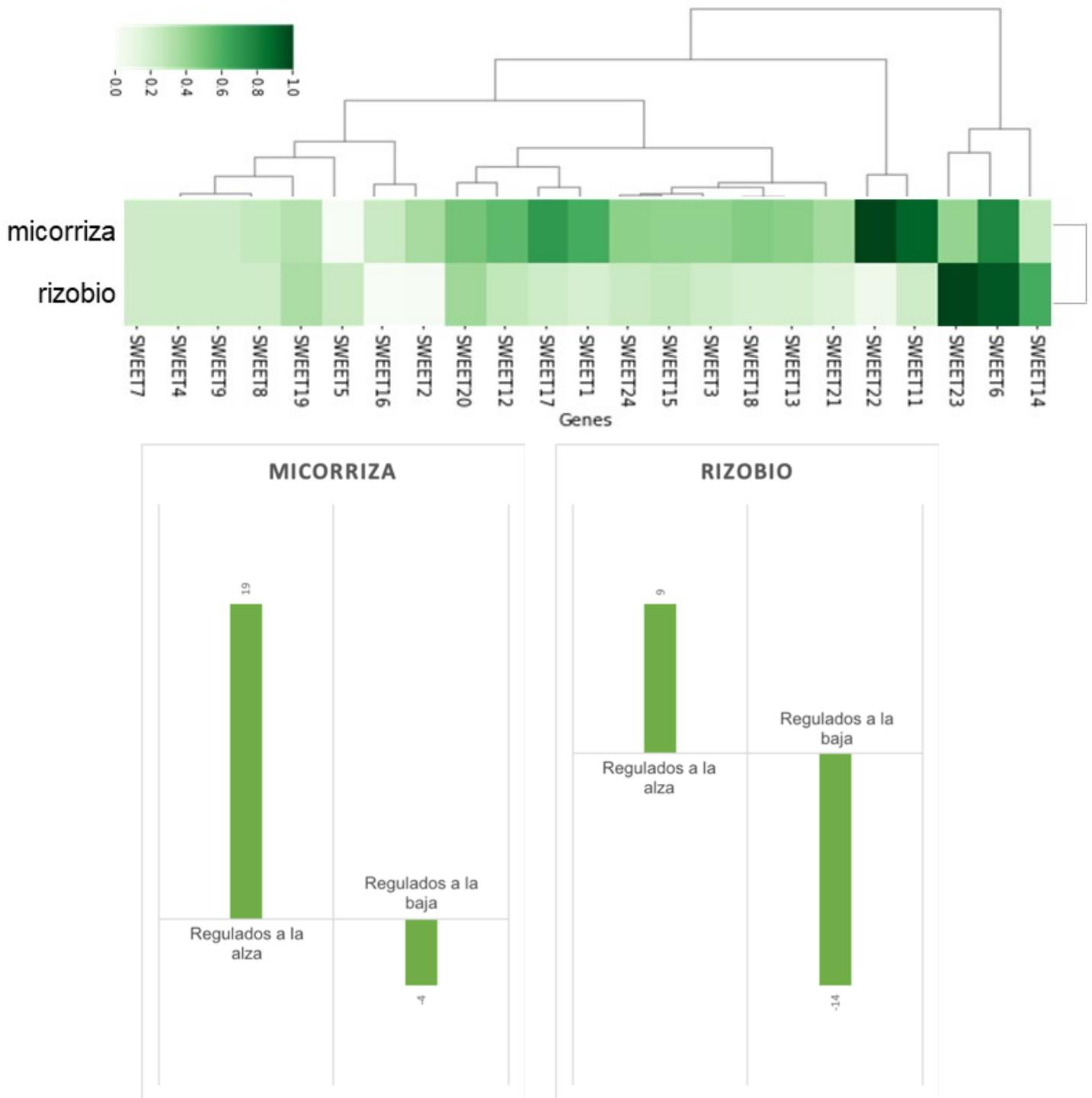


**Figura 16.** Perfiles de expresión *in silico* de los genes SULTR en diversos tejidos de *P. vulgaris*. Mapa de calor de genes de la familia SULTR en diversos tejidos de *P. vulgaris*. Los datos para el análisis fueron extraídos del atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (PvGEA). El mapa de calor fue generado por Python normalizando los datos, va de 0 (nula expresión) a 1 (máxima expresión).

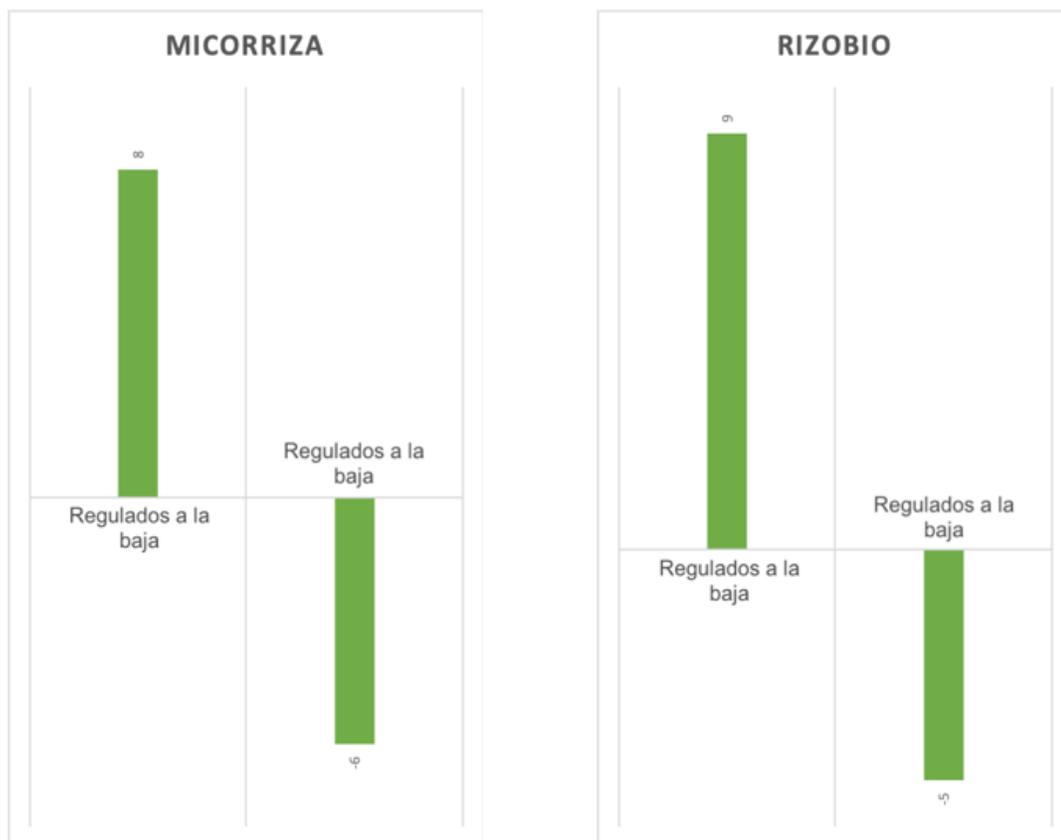
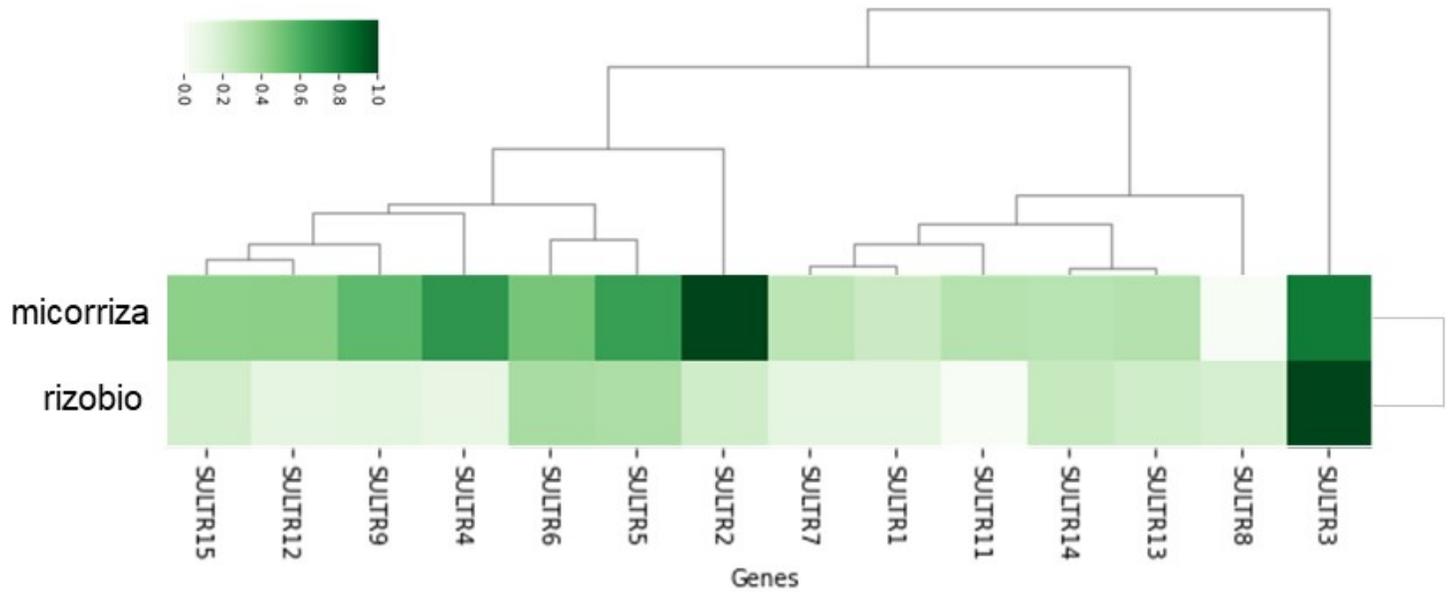
Además se creó un mapa de calor en Python para conocer la expresión de los genes *PvSWEET* y *PvSULTR* en condiciones de simbiosis con rizobios y micorriza. Los datos de expresión génica fueron obtenidos de Nanjareddy *et al.* (2017). Se tomaron los valores originales, los cuales se normalizaron teniéndolos en una escala de 0 a 1, lo que nos permitió un proceso de organización de la base de datos dándonos mayor flexibilidad para eliminar redundancia y dependencia incoherente.

En la familia *PvSWEET* (Figura 17) se observó, en general, que la expresión de los genes en condición de rizobio estaba mayormente regulados a la baja, mientras que en condición de micorriza se veía un alza en comparación con la de rizobio. El 82.61 % de los genes estaban regulados al alza en condiciones de micorriza y el 17.39 % a la baja en esta misma condición, ahora bien bajo la condición de rizobio hay un 39.13 % de genes regulados a la baja y el 60.87 % restante regulados a la alaza. Siendo los genes *PvSWEET22* y *PvSWEET23* los de que están sobreexpresados bajo las condiciones de micorriza y rizobio, respectivamente, considerando a éstos, como los genes putativos participantes en la simbiosis de *P. vulgaris* en cada una de las condiciones.

Ahora bien, por parte de la familia *PvSULTR* (Figura 18) se obtuvo una regulación mayor al alza de expresión génica bajo la condición de micorriza y un a expresion a la baja por la mayoría de genes bajo la simbiosis con el rizobio. En condiciones de simbiosis con la micorriza hay un 57.14 % de los genes que están regulados al alza y el 42.86 % de los genes estaban expresados en regulación a la baja. Mientras que en condiciones de rizobio hay 64.29 % y un 35.71 % de genes expresados con regulación a la alta y baja, respectivamente. Los genes *PvSULTR2*, *PvSULTR3*, *PvSULTR4* y *PvSULTR5* están sobreexpresados en la condición de micorriza, en ese mismo orden, el gen *PvSULTR3* bajo condiciones de rizobio es el único en esta categoría que se sobreexpresó. Por otro lado, en condición de micorriza el gen *PvSULTR8* era el que tenía una menor sobreexpresión y el gen *PvSULTR11* en el caso de rizobio.



**Figura 17.** Perfiles de expresión de los genes de la familia *SWEET* en *P. vulgaris* durante la simbiosis con micorriza y rizobio, y gráfico de expresión al alza y al baja. Los datos de expresión para el mapa de calor (a) fueron tomados del análisis transcriptómico por Nanjareddy *et al.* (2017). Los datos fueron normalizados, del 0 (expresión negativa – color blanco) al 1 (expresión positiva – color verde). Los gráficos muestran cuales genes están regulados al alza (b) y cuales a la baja (c) en cada una de las condiciones.



**Figura 18.** Perfiles de expresión de los genes de la familia *SULTR* en *P. vulgaris* durante la simbiosis con micorriza y rizobio. Los datos de expresión para el mapa de calor (a) fueron tomados del análisis transcriptómico de Nanjareddy *et al.* (2017). Los datos fueron normalizados, del 0 (expresión negativa – color blanco) al 1 (expresión positiva – color verde). Los gráficos muestran cuando genes están regulados al alza (b) y cuales a la baja (c) en cada una de las condiciones.

### **7.10. Interactoma proteína-proteína de las proteínas putativas SWEET y SULTR con proteínas de señalización en simbiosis**

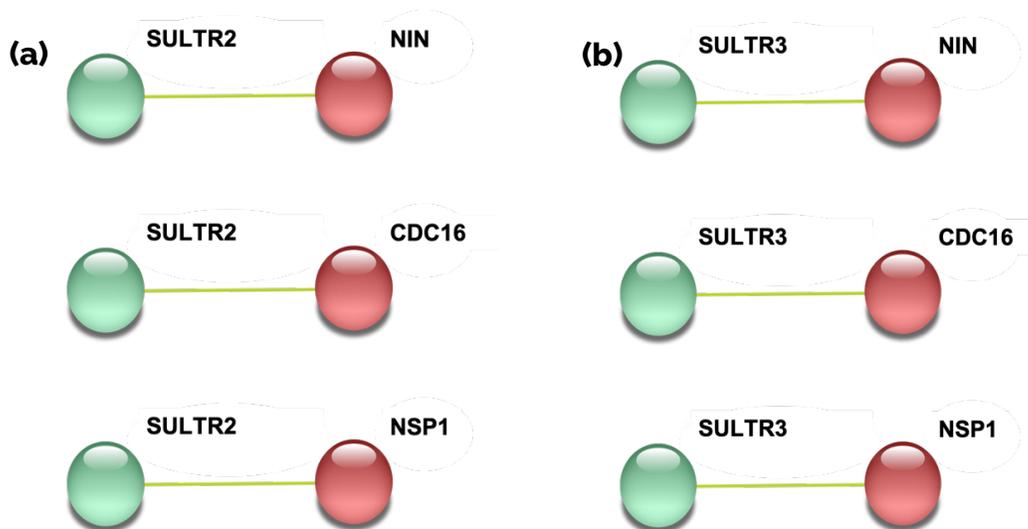
Se seleccionaron las proteínas *PvSWEET* y *PvSULTR*, que eran los que más se sobreexpresaron bajo condiciones de micorriza (*PvSWEET22* y *PvSULTR2*) y rizobia (*PvSWEET23* y *PvSULTR3*), de las cuales se analizaron las interacciones proteína-proteína, individualmente, con cada uno de los 207 genes identificados en el Noble Research Institute (Roy *et al.*, 2020) durante la ruta de señalización en las leguminosas (Figura A3) (<https://nobleapps.noble.org/LegumeGenetics>). De este análisis se observó que la proteína *PvSWEET22* interactuaba con 31 proteínas (14.97 %) de las 207 mientras que *PvSWEET23* por parte de rizobio con 40 (19.32 %). Por otro lado, la proteína putativa *PvSULTR2* que interactuó con un total de 81 proteínas (39.13 %) y *PvSULTR3* en tratamiento de rizobio con 82 proteínas interactuando con las proteínas de señalización (39.61 %) durante la simbiosis con la micorriza y la nodulación.

En el diagrama de Venn Euler mostrado en la Figura 19 se puede observar que las proteínas de nodulación y fijación de nitrógeno interactúan con ambas familias de proteínas, *PvSWEET* y *PvSULTR*. Por ejemplo, las proteínas *PvSULTR2* (interacción con 3 proteínas únicas) y *PvSULTR3* (interacción con 4 únicas) comparten un total de 43 proteínas entre ellos, mientras que *PvSWEET22* (con 9 proteínas en interacción única) y *PvSWEET23* (interacción con 9 proteínas) comparten sólo 6. Ahora vemos que en un conjunto entre *PvSULTR2*, *PvSULTR3* y *PvSWEET23* interactúan directamente con 20 proteínas de estudio y en el conjunto *PvSULTR2*, *PvSULTR3* y *PvSWEET22* hay un total de 11 genes que comparten con ellos. Y hay una sola proteína (BCH1\_BCH2) que interactúa con las cuatro proteínas *PvSULTR2*, *PvSULTR3*, *PvSWEET22* y *PvSWEET23*.



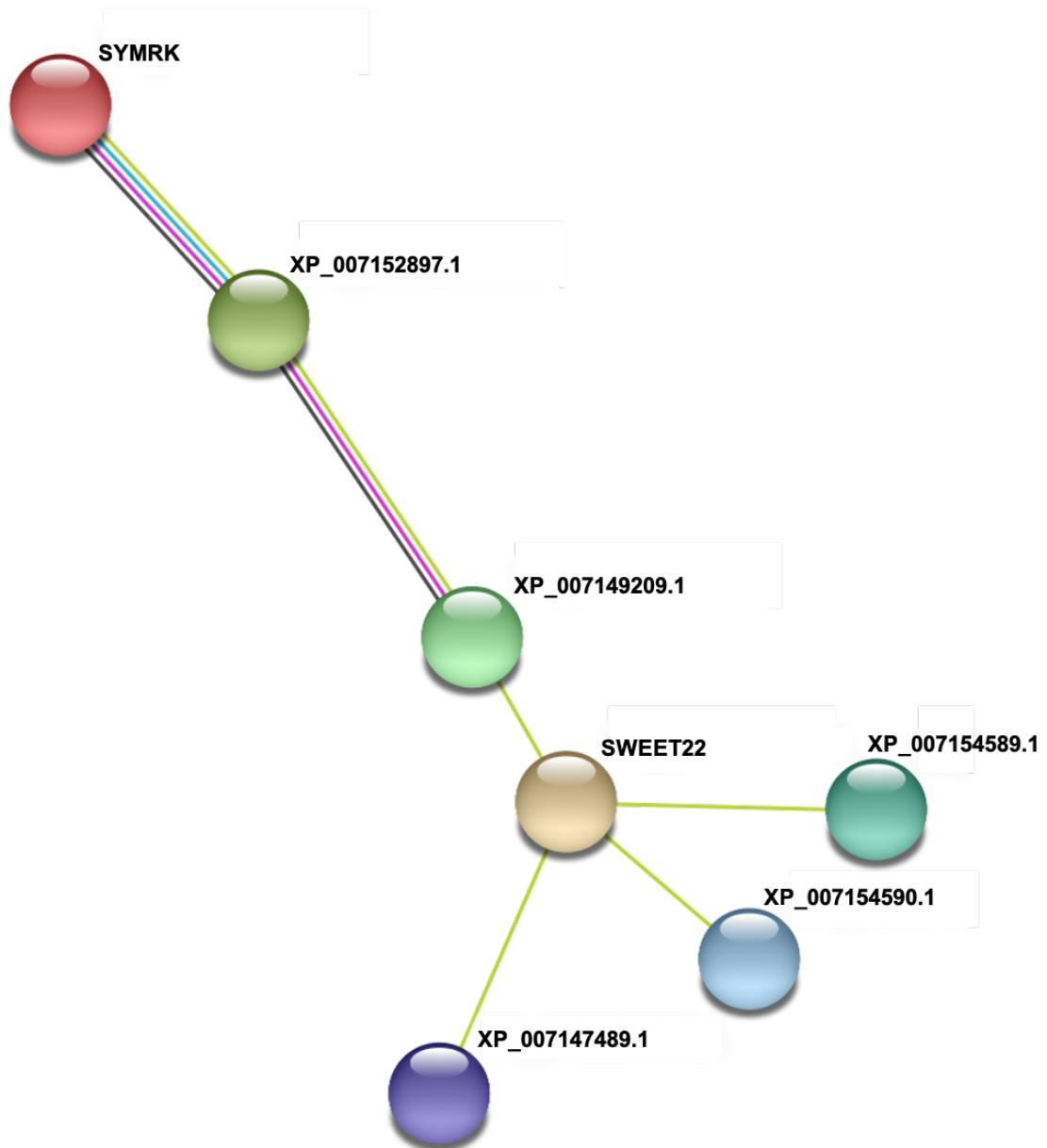
**Figura 19.** Diagrama de Venn Euler de interacción proteína-proteína. Se ilustran las interacciones proteína-proteína entre los genes putativos de SWEET y SULTR con las 207 proteínas (Tabla A3) de nodulación y fijación de nitrógeno (<https://nobleapps.noble.org/LegumeGenetics>). En color verde está el conjunto de proteínas *PvSWEET23*, en color naranja *PvSWEET22*, en azul *PvSULTR2* y por último, en color gris está el conjunto *PvSULTR3*.

*PvSULTR2* y *PvSULTR3* tuvieron interacción con 43 proteínas de señalización. Se encontraron 3 proteínas que tienen una interacción directa con éstas. Con la primer proteína fue NIN (Nodule Inception, en inglés) que transcribe a un TF (Factor de transcripción) el cual incluye un dominio RWP-RK, un regulador de múltiples genes y/o procesos con el objetivo de efectos positivos o negativos durante la organogénesis del nódulo, participación en algún momento del desarrollo así como el inicio de la TI y como control en el número de nódulo. La segunda proteína de fue CDC16 (Cell Division Cycle 16, en inglés) es un complejo promotor que participa en la anafase además de la organogénesis dependiente de las auxinas (Roy *et al.*, 2020). Por último, la producción de proteína NSP1 (Nodulation Signaling Pathway 1) sustancial en los cambios inducidos por el factor Nod que participa como un regulador transcripcional primario (Smit *et al.*, 2005).

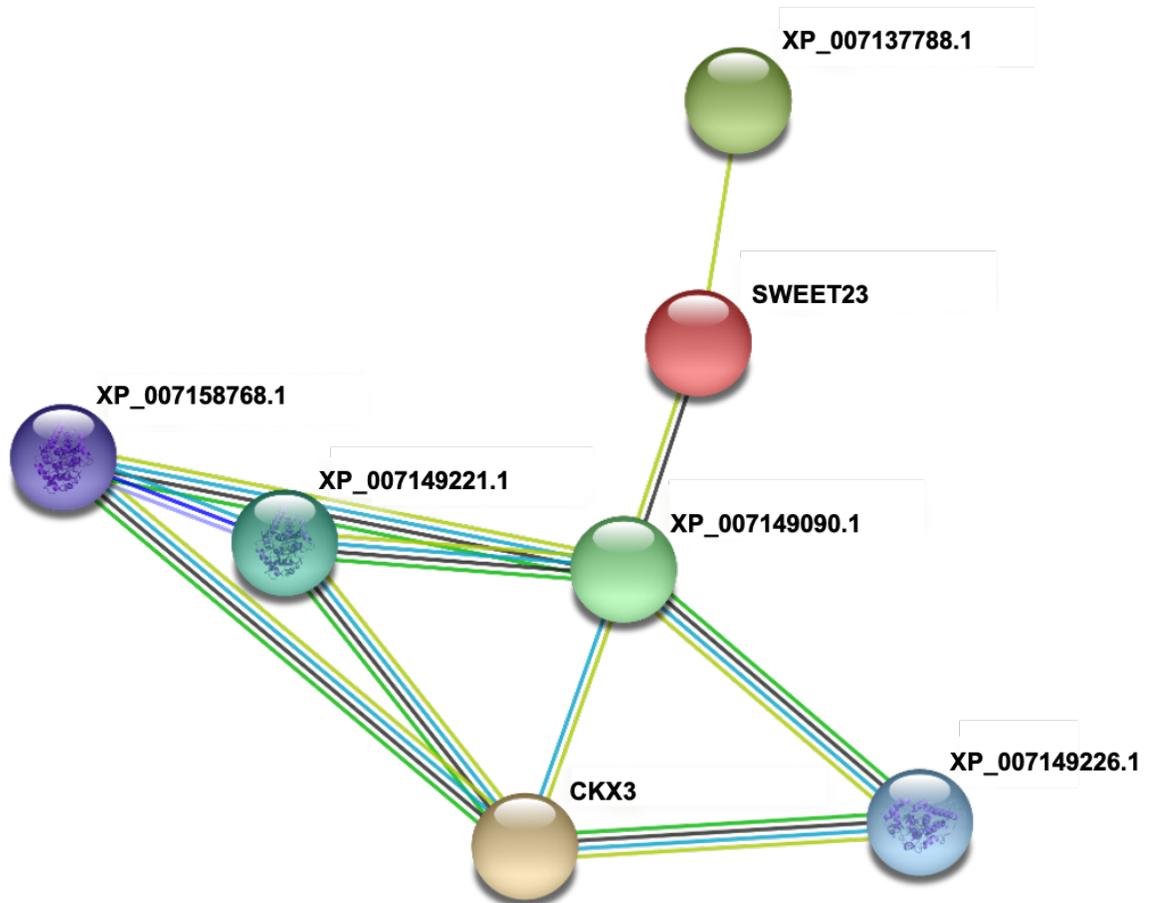


**Figura 20.** Interacción proteína-proteína de *PvSULTR2* y *PvSULTR3* con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y durante la nodulación. Los círculos verdes son nuestros genes putativos y los rojos las proteínas de señalización. Las proteínas NIN corresponden inicio de los nódulos, CDC16 del ciclo de división y NSP1 es la vía de señalización de la nodulación 1.

La familia *PvSWEET* cuenta con unas redes de interacción más complejas. La proteína *PvSWEET22* (Figura 21), que interacciona con la proteína de señalización SYMRK (Symbiosis Receptor-like Kinase, en inglés), que es una repetición rica en leucina parecido al receptor de la cinasa, la cual es necesaria para que los rizobios invadan los pelos radicales, al igual el hilo de infección y la creación de simbiosomas (Sanchez-Lopez et al., 2012). Hay dos proteínas intermediarias entre SYMRK y *PvSWEET22*, la primera es una proteína fosfatasa Serina/Treonina (XP\_007152897.1; ID: PHAVU\_004G169300g) y la segunda una proteína fosfoglicerato cinasa (XP\_007149209.1; ID: PHAVU\_005G050800g). Por otro lado, la proteína *PvSWEET23* (Figura 22) que tiene una interacción con la proteína CKX3 (Cytokinin oxidase/dehydrogenase, en inglés) es expresada en el dominio central de WUSCHEL (WUS) y cataliza la citoquinina en el meristemo incluyendo a la degradación metabólica de dicha hormona (Bartrina *et al.*, 2011). Entre esta interacción hay una proteína que contiene el dominio ATP-Synt\_ab (XP\_007149090.1; ID: PHAVU\_005G040400g).



**Figura 21.** Interacción proteína-proteína de *PvSWEET22* con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y con micorriza. Cada círculo representa a una proteína y la línea de color, la interacción entre ellas. La proteína de color rojo es SYMRK, la proteína de señalización, de color verde es la proteína fosfatasa Serina/Treonina (XP\_007152897.1), de verde claro la proteína fosfoglicerato cinasa (XP\_007149209.1), de café la proteína *PvSWEET22*, de verde agua la proteína que contiene el dominio Oxidored\_FMN (XP\_007154589.1) al igual que la proteína de color azul claro (XP\_007154590.1) y la última de color morado es una proteína no caracterizada (XP\_007147489.1).



**Figura 22.** Interacción proteína-proteína de *PvSWEET23* con las proteínas de señalización durante la simbiosis con la micorriza y de nodulación. Cada círculo representa a una proteína y la línea de color, la interacción entre ellas. De color verde es una proteína que contiene el dominio dioxigenasa Fe2OG (XP\_007137788.1), de rojo *PvSWEET23*, de verde claro está la proteína que contiene el dominio ATP-Synt\_ab (XP\_007149090.1), de azul está una proteína que contiene dominio de hidroxilácido deshidrogenasa FMN (XP\_007149226.1), de café la proteína de señalización CKX3, en verde agua (XP\_007149221.1) y de morado (XP\_007158768.1) una proteína (S)-2-hidroxilácido oxidasa.

## 8. DISCUSIÓN

El genoma de la planta codifica una gran cantidad de proteínas de transporte de membrana que funcionan ampliamente en una multitud de procesos fisiológicos básicos, incluida la adquisición de iones, la transferencia de metabolitos y la excreción y reparto de productos de desecho. Más importante aún, estas proteínas juegan un papel fundamental en la asimilación, transferencia y acumulación de nutrientes en los tejidos vegetales, que son un factor importante que ayuda al crecimiento y desarrollo de la planta (Li *et al.*, 2018). Durante la simbiosis con micorrizas y rizobios, las proteínas transportan nutrientes del simbionte al anfitrión, a cambio, los metabolitos del azúcar se entregarán del anfitrión al simbionte.

### 8.1. Identificación de los genes *SWEET* y *SULTR*

La familia de genes *SWEET* son de reciente caracterización como exportadores de sacarosa y de monosacáridos, lo cuales posiblemente son parte clave del tráfico de la sacarosa por el floema hacia las raíces (Wang *et al.*, 2017). Durante la búsqueda en la base de datos se obtuvieron 24 genes en *P. vulgaris*. Se conoce que la distribución de los genes *SWEET* está en plantas, animales, hongos y organismos procariontes (Patil *et al.*, 2015). Li *et al.* (2018) mencionan que en *Arabidopsis thaliana* hay 17 genes, *Medicago truncatula* con 27 (Hu *et al.*, 2019) y un familiar cercano al frijol, *Glycine max*, con un total de 53 genes (Patil *et al.*, 2015). Cada vez se sabe más sobre los análisis e la familia de genes *SWEET* en una extensa variedad de plantas (Guo *et al.*, 2018). Se ha indicado que esta familia de genes tiene un importante rol en el flujo de azúcares, descarga de nutrientes, desarrollo de los frutos y en los tejidos reproductivos (Chen *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia *PvSWEET* están clasificados en 4 clados que fueron identificados mediante un filograma basada en *A. thaliana*. En el análisis bibliográficos se muestra que los 17 miembros pertenecientes a *A. thaliana* tienen sus genes *AtSWEET*1-3 Clado I, en el Clado II los genes *AtSWEET*4-8, en el Clado

III están *AtSWEET9-15* y en el Clado IV se encuentran *AtSWEET16-17*. Las isoformas de los genes *SWEET* tienen funciones diversas en las plantas. Tenemos por ejemplo que *AtSWEET11* tiene el papel de transportador de glucosa (Xuan *et al.*, 2013) mientras que *AtSWEET9* es un transportador particular del néctar siendo esencial para la producción del mismo (Lin *et al.*, 2014). Y como catalizadores en la exportación de la sacarosa encontramos a los genes *AtSWEET11* y *AtSWEET12* que llevan dicho azúcar desde el parénquima en el floema sobre las hojas de origen y tiene un papel importante en la carga del floema (Chen *et al.*, 2012).

Sobre la localización cromosómica de los genes *SWEET* en *P. vulgaris* se identificaron en este estudio que estaban mayormente situados en los extremos de los cromosomas. En la soya, *Glycine max*, los 52 genes encontrados, distribuidos de manera aleatoria en los 15 cromosomas de este cultivo, se descubrió que también están mayormente condensados en los extremos, siendo el cromosoma 8 el que más genes contiene, según Patil *et al.*, (2015), mientras que en *P. vulgaris* la mayor concentración de estos genes estaban en el cromosoma 9.

Las proteínas *SWEET* identificadas en diversas especies están clasificadas en dos tipos, las que albergan dos dominios *MtN3\_slv*, que son la mayoría, y las que solo cuentan con un dominio (Chen *et al.*, 2010; Yuan y Wang, 2013). Donde los miembros localizados de *PvSWEET* cuentan con dos dominios *MtN3\_slv*. Las proteínas normalmente cuentan con 7 hélices transmembranales (TM) puestas en dos grupos de 3 y una hélice transmembranal sola (Xuan *et al.*, 2013).

Los procariontes tienen homólogos con sólo 3 unidades TM (semi*SWEETs*), que se ensamblan en complejos múltiples de 3 unidades TM para mediar el transporte de sacarosa, el cual está ensamblado en bloques de 3 (Xuan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014).

Por otro lado, el sulfato tiene un papel emergente en la adaptación de las plantas a estreses abióticos lo que refuerza la necesidad de mantener una absorción

(Gallardo *et al.*, 2014). Comparando a las leguminosas con el organismo modelo, *Arabidopsis*, tenemos una característica específica de realizar interacciones simbióticas con los hongos micorrícicos arbusculares (MA). Conocemos que dicha asociación mutualista incrementa la tolerancia de las plantas a la sequía lo que limita la absorción de iones, incluido el sulfato por medio de las raíces (Augé, 2001).

Se encontraron un total de 15 genes *SULTR* en *P. vulgaris*, y que en otros organismos se detectaron por Gallardo *et al.* (2014) que *Arabidopsis thaliana* presenta 12 genes y que *Medicago truncatula* está compuesta por 14 genes de la familia *SULTR*, y que en *Glycine max* según Ding *et al.* (2016) hay un total de 28 genes putativos. Estos genes se clasifican en cuatro clados, siendo el primero los transportadores de alta afinidad, mientras que al Clado II pertenecen los de baja afinidad. En el Clado III se encuentran los de codificación variada en membranas de plástidos y membranas simbiosómicas, además de algunas otras funciones características o desconocidas. Y el Clado IV que son los exportadores vacuolares de sulfato (Takahashi *et al.*, 2011).

Una de las razones para saber si los genes encontrados eran lo que pertenecían a *PvSULTR* se analizó que tuvieran 12 dominios transmembranales, además de dos dominios conservados que son el *Sulphate\_transp* y el *STAS* (Anti-sigma del transportador de sulfato) (Aravid y Koonin, 2000). También se ha reportado que el dominio *STAS* en la proteína *AtSULTR1;2* apoya en la localización del transportador de la membrana plásmática interviniendo directamente en las propiedades cinéticas del dominio catalítico (Shibagaki y Grossman, 2004); además de intervenir durante la actividad de la OASTL (O-acetilserina (tiol) liasa) (Shibagaki y Grossman, 2010).

En un estudio completo de genes *SULTR* en 10 especies de Gramineae elaborado por Yuan *et al.*, (2021), se observó que tenían una distribución y diversas densidades en los cromosomas. Siendo un total de 25 pares de genes en estas 10 especies que estaban duplicados de dos maneras, siendo la primera la duplicación del genoma completo (WGD)/duplicación segmentaria que solo se vio en *O. barthii*,

*O. sativa* ssp. *indica*, *O. sativa* ssp. *japonica* y *O. rufipogon* representando así entre un 10 y 31% del total de los genomas. Y la segunda, la duplicación en tándem, solo se encontraron duplicaciones en *O. glabbermia*.

## **8.2. Análisis de expresión de los genes *SWEET* y *SULTR* bajo las condiciones simbióticas**

Los análisis transcriptómicos nos ayudan a visualizar los genes que están regulados bajo diferentes condiciones. En este estudio se visualizó en dos condiciones de simbiosis: 1) micorrización y 2) rizobio. Aquí, al ser dos grupos de familias transportadoras *SWEET* y *SULTR*, se obtuvieron cuatro genes. El gen *PvSWEET22* que está sobreexpresado bajo la condición de micorriza, pero casi nula en condición de rizobio, siendo el caso contrario para *PvSWEET23* que tiene una sobreexpresión cuando hay condición de rizobio, siendo estos dos nuestros genes putativos que están regulados en estas dos condiciones. Ahora, por la familia que transporta azufre (S), el gen *PvSULTR2* está regulado a la alza por el tratamiento con micorriza y el gen *PvSULTR3* bajo la condición con rizobio.

Los dos miembros putativos de la familia *PvSWEET* están en el clado IV (*PvSWEET23*) y en el clado III (*PvSWEET22*). Las plantas al crear cierta interacción con los hongos, le donan a estos, azúcares y lípidos. Pero aún está un poco en duda de cómo el azúcar es transportado para que el hongo los obtenga. Sin embargo, An *et al.* en el 2019 encontraron que en *Medicago truncatula* el gen *SWEET1b* tiene un alto nivel regulado al alza sobre las células que portan arbusculos en comparación con las raíces, localizándose sobre la membrana periarbuscular, dando así pie al intercambio de nutrientes. Resultando esto como prescindible debido a la actividad de transporte de la glucosa que tiene *MtSWEET1b*.

En cuanto a los transportadores de azufre ambos miembros putativos seleccionados, *PvSULTR2* y *PvSULTR3*, están en el clado II que son los de grupo

de la baja afinidad. En otros estudios, se registró en *Arabidopsis* que dos transportadores de azufre de alta afinidad, *AtSULTR1.1* y *AtSULTR1.2*, se localizan principalmente en los pelos radiculares, la epidermis radicular y la corteza. Estos genes están regulados positivamente por la deficiencia de esta molécula. Por lo tanto, se estima que son responsables de la absorción de S del suelo (Yoshimoto *et al.*, 2002). El gen *AtSULTR2.1* es responsable del transporte de azufre desde el sistema radical hasta el brote (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2015).

No es de sorprenderse que las plantas se vean afectadas en su crecimiento y desarrollo por la ausencia o escasez del azufre. Becana *et al.*, (2018) observaron que en las leguminosas con nódulos la relación positiva entre la fuente del azufre con la fijación simbiótica de nitrógeno, observando tres puntos a rescatar por su inanición: 1) La reducción de la nodulación, 2) El freno de la fijación simbiótica de nitrógeno, y por último 3) La reducción de velocidad en el metabolismo nodular.

### **8.3. Interacción proteína-proteína de proteínas de señalización simbiótica**

La formación de asociaciones simbióticas es una de las adaptaciones con mayor éxito en las redes con microbios beneficiosos (Bapaume y Reinhardt, 2012). En donde en el suelo cuando hay limitación de N se dan las interacciones entre la leguminosa (hospedero) y rizobio (huésped), donde la planta exuda flavonoides para atraer a la bacteria. El huésped capta estas señales, que inducen a una cadena de señalización. Este proceso es muy similar cuando se hace la interacción con el hongo para formar la micorriza. Para esto, se tomó una lista de 207 proteínas de señalización de Roy *et al.* (2020) que participan durante esta señalización para crear la simbiosis con los cuatro genes putativos tomados de los perfiles de expresión.

Como se ha visto anteriormente, en ausencia de nitrógeno en el suelo, las leguminosas exudan flavonoides para crear la comunicación con los rizobios. Esta bacteria reconoce dichas moléculas como señales para desencadenar la

producción de lipochitooligosacaridos o los factores de nodulación (Nod) (Peters *et al.*, 1986) y aquí inicia el simbiosistema que beneficia a ambos.

Aquí es donde inicia la cadena de señalización para producir esta simbiosis y no es un proceso limitado a solo un par de genes, si no a toda una interacción entre varios de ellos. Empezamos con los flavonoides que actúan como la primer señal para crear la simbiosis (Liu y Murray, 2016) dando especificidad de hospedador a la planta, esto junto con los isoflavonoides. En *P. vulgaris* encontramos que en las isoflavonas genisteína y diadseína que inducen a los genes *nod* al huesped *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Bolaños-Vásquez y Werner, 1997).

## 9. CONCLUSIONES

Se realizó un análisis de las familias de genes transportadores *SWEET* y *SULTR* presentes en el genoma del frijol (*P. vulgaris*) para identificar 24 y 15 genes, respectivamente. El filograma de los miembros de las familias *PvSWEET* y *PvSULTR* se clasificaron cada uno en cuatro clados, que fueron constatados con la semejanza hallada en la estructura de los genes y la distribución de los motivos. Los genes *PvSWEET* se distribuyen en 9 cromosomas al igual que los genes *PvSULTR* en los 11 cromosomas de *Phaseolus*. Los genes *PvSWEET* se encontraron en el cromosoma 09, mientras que los genes *PvSULTR* tuvieron la mayor presencia en dos cromosomas, el 01 y 08.

También se observó a través perfiles de expresión bajo las dos condiciones, micorriza y rizobio, y otro de expresión en diferentes tejidos de *P. vulgaris*, dándonos cuatro genes putativos que participan en el intercambio de azúcares y azufre, siendo para el primer grupo *PvSWEET22* y *PvSWEET23*, y para el segundo *PvSULTR2* y *PvSULTR3*.

Y por último, el comprender como se hace la interacción entre estos genes para la vinculación en el transporte de los nutrientes no se hace solo por ellos, sino, que se establece una red de genes de señalización para la simbiosis micorrízica y rizobial. Por lo que se hizo un interactoma completo con los genes putativos y el listado de de manera individual para saber cuáles son los que interaccionan en dicha señalización. Este análisis reveló que los genes *PvSWEET* y *PvSULTR* que se sobreexpresan durante la simbiosis micorrízica y rizobial interactúan con genes simbióticos comunes tempranos clave como *SymRK*, *NIN*, *NSP1* y otros con el silicio. Esto indica que tanto el transporte de azúcar como el de azufre actúan aguas abajo de los primeros genes simbióticos comunes.

En conjunto, los resultados proporcionan una base para la caracterización funcional de dos proteínas *SWEET* y dos *SULTR* en *P. vulgaris*.

## 10. PRODUCTOS GENERADOS

### 10.1. Congresos Internacionales

- **Joaquín Alberto García Reynoso**, Kalpana Nanjareddy and Manoj-Kumar Arthikala (2020). Genome wide identification of *SWEET* and *SULFUR* Transporters and expression profiles during Bean-Mycorrhizal Symbiosis. Virtual international conference “Recent Advances in Chemical and Biological Sciences (ViRACBS – 2020)”, Bangalore, India, 7 – 9 December, 2020.

### 10.2. Congresos Nacionales

- **Joaquín Alberto García Reynoso**, Kalpana Nanjareddy and Manoj-Kumar Arthikala (2021). Análisis de la familia de genes de *SULTR* en genoma de *Phaseolus* durante simbiosis micorrízica/rizobiana. Congreso Internacional de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Sonora, México, 22 – 23 Septiembre, 2021.
- **García-Reynoso, J. A.**, Nanjareddy, K. and Arthikala, M. K. (2021). Identification of *SWEET* gene family in the *Phaseolus* genome and comparative analysis of their expression profiles specific to mycorrhizal and rhizobial symbiosis. XIX National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress & XII Symposium Mexico-USA / 2<sup>nd</sup> ASPB Mexican Section Meeting, 8 – 11 November, 2021. P33.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Afkhami, M. E., Rudgers, J. A., & Stachowicz, J. J. (2014). Multiple mutualist effects: Conflict and synergy in multispecies mutualisms. *Ecology*, 95(4), 833–844. <https://doi.org/10.1890/13-1010.1>
- Agrawal, A. A. (2007). Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(2), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.10.012>
- An, J., Zeng, T., Ji, C., Graaf, S. de, Zheng, Z., Xiao, T. T., Deng, X., Xiao, S., Bisseling, T., Limpens, E., & Pan, Z. (2019). A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 224(1), 396–408. <https://doi.org/10.1111/nph.15975>
- Anderson, J. W., Story, L., Sieling, B., Chen, W. J. L., Petro, M. S., & Story, J. (1984). Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 40(6), 1146–1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/40.6.1146>
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D. G., & de Carvalho-Niebel, F. (2007). AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor–Dependent Mt ENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis-Regulatory Motif. *The Plant Cell*, 19(9), 2866–2885. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052944>
- Anjum, N. A., Gill, R., Kaushik, M., Hasanuzzaman, M., Pereira, E., Ahmad, I., Tuteja, N., & Gill, S. S. (2015). ATP-sulfurylase, sulfur-compounds, and plant stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 210. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00210>
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (2000). The STAS domain—A link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current Biology*, 10(2), R53–R55. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00335-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00335-3)
- Armañanzas, R., Inza, I., Santana, R., Saeys, Y., Flores, J. L., Lozano, J. A., Peer, Y. V. de, Blanco, R., Robles, V., Bielza, C., & Larrañaga, P. (2008). A review of estimation of distribution algorithms in bioinformatics. *BioData Mining*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-1-6>
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Nava, N., Santana, O., Sánchez-López, R., Cárdenas, L., & Quinto, C. (2013). PvRbohB negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), 1391–1402. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct089>
- Arthikala, M.-K., Montiel, J., Sánchez-López, R., Nava, N., Cárdenas, L., & Quinto, C. (2017). Respiratory Burst Oxidase Homolog Gene A Is Crucial for *Rhizobium* Infection and Nodule Maturation and Function in Common Bean. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2003. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02003>
- Arthikala, M.-K., Nanjareddy, K., & Lara, M. (2018). In BPS1 Downregulated Roots, the BYPASS1 Signal Disrupts the Induction of Cortical Cell Divisions in Bean-*Rhizobium* Symbiosis. *Genes*, 9(1), 11. <https://doi.org/10.3390/genes9010011>
- Arthikala, M.-K., Nanjareddy, K., Blanco, L., Alvarado-Affantranger, X., & Lara, M. (2021). Target of rapamycin, PvTOR, is a key regulator of arbuscule development

- during mycorrhizal symbiosis in *Phaseolus*. *Scientific Reports*, 11(1), 11319. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90288-2>
- Augé, R. M.** (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 11(1), 3–42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>
- Ballhorn, D. J., Younginger, B. S., & Kautz, S.** (2014). An aboveground pathogen inhibits belowground rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in *Phaseolus vulgaris*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 321. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0321-4>
- Bansal, A. K.** (2005). Bioinformatics in microbial biotechnology – a mini review. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-19>
- Bapaume, L., & Reinhardt, D.** (2012). How membranes shape plant symbioses: Signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Frontiers in Plant Science*, 3, 223. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00223>
- 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. <https://doi.org/10.1111/nph.12002>
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., & Schmölling, T.** (2011). Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and Thus Seed Yield in *Arabidopsis thaliana* [C][W][OA]. *The Plant Cell*, 23(1), 69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079079>
- Becana, M., Wienkoop, S., & Matamoros, M. A.** (2018). Sulfur Transport and Metabolism in Legume Root Nodules. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01434>
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G., & Séjalon-Delmas, N.** (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4(7), e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>
- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti Zeuli, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L., & Papa, R.** (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytologist*, 197(1), 300–313. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x>
- Bolaños-Vásquez, M. C., & Werner, D. (1997). Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nod Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 10(3), 339–346. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.339>
- Bonfante, P., & Genre, A.** (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: An evolutionary-developmental perspective. *Trends in Plant Science*, 13(9), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.07.001>
- Boucher, D.** (2016). Mutualism. *Integrative and Comparative Biology*, 56(2), 365–367. <https://doi.org/10.1093/icb/icw071>
- Brands, M., Wewer, V., Keymer, A., Gutjahr, C., & Dörmann, P.** (2018). The *Lotus japonicus* acyl-acyl carrier protein thioesterase FatM is required for mycorrhiza formation and lipid accumulation of *Rhizophagus irregularis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 95(2), 219–232. <https://doi.org/10.1111/tpj.13943>

- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J.** (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>
- Brown, C. H.** (2006). Prehistoric Chronology of the Common Bean in the New World: The Linguistic Evidence. *American Anthropologist*, 108(3), 507–516. <https://doi.org/10.1525/aa.2006.108.3.507>
- Buchner, P., Takahashi, H., & Hawkesford, M. J.** (2004). Plant sulphate transporters: Co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1765–1773. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh206>
- Cao, Y., Wang, E.-T., Zhao, L., Chen, W.-M., & Wei, G.-H.** (2014). Diversity and distribution of rhizobia nodulated with *P. vulgaris* in two ecoregions of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 78, 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.026>
- 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 Factors1. *Plant Physiology*, 123(2), 443–452. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.443>
- Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P. K., & Quinto, C.** (1998). Rearrangement of Actin Microfilaments in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium etli* Nodulation Signals1. *Plant Physiology*, 116(3), 871–877. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.871>
- Cernay, C., Pelzer, E., & Makowski, D.** (2016). A global experimental dataset for assessing grain legume production. *Scientific Data*, 3(1), 160084. <https://doi.org/10.1038/sdata.2016.84>
- Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A. W., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., Léran, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H. E., Daniel-Vedele, F., & Krapp, A.** (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology: CB*, 23(8), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.021>
- Chen, L.-Q.** (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201(4), 1150–1155. <https://doi.org/10.1111/nph.12445>
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., & Frommer, W. B.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468(7323), 527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chen, L.-Q., Qu, X.-Q., Hou, B.-H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., & Frommer, W. B.** (2012). Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, 335(6065), 207–211. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>
- Chianu, Jonas. N., Nkonya, E. M., Mairura, F. S., Chianu, Justina. N., & Akinnifesi, F. K.** (2011). Biological nitrogen fixation and socioeconomic factors for legume production in sub-Saharan Africa: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(1), 139–154. <https://doi.org/10.1051/agro/2010004>
- Choi, J., Summers, W., & Paszkowski, U.** (2018). Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annual Review of*

- Phytopathology*, 56(1), 135–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>
- Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C., & Mestre, P.** (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany*, 65(22), 6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>
- Dall’Agnol, R. F., Bournaud, C., de Faria, S. M., Béna, G., Moulin, L., & Hungria, M.** (2017). Genetic diversity of symbiotic Paraburkholderia species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). *FEMS Microbiology Ecology*, 93(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix027>
- Dalla Via, V., Narduzzi, C., Aguilar, O. M., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A.** (2015). Changes in the Common Bean Transcriptome in Response to Secreted and Surface Signal Molecules of *Rhizobium etli*. *Plant Physiology*, 169(2), 1356–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00508>
- de Ruijter, N. C. A., 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.9.829>
- Demir, S., Şensoy, S., Ocak, E., Tüfenkci, Ş., Durak, E. D., Erdinç, Ç., & Ünsal, H.** (2015). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus, humic acid, and whey on wilt disease caused by *Verticillium dahliae* Kleb. In three solanaceous crops. *TURKISH JOURNAL OF AGRICULTURE AND FORESTRY*, 39(2), 300–309.
- Denison, R. F., & Kiers, E. T.** (2011). Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Current Biology*, 21(18), R775–R785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.018>
- Ding, Y., Zhou, X., Zuo, L., Wang, H., & Yu, D.** (2016). Identification and functional characterization of the sulfate transporter gene GmSULTR1;2b in soybean. *BMC Genomics*, 17(1), 373. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2705-3>
- Eom, J.-S., Chen, L.-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, I., Qu, X.-Q., Braun, D. M., & Frommer, W. B.** (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.005>
- Fageria, N. K., & Baligar, V. C.** (2016). Growth, yield and yield components of dry bean as influenced by phosphorus in a tropical acid soil. *Journal of Plant Nutrition*, 39(4), 562–568. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1143489>
- Fang, Z., Martin, J., & Wang, Z.** (2012). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell & Bioscience*, 2(1), 26. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-26>
- Feng, C.-Y., Han, J.-X., Han, X.-X., & Jiang, J.** (2015). Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato. *Gene*, 573(2), 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.055>
- Feng, L., & Frommer, W. B.** (2015). Structure and function of SemiSWEET and SWEET sugar transporters. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.05.005>
- Filipini, L. D., Pilatti, F. K., Meyer, E., Ventura, B. S., Lourenzi, C. R., & Lovato, P. E.** (2021). Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with

- Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>
- Fonsêca, A., Ferreira, J., dos Santos, T. R. B., Mosiolek, M., Bellucci, E., Kami, J., Gepts, P., Geffroy, V., Schweizer, D., dos Santos, K. G. B., & Pedrosa-Harand, A.** (2010). Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chromosome Research*, 18(4), 487–502. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9129-8>
- 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. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gallardo, K., Courty, P.-E., Le Signor, C., Wipf, D., & Vernoud, V.** (2014). Sulfate transporters in the plant's response to drought and salinity: Regulation and possible functions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 580. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00580>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P.** (2008). Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, 20(5), 1407–1420. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059014>
- Geurts, R., & Bisseling, T.** (2002). *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell*, 14(suppl\_1), S239–S249. <https://doi.org/10.1105/tpc.002451>
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.-N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D.** (2010). Agroecology: The key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3>
- Gigolashvili, T., & Kopriva, S.** (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5, 442. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00442>
- Giller, K. E.** (2001). *Nitrogen fixation in tropical cropping systems 2nd Edition*. CABI. <http://sherekashmir.informaticspublishing.com/367/>
- Goh, C.-H., Veliz Vallejos, D. F., Nicotra, A. B., & Mathesius, U.** (2013). The Impact of Beneficial Plant-Associated Microbes on Plant Phenotypic Plasticity. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 826–839. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0326-8>
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P. E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D. D., Allen, J. W., Bücking, H., Lammers, P. J., & Shachar-Hill, Y.** (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435(7043), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nature03610>
- Graham, P. H., & Ranalli, P.** (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53(1), 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)
- Gruber, N., & Galloway, J. N.** (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293–296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Guo, W.-J., Nagy, R., Chen, H.-Y., Pfrunder, S., Yu, Y.-C., Santelia, D., Frommer, W. B., & Martinoia, E.** (2014). SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates

- Fructose Transport across the Tonoplast of *Arabidopsis* Roots and Leaves. *Plant Physiology*, 164(2), 777–789. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232751>
- Guo, Y. Y., Tian, S. S., Liu, S. S., Wang, W. Q., & Sui, N.** (2018). Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. *Photosynthetica*, 56(3), 861–872. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0741-0>
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H.-V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., & Sanjuan, J.** (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00638.x>
- Hu, B., Wu, H., Huang, W., Song, J., Zhou, Y., & Lin, Y.** (2019). SWEET Gene Family in *Medicago truncatula*: Genome-Wide Identification, Expression and Substrate Specificity Analysis. *Plants*, 8(9), 338. <https://doi.org/10.3390/plants8090338>
- Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, I. C.** (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 39(2), 88–93. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0682-6>
- Islas-Flores, T., Guillén, G., Alvarado-Affantranger, X., Lara-Flores, M., Sánchez, F., & Villanueva, M. A.** (2011). PvRACK1 Loss-of-Function Impairs Cell Expansion and Morphogenesis in *Phaseolus vulgaris* L. Root Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(7), 819–826. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-10-0261>
- Jiang, S., Balan, B., Assis, R. de A. B., Sagawa, C. H. D., Wan, X., Han, S., Wang, L., Zhang, L., Zaini, P. A., Walawage, S. L., Jacobson, A., Lee, S. H., Moreira, L. M., Leslie, C. A., & Dandekar, A. M.** (2020). Genome-Wide Profiling and Phylogenetic Analysis of the SWEET Sugar Transporter Gene Family in Walnut and Their Lack of Responsiveness to *Xanthomonas arboricola* pv. Juglandis Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1251. <https://doi.org/10.3390/ijms21041251>
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E.** (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science (New York, N. Y.)*, 356(6343), 1172–1175. <https://doi.org/10.1126/science.aam9970>
- Kopriva, S., Mugford, S. G., Matthewman, C., & Koprivova, A.** (2009). Plant sulfate assimilation genes: Redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1769–1780. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0793-0>
- Kyte, J., & Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lambais, M. R., Ríos-Ruiz, W. F., & Andrade, R. M.** (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 160(2), 421–428. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00881.x>
- Larimer, A. L., Bever, J. D., & Clay, K.** (2010). The interactive effects of plant microbial symbionts: A review and meta-analysis. *Symbiosis*, 51(2), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0083-1>

- Larimer, A. L., Clay, K., & Bever, J. D.** (2014). Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a prairie legume. *Ecology*, 95(4), 1045–1054. <https://doi.org/10.1890/13-0025.1>
- Lenoir, I., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A.** (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, 123, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.002>
- Li, J., Qin, M., Qiao, X., Cheng, Y., Li, X., Zhang, H., & Wu, J.** (2017). A New Insight into the Evolution and Functional Divergence of SWEET Transporters in Chinese White Pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plant and Cell Physiology*, 58(4), 839–850. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx025>
- Li, W., Ren, Z., Wang, Z., Sun, K., Pei, X., Liu, Y., He, K., Zhang, F., Song, C., Zhou, X., Zhang, W., Ma, X., & Yang, D.** (2018). Evolution and Stress Responses of *Gossypium hirsutum* SWEET Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 769. <https://doi.org/10.3390/ijms19030769>
- Li, X., Si, W., Qin, Q., Wu, H., & Jiang, H.** (2018). Deciphering evolutionary dynamics of SWEET genes in diverse plant lineages. *Scientific Reports*, 8(1), 13440. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31589-x>
- Liu, C.-W., & Murray, J. D.** (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants*, 5(3), 33. <https://doi.org/10.3390/plants5030033>
- Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L.-Q., Gase, K., Kim, S.-G., Kessler, D., Klinkenberg, P. M., Gorder, M. K., Hou, B.-H., Qu, X.-Q., Carter, C. J., Baldwin, I. T., & Frommer, W. B.** (2014). Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, 508(7497), 546–549. <https://doi.org/10.1038/nature13082>
- Linderman, R. G., & Davis, E. A.** (2004). Varied response of marigold (*Tagetes* spp.) genotypes to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, 99(1), 67–78. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00081-5)
- López-Ráez, J. A., & Pozo, M. J.** (2013). Chemical Signalling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Biotechnological Applications. En R. Aroca (Ed.), *Symbiotic Endophytes* (pp. 215–232). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_11)
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T. G. del, Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L.** (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature11237>
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E. A., Driguez, H., Bécard, G., & Dénarié, J.** (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Manck-Götzenberger, J., & Requena, N.** (2016). Arbuscular mycorrhiza Symbiosis Induces a Major Transcriptional Reprogramming of the Potato SWEET Sugar Transporter Family. *Frontiers in Plant Science*, 7, 487. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00487>
- Marsh, J. F., Rakocevic, A., Mitra, R. M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S. R., Schultze, M., Ratet, P., & Oldroyd, G. E. D.** (2007). *Medicago truncatula*

- NIN* Is Essential for Rhizobial-Independent Nodule Organogenesis Induced by Autoactive Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiology*, 144(1), 324–335. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093021>
- Maruyama-Nakashita, A., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T., Saito, K., & Takahashi, H.** (2015). Sulfur-Responsive Elements in the 3'-Nontranscribed Intergenic Region Are Essential for the Induction of SULFATE TRANSPORTER 2;1 Gene Expression in *Arabidopsis* Roots under Sulfur Deficiency. *The Plant Cell*, 27(4), 1279–1296. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134908>
- Mizuno, H., Kasuga, S., & Kawahigashi, H.** (2016). The sorghum SWEET gene family: Stem sucrose accumulation as revealed through transcriptome profiling. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0546-6>
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M.-K., Santana, O., Sánchez, F., & Quinto, C.** (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH Oxidase Gene is Required for Root Infection by Rhizobia. *Plant and Cell Physiology*, 53(10), 1751–1767. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs120>
- Murray, J. D.** (2011). Invasion by Invitation: Rhizobial Infection in Legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 24(6), 631–639. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0181>
- Musandu, A. A. O., & Joshua, O. O.** (2001). Response of Common Bean to *Rhizobium* Inoculation and Fertilizers. *Journal of Food Technology in Africa*, 6(4), 121–125. <https://doi.org/10.4314/jfta.v6i4.19303>
- Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J.** (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris* - nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.02.001>
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Gómez, B.-M., Blanco, L., & Lara, M.** (2017). 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182328>
- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M.-K., Affantrange, X. A., Sánchez, F., & Lara, M.** (2014). Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 281–298. <https://doi.org/10.1111/jipb.12156>
- Oldroyd, G. E. D.** (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A.** (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Patil, G., Valliyodan, B., Deshmukh, R., Prince, S., Nicander, B., Zhao, M., Sonah, H., Song, L., Lin, L., Chaudhary, J., Liu, Y., Joshi, T., Xu, D., & Nguyen, H. T.** (2015). Soybean (*Glycine max*) SWEET gene family: Insights through comparative genomics, transcriptome profiling and whole genome re-sequence analysis. *BMC Genomics*, 16(1), 520. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1730-y>

- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J.** (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180–201. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000>
- Peters, N. K., Frost, J. W., & Long, S. R.** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* (New York, N.Y.), 233(4767), 977–980. <https://doi.org/10.1126/science.3738520>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J.** (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291–303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>
- Rajnovic, I., Ramírez-Bahena, M.-H., Sánchez-Juanes, F., González-Buitrago, J.-M., Kajic, S., Peix, Á., Velázquez, E., & Sikora, S.** (2019). Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* in Croatia and definition of the symbiovar phaseoli within the species *Rhizobium pisi*. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(6), 126019. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126019>
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J. P. W., & Masson-Boivin, C.** (2016). Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends in Microbiology*, 24(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>
- Rodríguez-López, J., Martínez-Centeno, C., Padmanaban, A., Guillén, G., Olivares, J. E., Stefano, G., Lledías, F., Ramos, F., Ghabrial, S. A., Brandizzi, F., Rocha-Sosa, M., Díaz-Camino, C., & Sanchez, F.** (2014). Nodulin 22, a Novel Small Heat-Shock Protein of the Endoplasmic Reticulum, Is Linked to the Unfolded Protein Response in Common Bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 27(1), 18–29. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0200-R>
- Rouhrazi, K., Khodakaramian, G., & Velázquez, E.** (2016). Phylogenetic diversity of rhizobial species and symbiovars nodulating *Phaseolus vulgaris* in Iran. *FEMS Microbiology Letters*, 363(5). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw024>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K.** (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation [OPEN]. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Sanchez-Lopez, R., Jáuregui, D., & Quinto, C.** (2012). SymRK and the nodule vascular system. *Plant Signaling & Behavior*, 7(6), 691–693. <https://doi.org/10.4161/psb.20181>
- Sánchez-López, R., Jáuregui, D., Nava, N., Alvarado-Affantranger, X., Montiel, J., Santana, O., Sanchez, F., & Quinto, C.** (2011). Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant, Cell & Environment*, 34(12), 2109–2121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02408.x>
- Sangerman-Jarquín, D. M., Acosta-Gallego, J. A., Schwenstesus de Rindermann, R., Damián Huato, M. Á., & Larqué Saavedra, B. S.** (2010). Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(3), 363–380.
- Schoonhoven, A. van, & Voysest Voysest, O.** (1991). *Common beans: Research for crop improvement*. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/54389>

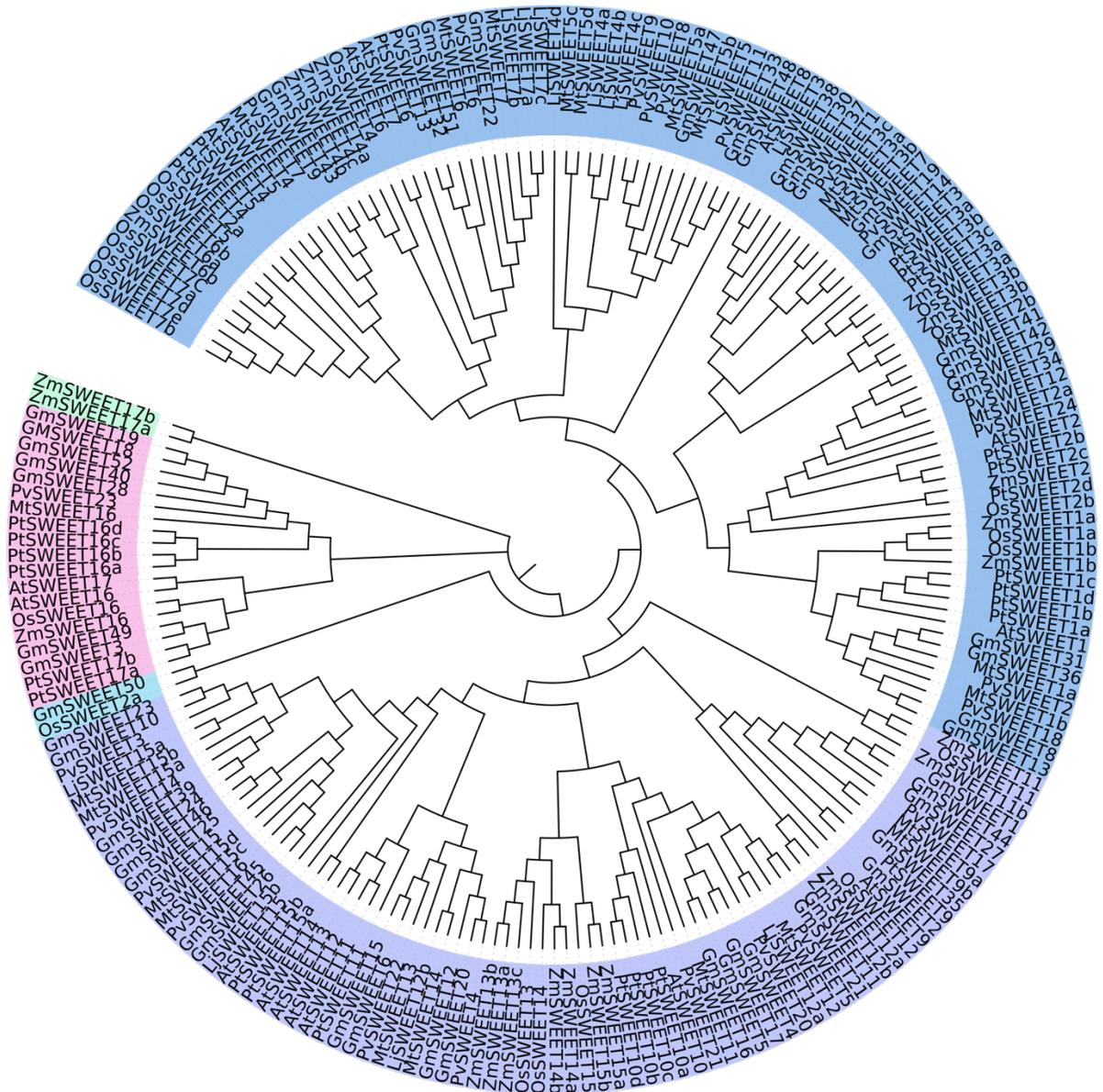
- Sensoy, S., Demir, S., Turkmen, O., Erdinc, C., & Savur, O. B.** (2007). Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, 113(1), 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.023>
- Shamseldin, A., & Velázquez, E.** (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: A review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>
- Shibagaki, N., & Grossman, A. R.** (2004). Probing the Function of STAS Domains of the *Arabidopsis* Sulfate Transporters \*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30791–30799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403248200>
- Shibagaki, N., & Grossman, A. R.** (2010). Binding of Cysteine Synthase to the STAS Domain of Sulfate Transporter and Its Regulatory Consequences \*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 25094–25102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126888>
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., & Lalonde, M.** (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363(6424), 67–69. <https://doi.org/10.1038/363067a0>
- Singh, R. P., Gupta, S. C., & Yadav, A. S.** (2008). Effect of levels and sources of phosphorus and PSB on growth and yield of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Legume Research*, 31, 139–141.
- Singh, S. P., Terán, H., Muñoz, C. G., & Takegami, J. C.** (1999). Two Cycles of Recurrent Selection for Seed Yield in Common Bean. *Crop Science*, 39(2), crops1999.0011183X0039000200015x. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X0039000200015x>
- 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 (New York, N.Y.)*, 308(5729), 1789–1791. <https://doi.org/10.1126/science.1111025>
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesford, M. J., & Clarkson, D. T.** (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9373–9377. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9373>
- Smith, S. E., & Read, D. J.** (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed). Academic Press.
- Smith, S. E., & Smith, F. A.** (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & Hayashi, M.** (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLOS Genetics*, 9(3), e1003352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003352>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E.** (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete

- fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.  
<https://doi.org/10.3852/16-042>
- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M.** (2015). Chapter Three - Leguminous Plants: Inventors of Root Nodules to Accommodate Symbiotic Bacteria. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 316, pp. 111–158). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004>
- Takahashi, H., Buchner, P., Yoshimoto, N., Hawkesford, M., & Shiu, S.-H.** (2012). Evolutionary Relationships and Functional Diversity of Plant Sulfate Transporters. *Frontiers in Plant Science*, 2, 119. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00119>
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., & Hell, R.** (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: Molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 157–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103921>
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A., & Verrips, C. T.** (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 67–83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00533.x>
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., & Poole, P. S.** (2015). Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME Journal*, 9(11), 2349–2359. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbrick, D., Osbourn, A., Grant, A., & Poole, P. S.** (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*, 7(12), 2248–2258. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.119>
- Turuko, M., & Mohammed, A.** (2014). Effect of Different Phosphorus Fertilizer Rates on Growth, Dry Matter Yield and Yield Components of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Agricultural Research*, 2(3), 88–92. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-3-1>
- Valverde, A., Velázquez, E., Cervantes, E., Igual, J. M., & van Berkum, P.** (2011). Evidence of an American Origin for Symbiosis-Related Genes in *Rhizobium lusitanum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5665–5670. <https://doi.org/10.1128/AEM.02017-10>
- Vatansever, R., Koc, I., Ozyigit, I. I., Sen, U., Uras, M. E., Anjum, N. A., Pereira, E., & Filiz, E.** (2016). Genome-wide identification and expression analysis of sulfate transporter (SULTR) genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Planta*, 244(6). <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2575-6>
- Walling, null.** (2000). The Myriad Plant Responses to Herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), 195–216. <https://doi.org/10.1007/s003440000026>
- Wang, B., & Qiu, Y.-L.** (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299–363. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6>
- Wang, L., Cao, Y., Wang, E. T., Qiao, Y. J., Jiao, S., Liu, Z. S., Zhao, L., & Wei, G. H.** (2016). Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.02.001>

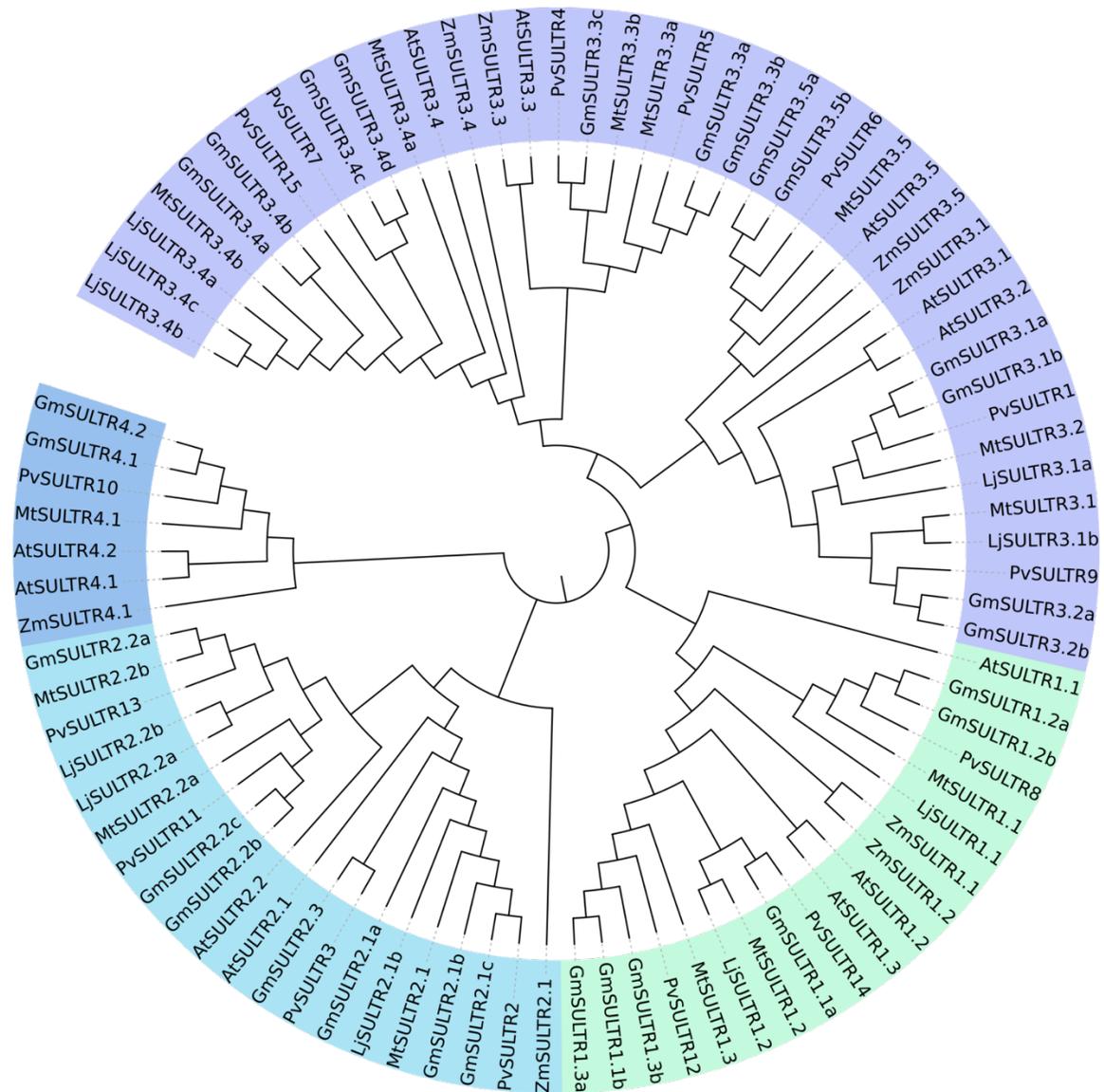
- Wang, L., Yao, L., Hao, X., Li, N., Qian, W., Yue, C., Ding, C., Zeng, J., Yang, Y., & Wang, X.** (2018). Tea plant SWEET transporters: Expression profiling, sugar transport, and the involvement of CsSWEET16 in modifying cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 96(6), 577–592.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-018-0716-y>
- Wang, S., Su, J.-H., Beliveau, B. J., Bintu, B., Moffitt, J. R., Wu, C., & Zhuang, X.** (2016). Spatial organization of chromatin domains and compartments in single chromosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6299), 598–602.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaf8084>
- Wang, W., Shi, J., Xie, Q., Jiang, Y., Yu, N., & Wang, E.** (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Molecular Plant*, 10(9), 1147–1158. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.012>
- Wei, X., Liu, F., Chen, C., Ma, F., & Li, M.** (2014). The *Malus domestica* sugar transporter gene family: Identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. *Frontiers in Plant Science*, 5, 569.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00569>
- Weinert, N., Piceno, Y., Ding, G.-C., Meincke, R., Heuer, H., Berg, G., Schloter, M., Andersen, G., & Smalla, K.** (2011). PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: Many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 497–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01025.x>
- Xu, Y., Tao, Y., Cheung, L. S., Fan, C., Chen, L.-Q., Xu, S., Perry, K., Frommer, W. B., & Feng, L.** (2014). Structures of bacterial homologues of SWEET transporters in two distinct conformations. *Nature*, 515(7527), 448–452.  
<https://doi.org/10.1038/nature13670>
- Xuan, Y. H., Hu, Y. B., Chen, L.-Q., Sosso, D., Ducat, D. C., Hou, B.-H., & Frommer, W. B.** (2013). Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), E3685–E3694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311244110>
- Yadegari, M., Rahmani, H. A., Noormohammadi, G., & Ayneband, A.** (2008). Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 11(15), 1935–1939.  
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1935.1939>
- Yi, H., Ravilious, G. E., Galant, A., Krishnan, H. B., & Jez, J. M.** (2010). From sulfur to homogluthathione: Thiol metabolism in soybean. *Amino Acids*, 39(4), 963–978.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0572-9>
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T., & Takahashi, H.** (2003). Phloem-localizing sulfate transporter, Sultr1;3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131(4), 1511–1517.  
<https://doi.org/10.1104/pp.014712>
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F. W., Yamaya, T., & Saito, K.** (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, 29(4), 465–473.  
<https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01231.x>

- Yuan, M., & Wang, S.** (2013). Rice MtN3/Saliva/SWEET Family Genes and Their Homologs in Cellular Organisms. *Molecular Plant*, 6(3), 665–674.  
<https://doi.org/10.1093/mp/sst035>
- Yuan, Z., Long, W., Hu, H., Liang, T., Luo, X., Hu, Z., Zhu, R., & Wu, X.** (2021). Genome-Wide Identification and Expansion Patterns of SULTR Gene Family in Gramineae Crops and Their Expression Profiles under Abiotic Stress in *Oryza sativa*. *Genes*, 12(5), 634. <https://doi.org/10.3390/genes12050634>
- Zhang, W., Wang, S., Yu, F., Tang, J., Shan, X., Bao, K., Yu, L., Wang, H., Fei, Z., & Li, J.** (2019). Genome-wide characterization and expression profiling of SWEET genes in cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata* L.) reveal their roles in chilling and clubroot disease responses. *BMC Genomics*, 20(1), 93.  
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5454-2>
- Zinga, M. K., Jaiswal, S. K., & Dakora, F. D.** (2017). Presence of diverse rhizobial communities responsible for nodulation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in South African and Mozambican soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(2).  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw236>

## 12. ANEXOS

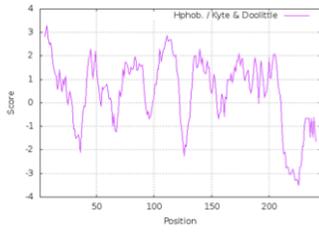


**Figura A1.** Filograma de unión de vecinos de genes *SWEET* en diversos organismos. Filograma de unión de vecinos basado en el alineamiento múltiple de secuencias homólogas de los genes *SWEET* en 7 especies (*P. vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* y *Populus trichocarpa*). Se etiquetaron con respecto a la bibliografía. Se distribuyen en 5 clados.

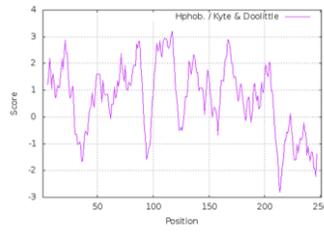


**Figura A2.** Filograma de unión de vecinos de genes *SULTR* en diversos organismos.. Filograma de unión de vecinos basado en el alineamiento múltiple de secuencias homólogas de los genes *SULTR* en 7 especies (*P. vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Zea mays*). Se etiquetaron con respecto a la bibliografía. Se distribuyen en 4 clados.

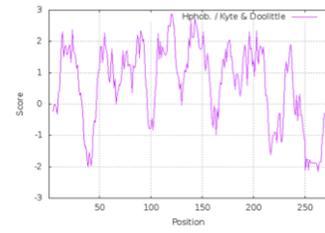
**SWEET1**



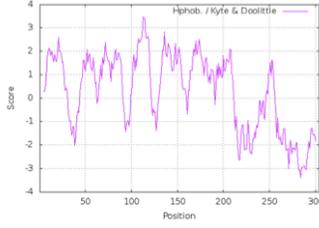
**SWEET2**



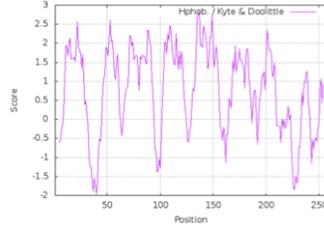
**SWEET3**



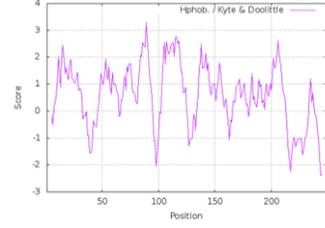
**SWEET4**



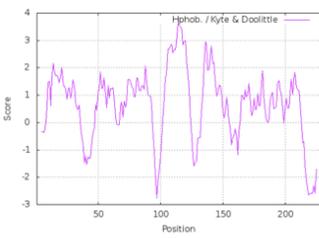
**SWEET5**



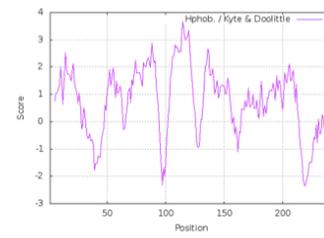
**SWEET6**



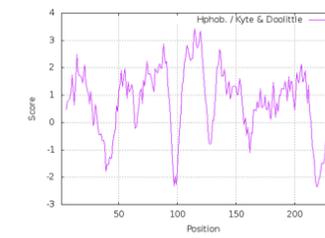
**SWEET7**



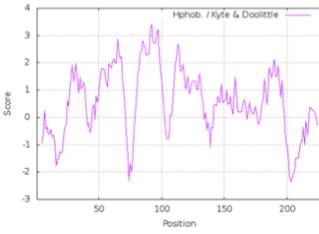
**SWEET8**



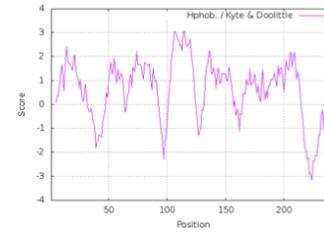
**SWEET9**



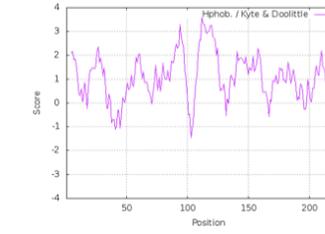
**SWEET10**



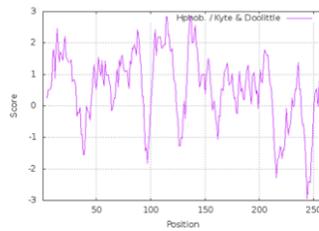
**SWEET11**



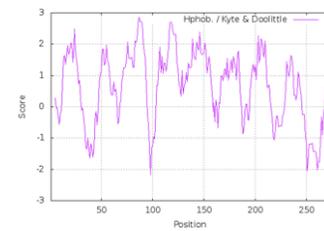
**SWEET12**



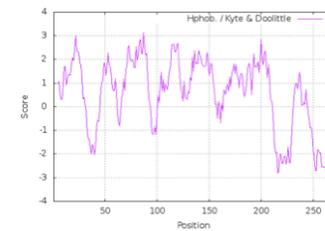
**SWEET13**

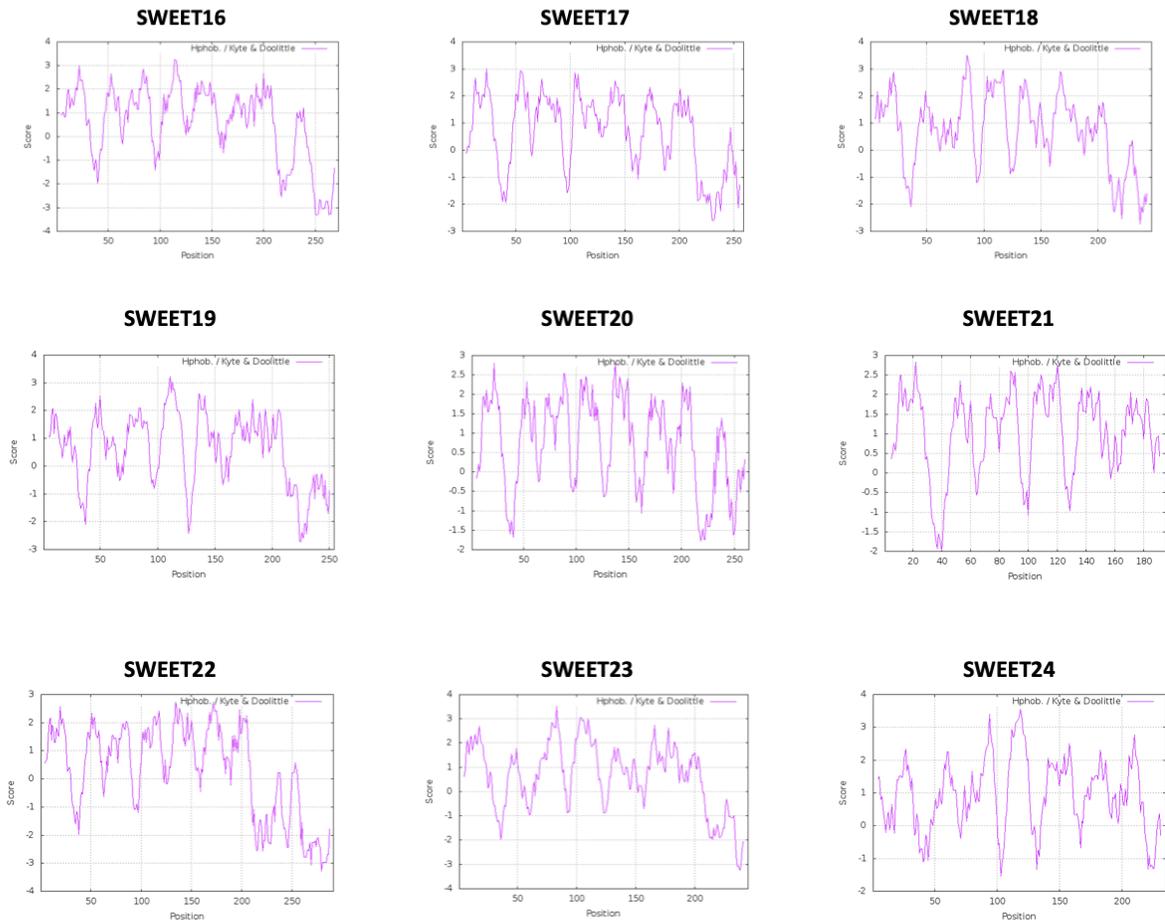


**SWEET14**

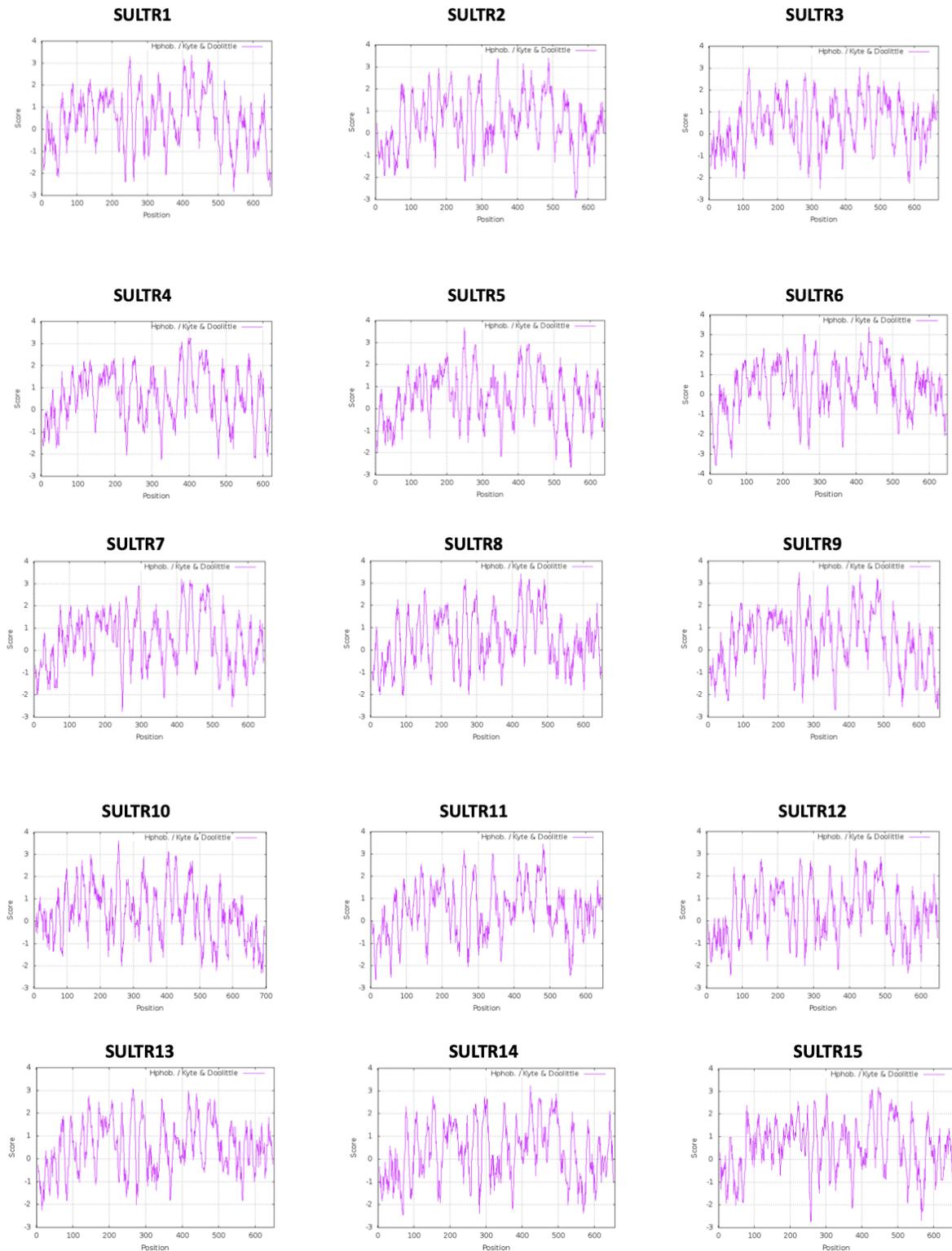


**SWEET15**





**Figura A3.** Hidrofobicidad de las proteínas SWEET de *P. vulgaris*. Utilizando los criterios establecidos por Kyte y Doolittle se analizó la hidrofobicidad de cada aminoácido en la secuencia del péptido SWEET para determinar las regiones hidrofóbicas de la proteína. Los picos resultantes en la puntuación concuerdan con las regiones transmembrana.



**Figura A4.** Hidrofobicidad de las proteínas SULTR de *P. vulgaris*. Utilizando los criterios establecidos por Kyte y Doolittle se analizó la hidrofobicidad de cada aminoácido en la secuencia del péptido SULTR para determinar las regiones hidrofóbicas de la proteína. Los picos resultantes en la puntuación concuerdan con las regiones transmembrana.

**Tabla A1.** Lista de proteínas SWEET de *P. vulgaris* con puntuaciones GRAVY.

Nombre del gen	ID del gen	Puntaje GRAVY*
SWEET1	Phvul.001G061900	0.504
SWEET2	Phvul.001G064300	0.680
SWEET3	Phvul.002G203600	0.672
SWEET4	Phvul.002G283800	0.285
SWEET5	Phvul.002G283900	0.771
SWEET6	Phvul.002G300900	0.568
SWEET7	Phvul.003G199300	0.651
SWEET8	Phvul.004G017100	0.764
SWEET9	Phvul.004G017200	0.725
SWEET10	Phvul.004G017300	0.550
SWEET11	Phvul.004G017400	0.672
SWEET12	Phvul.005G076300	0.935
SWEET13	Phvul.006G000600	0.586
SWEET14	Phvul.006G210800	0.686
SWEET15	Phvul.008G001100	0.607
SWEET16	Phvul.008G001200	0.583
SWEET17	Phvul.008G007600	0.665
SWEET18	Phvul.009G134300	0.700
SWEET19	Phvul.009G137700	0.548
SWEET20	Phvul.009G162700	0.721
SWEET21	Phvul.009G162800	1.032
SWEET22	Phvul.009G162900	0.297
SWEET23	Phvul.009G249700	0.595
SWEET24	Phvul.011G168100	0.941

\*GRAVY: gran promedio de hidropatía, por sus siglas en inglés grand average of hydropathy.

**Tabla A2.** Lista de proteínas SULTR de *P. vulgaris* con puntuaciones GRAVY.

Nombre del gen	ID del gen	Puntaje GRAVY*
SULTR1	Phvul.001G154200	0.401
SULTR2	Phvul.001G250700	0.507
SULTR3	Phvul.001G250800	0.462
SULTR4	Phvul.002G095200	0.569
SULTR5	Phvul.002G095300	0.508
SULTR6	Phvul.004G161600	0.354
SULTR7	Phvul.005G171800	0.452
SULTR8	Phvul.006G207800	0.475
SULTR9	Phvul.007G174100	0.344
SULTR10	Phvul.008G015600	0.336
SULTR11	Phvul.008G170700	0.462
SULTR12	Phvul.008G170800	0.371
SULTR13	Phvul.009G028400	0.51
SULTR14	Phvul.009G028500	0.296
SULTR15	Phvul.010G151000	0.515

\*GRAVY: gran promedio de hidropatía, por sus siglas en inglés grand average of hydropathy.

**Tabla A3.** Lista de las interacciones proteína-proteína entre las proteínas de señalización y las proteínas putativas de micorrización (PvSWEET22 y PvSULTR2) y rizobio (PvSWEET23 y PvSULTR3).

Símbolo del gen	Nombre	Tipo de proteína/Función molecular	ID del gen	Genes de interacción
BCH1_BCH2	$\beta$ -caroteno hydroxylasa	Enzima (Hidroxilasa)	Phvul.001G100100	SULTR2, SWEET22, SULTR3, SWEET23
bHLHm1	Transportador de amoníaco simbiótico	TF (motivo que contiene bHLH)	Phvul.006G198400	SULTR2, SULTR3
FWL1	Fruit weight 2.2-like 1	Desconocido (motivo que contiene PLAC8)	Phvul.003G292900	SULTR2, SULTR3
G $\alpha$	Proteínas g heterotriméricas de la soya	Subunidad del complejo proteico G heterotrimérico	Phvul.001G092700	SULTR2, SULTR3
Gmg $\beta$ 1/Gmg $\beta$ 2/Gmg $\beta$ 3/Gmg $\beta$ 4	Proteínas g heterotriméricas de la soya	Subunidad del complejo proteico G heterotrimérico	Phvul.011G045900	SULTR2, SULTR3
Gmgy1/Gmgy2/Gmgy3/Gmgy4/Gmgy5/Gmgy6/Gmgy7/Gmgy8/Gmgy9,Gmgy10	Proteínas g heterotriméricas de la soya	Subunidad del complejo proteico G heterotrimérico	Phvul.007G175700	SULTR2, SULTR3
INS1	Aumento del tamaño de los nódulos 1	Componente de la pared celular (b-expansina)	Phvul.003G016300	SULTR2
NNC1	Control del número de nódulos 1	TF (dominio que contiene AP2)	Phvul.011G071100	SULTR2, SWEET23
PT5	Transportador de fosfato 5	Transportador (Fosfato)	Phvul.001G160600	SULTR2, SULTR3, SWEET23
RGS1	Regulador de la señalización de la proteína g 1	Activador de GTPasa	Phvul.001G257500	SULTR2, SULTR3
Rj4	Regulatory gene	Proteína tipo taumatina	Phvul.002G107900	SULTR2, SWEET22, SULTR3
SGF14c_SGF14l	Factor g-box de soya 14-3-3	Reguladores transcripcional	Phvul.002G238300	SULTR2, SULTR3
AMT1.1	Transportador de amonio 1.1	Transportador (Amonio)	Phvul.007G231700	SULTR2, SULTR3, SWEET23
BZF	Proteína básica de la familia de las cremalleras de leucina	TF (dominio que contiene bZIP)	Phvul.006G029200	SULTR2, SULTR3
CASTOR	No hace infecciones 1	Canal (Cationes)	Phvul.006G218700	SULTR2, SULTR3
CKX3	Citoquinina oxidasa/deshidrogenasa 3	Enzima (Oxidoreductasa)	Phvul.009G231700	SULTR2, SULTR3, SWEET23
CYCLOPS(IPD3)	Proteína de interacción dmi 3	Activador transcriptional	Phvul.002G128600	SULTR2, SULTR3, SWEET23
EIN2b	Insensible al etileno 2	Proteína NRAMP	Phvul.007G150600	SULTR2, SULTR3
EPR3	Receptor de exopolisacáridos	Enzima (Cinasa; LysM-RLK)	Phvul.002G059500	SULTR2, SWEET22, SULTR3
ERF1	Factor de respuesta al etileno 1	TF (Respuesta al etileno)	Phvul.007G127800	SULTR2, SULTR3, SWEET23
LSK1	Cinasa como shaggy	Enzima (Cinasa)	Phvul.010G090200	SULTR2, SULTR3
MPK6	Mapa cinasa 6	Enzima (Cinasa)	Phvul.003G059500	SULTR2, SULTR3

NFR5	Receptor del factor Nod	Enzima (Cinasa; LysM-RLK)	Phvul.002G025500	SULTR2, SULTR3
NFR <sub>e</sub>	Señalización del factor Nod en la epidermis	Enzima (Cinasa; LysM-RLK)	Phvul.008G211200	SULTR2, SULTR3, SWEET23
NIN	TF (Con dominio RWP-RK)	TF (dominio que contiene RWP-RK)	Phvul.008G291800	SULTR2, SULTR3
NRSYM1	Simbiosis sin respuesta al nitrato 1	TF (dominio que contiene RWP-RK)	Phvul.007G071900	SULTR2, SULTR3, SWEET23
ROP6	Familia Rho de pequeñas GTPasas en las plantas	Enzima (Hidrolasa)	Phvul.003G265200	SULTR2, SULTR3
SIE3	SYMRK que interactúa con la ubiquitina ligasa e3	Enzima (Ligasa)	Phvul.003G286000	SULTR2, SULTR3
SIP2	Proteína de interacción con SYMRK 2	Enzima (MAPKK)	Phvul.010G163000	SULTR2, SULTR3
SST1	Transportador de sulfato 1	Transportador (Sulfato)	Phvul.004G161600	SULTR2, SULTR3
SYMRK	Receptor simbiótico quinasa/no hace infecciones 2	Enzima (Cinasa; LRR-RLK)	Phvul.002G143400	SULTR2, SULTR3, SWEET23
SYMRK	Receptor simbiótico quinasa/no hace infecciones 2	Enzima (Cinasa; LRR-RLK)	Phvul.002G116200	SULTR2, SWEET22, SULTR3
TCO	TRICOT	Enzima (Carboxipeptidasa)	Phvul.001G199600	SULTR2
TML(TML1)	TOO MUCH LOVE	Proteína F box	Phvul.001G094400	SULTR2, SWEET23
NADH-GOGAT	Glutamina síntesis/glutamato síntesis dependiente de NADH	Enzima (NADH-GOGAT)	Phvul.001G076400	SULTR2, SULTR3
ARF16a	Factor de respuesta a la auxina 16a	TF (Respuesta a la auxina)	Phvul.007G095000	SULTR2, SULTR3
BHLH1	Hélice-bucle-hélice básica 1	TF (motivo que contiene bHLH)	Phvul.009G033800	SULTR2, SULTR3
BRI1	Insensible a los brasinoesteroides 1	Cinasa (LRR-RLK)	Phvul.005G005900	SULTR2, SULTR3
CBS1	Cistatión betasintasa 1	Enzima (Sintasa)	Phvul.004G106300	SULTR2, SULTR3
CCS52a	Gen del interruptor del ciclo celular que codifica una proteína de 52 kda	Activador del complejo promotor de la anafase	Phvul.003G213700	SULTR2, SULTR3
CDC16	Ciclo de división celular16	Activador del complejo promotor de la anafase	Phvul.011G165500	SULTR2, SULTR3
CDPK1	Proteína quinasa dependiente del calcio 1	Enzima (quinasa dependiente del calcio)	Phvul.002G108700	SULTR2, SULTR3
CNGC15a	Canales activados por nucleótidos cíclicos 15a	Canal (Cationes)	Phvul.007G148700	SULTR2, SULTR3, SWEET23
CNGC15b	Canales activados por nucleótidos cíclicos 15b	Canal (Cationes)	Phvul.011G080800	SULTR2, SULTR3
CNGC15c	Canales activados por nucleótidos cíclicos 15c	Canal (Cationes)	Phvul.005G133900	SULTR2, SULTR3
COPT1	Transportador de cobre 1	Transportador (Cobre)	Phvul.008G113200	SULTR2, SULTR3, SWEET23
CRN	Coryne	Pseudocinasa	Phvul.008G019200	SULTR2, SULTR3
CYP15a	Cisteína proteasa 15a	Enzima (Proteasa de cisteína)	Phvul.001G009900	SULTR2, SULTR3, SWEET23
DELLA1	DELLA 1	Regulador transcripcional (motivo D-E-L-L-A)	Phvul.001G230500	SULTR2, SULTR3, SWEET23
DELLA2	DELLA 2	Regulador transcripcional (motivo D-E-L-L-A)	Phvul.003G291500	SULTR2, SULTR3, SWEET23

DMI1(POLLUX)	Coes no hace infecciones 1	Canal (Cationes)	Phvul.006G218700	SULTR2, SULTR3
ERN1	Factor de respuesta al etileno necesario para la nodulación1	TF (Respuesta al etileno)	Phvul.001G111800	SULTR2, SULTR3
ERN2	Factor de respuesta al etileno necesario para la nodulación1	TF (Respuesta al etileno)	Phvul.001G160100	SWEET23
FER2	Ferritinas	Complejo proteínico (eliminación del hierro)	Phvul.001G245700	SULTR2, SULTR3, SWEET23
FER3	Ferritinas	Complejo proteínico (eliminación del hierro)	Phvul.010G065600	SULTR3, SWEET23
LOG1	Lonelyguy1	Enzima (Hidrolasa), citoquinina ribosida 5'-monofosfato fosforibohidrolasas	Phvul.001G177400	SULTR2, SULTR3, SWEET23
MOT1.2	Tipo de transportador de molibdato 1.2	Transportador (Molibdato)	Phvul.001G056100	SULTR2, SWEET22, SULTR3
MOT1.3	Tipo de transportador de molibdato 1.3	Transportador (Molibdato)	Phvul.001G056300	SULTR2, SWEET22, SULTR3
N5	Nodulina 5	Peptido (Rico en cisteína; familia nsLTP)	Phvul.008G112900	SULTR2, SULTR3, SWEET23
NAC969	Nam/ataf/cuc-codificación 969	TF (Dominio NAC)	Phvul.003G045600	SULTR2, SULTR3
NIP_LATD_NPF1.7	Numerosas infecciones y polifenoles/órgano radicular defectuoso	Transportador (Nitrate)	Phvul.002G242200	SULTR2, SWEET22, SULTR3
NOOT	Raíz del nódulo	TF (Familia BLADE-ON-PETIOLE)	Phvul.001G124100	SULTR2, SULTR3
NSP1	Vía de señalización de la nodulación 1	TF (Familia GRAS)	Phvul.010G129400	SULTR2, SULTR3
NSP2	Vía de señalización de la nodulación 2	TF (Familia GRAS)	Phvul.009G122700	SULTR2, SWEET22
PEN3-like	Penetración3 - like	Transportador (Tipo ABC-G)	Phvul.005G166500	SULTR2, SULTR3, SWEET23
PHO2-like	Fosfato2 - like	Enzima (Ligasa E2)	Phvul.006G185400	SULTR2, SULTR3
Pin2/Pin3/Pin4	Formado por pines	Transportador (Eflujo de auxina)	Phvul.003G139600	SULTR2, SULTR3
Pin2/Pin3/Pin4	Formado por pines	Transportador (Eflujo de auxina)	Phvul.003G032500	SULTR2
Pin2/Pin3/Pin4	Formado por pines	Transportador (Eflujo de auxina)	Phvul.004G150600	SULTR2, SULTR3, SWEET23
Plt1/Plt2/Plt3/Plt4	Plétora 1	TF (Dominio que contiene AP2)	Phvul.002G146400	SULTR2, SWEET22, SULTR3
PUB1	Proteína de caja U vegetal 1	Enzima (Ligasa)	Phvul.008G222100	SULTR2, SULTR3, SWEET23
SER6	Serpin	Enzima (Inhibidor de la serina proteasa)	Phvul.009G062300	SULTR2, SULTR3
SKL(EIN2a)	Insensible al etileno 2	Proteína NRAMP	Phvul.001G177500	SULTR2, SULTR3
SPK1	Proteína cinasa simbiótica 1	Enzima (Cinasa; Citoplasma)	Phvul.003G149200	SULTR2, SWEET22, SULTR3
TIP1g	Proteína intrínseca del tonoplasto 1g	Canales (Agua)	Phvul.011G067200	SULTR2, SWEET22, SULTR3
VPE	Enzima de procesamiento vacuolar	Enzima (Proteasas cisteína-aspárticas)	Phvul.001G033500	SULTR2, SWEET22, SULTR3

ZIP6	Zinc permeasa de hierro 6	Transportador (Eflujo de zinc)	Phvul.002G099700	SULTR2, SULTR3, SWEET23
ZPT2	Krüppel-like cys-2/Proteína dedo de zinc his-2	TF (Motivo que contiene dedo de zinc)	Phvul.009G070800	SULTR2, SULTR3
AGO5_AGO5	Argonauta 5	Proteína multidominio (silenciamiento del ARN)	Phvul.011G088200	SULTR2, SULTR3
BPS1	Bypass1	Desconocido (DUF)	Phvul.008G059600	SULTR2, SULTR3
PRAT3	Glutamina fosforibosil pirofosfato amidotransferasa 3	Enzima (Purina sintasa)	Phvul.009G002200	SULTR2, SULTR3
RabA2	Rab (proteínas relacionadas con el ras en el cerebro) GTPasas RabA2	Enzima (Hidrolasa)	Phvul.011G061100	SULTR2, SULTR3
SIN1	Espantapájaros como-13 implicado en la nodulación 1	TF (Familia GRAS)	Phvul.003G085000	SULTR2, SWEET22, SULTR3
EXPB2	$\beta$ -expansina b2	Expansina	Phvul.008G144100	SWEET22
UPS1	Ureida permeasa	Transportador (Alantoína)	Phvul.003G042800	SWEET22, SULTR3
APN1	Peptidasa aspártica inducida por nódulos 1	Enzima (Aspartil proteasa)	Phvul.005G050500	SWEET22
LAN	Falta de alojamiento de los simbiontes	Complejo multiproteína	Phvul.002G127500	SWEET22
LNP	Lectina nucleótido fosfohidrolasa	Enzima (Hidrolasa)	Phvul.001G099900	SWEET22, SULTR3, SWEET23
SEN1	Nódulo endosimbionte estacionario 1	Transportador (Hierro vacuolar)	Phvul.002G205200	SWEET22 y SWEET23
BG2	$\beta$ -1,3 -glucanasa	Enzima (Glucanasa)	Phvul.001G056400	SWEET22 y SWEET23
CP6	Proteinasa de cisteína 6	Enzima (Cisteína proteasa)	Phvul.011G132100	SWEET22
<i>KNAT3/KNAT5/KNAT9/KNAT10</i>	Knotted-1 como tomar proteínas de dominio propio	TF (Homeodominio KNOX)	Phvul.003G174900	SWEET22
<i>KNAT3/KNAT5/KNAT9/KNAT10</i>	Knotted-1 como tomar proteínas de dominio propio	TF (Homeodominio KNOX)	Phvul.009G209500	SWEET22
LIN_LIN	Infecciones de bulto	Enzima (Ligasa)	Phvul.007G136300	SWEET22
NLP1	Nin como proteína	TF (con dominio RWP-RK)	Phvul.005G155100	SWEET22
NPD1_NPD2_NPD3_NPD4_NPD5	Proteína de dominio plat específico de los nódulos 2	Proteína de membrana (con dominio PLAT)	Phvul.005G177100	SWEET22 y SWEET23
SymREM1	Remorina simbiótica 1	Proteína de membrana (Remorin)	Phvul.002G155800	SWEET22 y SWEET23
SYT1_SYT2_SYT3	Sinaptogamina	Proteína de membrana	Phvul.001G005500	SWEET22 y SWEET23
SYT1_SYT2_SYT3	Sinaptogamina	Proteína de membrana	Phvul.011G035100	SWEET22 y SWEET23
ZR1	Proteína de cinta de zinc 1	Proteína desconocida	Phvul.011G068500	SWEET22
RGS2	Regulador de la señalización de la proteína g 1	Activador GTPasa	Phvul.001G257500	SULTR3
NPF8.6	Familia NRT1/PTR	Transportador (Nitrato)	Phvul.006G065900	SULTR3
RPG	Crecimiento polar dirigido por Rhizobium	Desconocido (Dominio RRP)	Phvul.007G145600	SULTR3
RR5_RR9_RR11	Regulador de respuesta	Regulador de respuesta	Phvul.005G027100	SULTR3, SWEET22
SACPD-C	Proteína transportadora de estearilo desaturada isoforma c	Enzima (Oxidoreductasa)	Phvul.001G064100	SWEET23
BRUSH	BRUSH	Canal (Cationes)	Phvul.004G143800	SWEET23

CHIT5	Quitinasa 5	Enzima (Glicosilhidrolasa)	Phvul.001G046400	SWEET23
IPT3	Isopentenil transferasa	Enzima (Transferasa)	Phvul.007G170100	SWEET23
MATE1	Extrusión de medicamentos y compuestos tóxicos 1	Transportador (Citrato)	Phvul.005G021900	SWEET23
NENA	Factor Nod hidrolasa 1	Enzima (Glicosilhidrolasa)	Phvul.003G158800	SWEET23
NPL	Nódulo de pectato liasa	Enzima (Liasa)	Phvul.001G256800	SWEET23
nsRING	Nuevo gen realmente interesante y específico para los nódulos	Enzima (Ligasa)	Phvul.002G317800	SWEET23