



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD LEÓN**

• • •

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL
PROMOTOR DE *PVSNRK3* DURANTE LA
NODULACIÓN DE FRIJOL COMÚN**

FORMA DE TITULACIÓN: TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

P R E S E N T A :

Brenda Mariana Gómez Ramírez



**TUTOR: Dr. Manojkumar Arthilkala
ASESOR: Dra. Kalpana Nanjareddy**

León, Guanajuato

2019

ENES UNAM
UNIDAD LEÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Gracias a la UNAM por haberme brindado la oportunidad de estudiar dentro de ella, por las experiencias académicas en otros países que me ayudaron no sólo en mi formación profesional sino también a mi desarrollo como persona, además de las becas en las que tuve la oportunidad de ser favorecida.

Quiero expresar mi reconocimiento a la ENES León por haber abierto sus puertas y facilitar la formación de la carrera de Ciencias Agrogenómicas, gracias a todas las personas que fueron partícipes en este proceso.

Agradezco al personal académico por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi preparación profesional, así como su apoyo y motivación para desarrollarme dentro del campo de la investigación.

A mis padres Blanca y Gerardo por confiar y creer en mí, por ser el apoyo y fortaleza a lo largo de mi existencia, que me ha permitido concluir una carrera profesional.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la beca de titulación y las becas DGAPA-PAPIIT-IA205115 y IA205117.

ÍNDICE

Contenido	N° de página
Resumen	05
1. Introducción	06
1.1 Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	06
1.2 Origen, producción e importancia del frijol en México	06
1.3 Biotecnología aplicada al frijol	07
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	07
Hairy roots	07
1.4 Simbiosis de leguminosas-rhizobia	08
La invasión de la rhizobia a través del hilo de infección (HI)	09
1.5 Familia <i>SnRK</i>	10
Subfamilia <i>SnRK1</i>	11
Subfamilia <i>SnRK2</i>	12
Subfamilia <i>SnRK3</i>	13
1.6 Elementos regulatorios de la expresión génica	14
Estructura básica de los promotores	14
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo general	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. Hipótesis	15
3.1 Bases del trabajo propuesto	16
3.2 Justificación	16
4. Antecedentes	17
4.1 Vía simbiótica de las leguminosas	17
4.2 Transformación transitoria de frijol por hairy roots	18
4.3 Análisis del promotor de frijol	19
4.4 Genes expresados específicamente durante la simbiosis frijol-rizobia	19
4.5 Papel de los genes <i>SnRK</i> en la simbiosis	20
5. Metodología	20
5.1 Selección del gen candidato <i>SnRK</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i>	20
5.2 Material vegetal	21
5.3 Aislamiento de ARN	21
5.4 Identificación y Análisis del promotor del gen <i>PvSnRK3</i>	21
5.5 Diseño de oligos específicos para el promotor de del gen <i>SnRK3</i>	22
5.6 Extracción de ADN genómico de frijol	22
5.7 Clonación del promotor del gen <i>PvSnRK3</i>	22
Amplificación del promotor del gen <i>PvSnRK3</i>	22
Ligación del promotor de del gen <i>SnRK3</i> al vector de entrada pENTR	23
Transformación de <i>E. coli</i> con el vector pENTR/promotor <i>PvSnRK3</i>	23
Ligación del promotor <i>PvSnRK3</i> al vector PBGWFS7.0	23
Transformación de <i>A. rhizogenes</i> con el vector PBGWFS7.0/ <i>prSnRK3::GUS</i>	24
5.8 Transformación de Hairy Roots en frijol con <i>A. rhizogenes</i>	24
5.9 Inducción de nódulos por la bacteria <i>Rhizobium</i> en las raíces de frijol común	26
5.10 Ensayo histoquímico <i>GUS</i> en raíces transgénicas 6	26
5.11 Microscopía	26

6. Resultados	27
6.1 Selección del gen candidato <i>SnRK</i>	27
6.2 Identificación y análisis de la secuencia del promotor del gen <i>SnRK3</i>	27
6.3 Identificación de TF en la secuencia del promotor del gen <i>PvSnRK3</i>	28
6.4 Aislamiento y clonación del promotor de del gen <i>SnRK3</i> en fusión con <i>GUS</i> usando el sistema Gateway	29
Amplificación del promotor del gen <i>SnRK3</i>	29
Clonación del promotor <i>prSnRK3</i> en el vector final pBGWFS7.0 y transformación de <i>A. rhizogenes</i> K599	30
6.5 Análisis de la expresión espacio temporal del promotor del gen <i>SnRK3</i> en hairy roots de frijol durante la simbiosis con <i>Rhizobium</i>	31
Respuestas simbióticas tempranas de promotor del gen <i>PvSnRK3</i> en raíces transgénicas hairy roots	31
6.6 Actividad del promotor del gen <i>PvSnRK3</i> en hairy roots	32
6.7 Actividad del promotor del gen <i>PvSnRK3</i> durante las divisiones de células corticales y desarrollo primordial de nódulos	33
6.8 Análisis de la expresión del promotor del gen <i>PvSnRK3</i> en nódulos maduros	34
6.9 Análisis de la expresión del promotor del gen <i>PvSnRK3</i> en nódulos senescentes	37
7. Discusión	38
7.1 Regulación del promotor del gen <i>SnRK3</i> por factores de transcripción relacionados con la simbiosis	39
7.2 Activación del promotor del gen <i>PvSnRK3</i> durante las etapas tempranas de la simbiosis con <i>Rhizobium</i>	39
7.3 Promotor del gen <i>PvSnRK3</i> está altamente activo en nódulos funcionales pero ausente en nódulos senescentes	40
8. Conclusiones	41
9. Productos generados	42
9.1 Artículos publicados	42
9.2 Congreso	42
10. Bibliografía	43
11. Anexos	55
11.1 Figuras Anexo	55
11.2 Tablas Anexo	59

Aislamiento y caracterización del promotor de *PvSnRK3* durante la nodulación de frijol común

Resumen

Las proteínas quinasas *SnRK* (sucrose non-fermenting (*SNF1*)-related protein kinases o quinasas relacionadas con SNF1 no fermentadora de sacarosa) juegan un papel clave en las vías de señalización de las plantas, incluidas las respuestas a estrés biótico y abiótico. Aunque las quinasas *SnRK* se han estudiado en *Arabidopsis* y arroz, no existe información sobre las quinasas *SnRK* en las leguminosas. En el presente estudio, se aisló y clonó el promotor *SnRK3* de *Phaseolus vulgaris* en fusión con el gen reportero de β -glucuronidasa, también conocido como *GUS*, (*prSnRK3::GUS*). Posteriormente, el promotor se expresó en el sistema de raíces peludas o hairy roots de *P. vulgaris* y se estudió la expresión espacio-temporal durante la simbiosis con *Rhizobium tropici*. Después de 3 días posteriores a la inoculación (dpi) con *R. tropici*, la expresión del *prSnRK3::GUS* aumentó en las raíces transgénicas y en los pelos radicales. Secciones transversales muestran que la expresión del *prSnRK3::GUS* estaba presente en las células corticales externas, en las células infectadas y no infectadas de los nódulos. Curiosamente, en los nódulos senescentes la expresión del promotor fue completamente suprimida. Conjuntamente, los resultados muestran que el promotor del gen *PvSnRK3* (gen *SnRK3* perteneciente a *Phaseolus vulgaris*) se expresa débilmente en las etapas iniciales (tales como las células infectadas de los pelos radicales y los primordios de los nódulos), fuertemente en la etapa activa de la fijación del nitrógeno (21 dpi) y ausente durante la senescencia de los nódulos. Esto indica que *PvSnRK3* podría jugar un papel importante durante el desarrollo y el funcionamiento de los nódulos.

Palabras clave: Clonación, hairy roots, *Phaseolus vulgaris*, promotor, *Rhizobium*, simbiosis, *SnRK*.

1. Introducción

1.1 Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)

El género *Phaseolus* consta de 76 especies provenientes del Nuevo Mundo (Freytag et al., 2002) y de ellas, cinco especies, el frijol tépari (*P. acutifolius* A. Gary), el ayocote (*P. coccineous* L.), el frijol lima (*P. lunatus* L.), el frijol botil (*P. polyanthus* Greenman) y frijol común (*P. vulgaris* L.), se cultivan en el mundo (Delgado-Salinas et al., 2006; Smykal et al., 2015). Entre las especies cultivadas, el frijol común es el que domina con una área de cultivo del 90% (Singh, 1999). Actualmente, se estima que el frijol común es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial (Petry et al., 2015), y es una fuente importante de nutrientes para más de 300 millones de personas en partes de África Oriental y América Latina, representando el 65% del total de la proteína que se consume y 32% de la energía (Broughton et al., 2003; Blair et al., 2010). Algunas vitaminas solubles en agua, como la tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, ácido fólico y minerales como el potasio, el calcio, el magnesio, el zinc, el cobre y el hierro se encontraron en el frijol común (Beebe et al., 2000).

1.2 Origen, producción e importancia del frijol en México

Phaseolus vulgaris se originó en América Central y del Sur, donde se ha cultivado desde el año 6000 a.C en Perú y 5000 a.C. en México. Actualmente su cultivo se ha generalizado y se cultiva como un importante cultivo alimenticio en muchas áreas tropicales, subtropicales y templadas de América, Europa, África y Asia. De acuerdo la base de datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en 2016, la producción mundial de frijol como grano seco fue de 26.8 millones de toneladas, mientras que la producción como hortaliza y ejote fue de 23.5 millones de toneladas por hectárea y 1,515 kg por hectárea, respectivamente (FAOSTAT, 2018). En México, el consumo anual per cápita es de 10.2 Kg. Además de su gran valor dentro de la alimentación de los mexicanos, el cultivo del frijol representa una actividad económica importante, siendo México el 7° productor mundial de frijol, con 1,183,868 toneladas anuales. Zacatecas, Sinaloa y Durango lideran la lista de los estados de la república con el mayor volumen de producción, lo cual tiene un impacto económico de más de 16 mil millones de pesos al año (SIAP, 2018).

Debido a todo lo anterior, se han creado centros de investigación como el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno (CIFN) de la Universidad Nacional Autónoma de México, actualmente Centro de Ciencias Genómicas y grupos de científicos enfocados a la investigación del frijol, lo cual ha impulsado el desarrollo de herramientas biotecnológicas destinadas al estudio y mejoramiento del frijol.

1.3 Biotecnología aplicada al frijol

La generación de plantas genéticamente modificadas ayuda al estudio de los organismos a nivel molecular, así como las interacciones con los organismos a su alrededor, ya sean beneficiosos o patógenos. Sin embargo, en el caso del frijol común, no se cuentan con muchas opciones para el estudio funcional de genes y promotores, debido a la dificultad para lograr una transformación estable y eficiente, ya que el frijol es un cultivo recalcitrante a la transformación y cultivo *in vitro* (Hnatuszko-Konka et al., 2014).

Una opción es el uso de sistemas de bombardeo de partículas, aunque no es posible generar un porcentaje alto de transformación, además de requerir una gran cantidad de trabajo (Christou, 1997; Aragao et al., 2002). También se han llevado a cabo intentos de generar plantas transgénicas de frijol común usando *Agrobacterium tumefaciens* sin mucho éxito, ya que la transformación no es estable, obteniendo tejidos quiméricos y callos que no son regenerables (Mariotti et al., 1989; Franklin et al., 1993).

Actualmente, la técnica de transformación de frijol más difundida es la transformación mediante *Agrobacterium rhizogenes*, donde se producen raíces transgénicas llamadas raíces peludas o hairy roots en inglés. Estas plantas son semi-transgénicas o compuestas, es decir, solamente las nuevas raíces generadas por la infección con *A. rhizogenes* son transgénicas, las demás partes de la planta no son alteradas (Estrada-Navarrete et al., 2006).

Agrobacterium rhizogenes

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria del suelo responsable del desarrollo de la enfermedad de la raíz peluda o en inglés, hairy roots (Tepfer, 1990). Esta enfermedad, ocasiona que la planta produzca nuevas raíces con características específicas como alta tasa de crecimiento, respuesta a hormonas y producción de metabolitos secundarios (Srivastava & Srivastava, 2007). La infección por *A. rhizogenes*, resulta en la transferencia del plásmido *Ri* y la integración y expresión de T-ADN (ADN de transferencia o Transfer DNA en inglés) dentro de las células vegetales (Grant et al., 1991). La expresión de este T-ADN integrado en las células vegetales induce raíces transformadas y sintetiza ciertos compuestos de carbono de bajo peso molecular llamados opinas (Petit et al., 1983). Sin embargo, mediante ingeniería genética, es posible reemplazar este T-ADN con ADN externo, como un gen de interés, para transferirlo dentro de la planta, Siendo ésta la característica más importante dentro de la biología molecular, además de otorgar estabilidad genética de las raíces transformadas.

Hairy Roots

Ésta técnica de transformación es útil para la investigación de la biología de la raíz, genómica funcional, interacción con microorganismos, etc. Pero una gran desventaja de esta técnica es el hecho de que la progenie no hereda las raíces transgénicas, lo cual impide el uso de estas plantas en programas de mejoramiento genético. Sin embargo, no se puede negar la utilidad de ésta en el área de la investigación (Hnatuszko-Konka et al., 2014). Se ha logrado la generación exitosa de hairy roots en varias leguminosas, entre las que se encuentran: *Lotus corniculatus* (Petit et al., 1987), *Trifolium repens* (Lugtenberg, 1989), *T. pratense* (Díaz et al., 2000), *Vigna aconitifolia* (Lee, et al., 1993), *Glycine max* (Cheon et al., 1993), *Vicia hirsuta* (Quandt et al., 1993), *Lotus japonicus* (Stiller et al., 1997), *Medicago truncatula* (Boisson-Dernier et al., 2001), and *Sesbania rostrata* (de Velde et al., 2003).

Para *P. vulgaris*, existe un protocolo para la generación de hairy roots de manera rápida y estable y que además, es útil para estudiar la interacción entre frijol y *Rhizobium* (Estrada-Navarrete et al., 2006 y 2007).

1.4 Simbiosis de leguminosas-rizobios

Una simbiosis de gran importancia agronómica, es la establecida entre bacterias del suelo denominadas rizobia y las raíces de las leguminosas, ya que estas bacterias proveen a las plantas de una fuente asimilable de nitrógeno. El establecimiento de la simbiosis requiere de un intercambio de señales químicas entre ambos organismos (Oldroyd & Downie, 2008). Por una parte, la planta libera constantemente a la rizósfera diversos compuestos, los cuales incluyen, carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, amino ácidos y derivados fenólicos. Estos últimos son los que disparan el primer paso para la interacción simbiótica entre la bacteria y las raíces de las leguminosas (Perret et al., 2000). Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides y los isoflavonoides junto con las betaínas, los glucósidos y los ácidos aldónicos funcionan como quimioatrayentes de las bacterias, las cuales son atraídas hacia el ápice de los pelos radicales. Los flavonoides interactúan específicamente con un regulador transcripcional bacteriano, la proteína *Nod D*, induciendo así la transcripción de los genes llamados nod. Los genes nod codifican proteínas bacterianas que participan en la síntesis y secreción de metabolitos conocidos como factores de nodulación (FN) que en respuesta a los flavonoides, constituyen la segunda señal en el intercambio de señales químicas (Geurts & Bisseling, 2002).

Las raíces de las leguminosas presentan respuestas fisiológicas y celulares específicas en presencia de los FN, donde la gran mayoría de estas respuestas se han detectado en los pelos radicales (Murray, 2011). Por ejemplo, segundos después del tratamiento con FN, se ha observado un incremento en la concentración de Ca^{2+} y EORs en la zona apical de pelos radicales de *P. vulgaris* (Cárdenas et al., 2008). El aumento en el influjo de calcio es seguido por un aumento en la salida de cloro y potasio en pelos radicales de *Medicago sativa* (Felle et al., 1998); este movimiento de iones, provoca la despolarización

del potencial de membrana (Ehrhardt et al., 1992). Este flujo de iones, así como la despolarización del potencial de membrana, lleva a una alcalinización del citoplasma en pelos radicales de *M. sativa* (Felle et al., 1996). Alrededor de 15 minutos después de la percepción de los FN, se han observado oscilaciones en la concentración de calcio en la región nuclear de pelos radicales de *P. vulgaris* y *M. truncatula* (Cárdenas et al., 1999; Ehrhardt et al., 1996). Las oscilaciones de Ca^{2+} , coinciden espacio-temporalmente con la fragmentación y polimerización de los microfilamentos de actina de pelos radicales de *P. vulgaris* y *M. sativa* (Cárdenas et al., 1999; de Ruijter et al., 1999). Dentro de los cambios morfológicos que presentan los pelos radicales, está la detención de su crecimiento de una a tres horas después del tratamiento con FN, lo cual lleva a la hinchazón de la región apical de éstos. Esta respuesta, esta seguida por el redireccionamiento del crecimiento apical del pelo radical y su bifurcación, a las 6 y 12 horas, respectivamente (Cárdenas et al., 2000). La percepción de los FN también induce en las raíces de las leguminosas, un incremento en la abundancia de transcrito de ciertos genes conocidos como nodulinas tempranas y la reactivación de la división mitótica en las células corticales. Se ha postulado que estas respuestas que se observan en los pelos radicales y en las raíces de las leguminosas ante la presencia de los FN, son un prerrequisito para la infección por las rhizobia (Murray, 2011).

La invasión de la rhizobia a través del hilo de infección (HI)

El reconocimiento de las señales químicas específicas permite que la rhizobia se adhieran a la región apical del pelo radical y se generen diversos cambios a nivel molecular y celular en su hospedero (Gage, 2004). El primero de ellos es la deformación del pelo radical de la leguminosa, que consiste principalmente en un enroscamiento (Figura 1). El enroscamiento, permite la formación del hilo de infección (HI), que consiste en una estructura tubular por la cual ingresan las bacterias. Este proceso comienza con el ablandamiento de la pared celular en la región del enroscamiento, el cual es seguido por una invaginación de la membrana y la formación de pared celular nueva. Posteriormente, el HI migra hacia el interior del pelo radical, esta migración va dirigida por el núcleo del pelo y durante este trayecto las bacterias se encuentran en proceso de división (Murray, 2011). La caracterización molecular de este proceso ha permitido establecer que la progresión del HI en el pelo radical requiere de componentes del citoesqueleto como los microtúbulos y los microfilamentos de actina, así como también, una *vapirina*, una *remorina*, *flotillinas*, receptores tipo cinasa, enzimas involucradas en procesos de ubiquitinación y factores de transcripción (Popp & Ott, 2011).

De forma simultánea a la progresión del HI, las células del córtex reactivan procesos de división celular para formar el primordio del nódulo. En el caso de leguminosas que desarrollan nódulos indeterminados (meristemo persistente y con forma ovalada) la división es en el córtex interno, mientras que en las leguminosas con nódulos determinados (meristemo no persistente y forma redonda) ocurre en el córtex externo (Oldroyd & Downie, 2008). En estas etapas iniciales del proceso de nodulación, se incrementa la

abundancia de los transcritos de nodulinas tempranas como *Enod2* y *Enod40*. Una vez que el HI llega a las células del córtex, éste se ramifica y libera a las bacterias, las cuales ingresan al citoplasma de dichas células, envueltas por una membrana denominada peribacteroidal. En estos nuevos organelos conocidos como simbiosomas, las bacterias sufren un cambio a bacteroides y es en éstos donde se expresa el complejo de la nitrogenasa y nitrogenasa reductasa, para realizar la fijación biológica del nitrógeno (Popp & Ott, 2011).

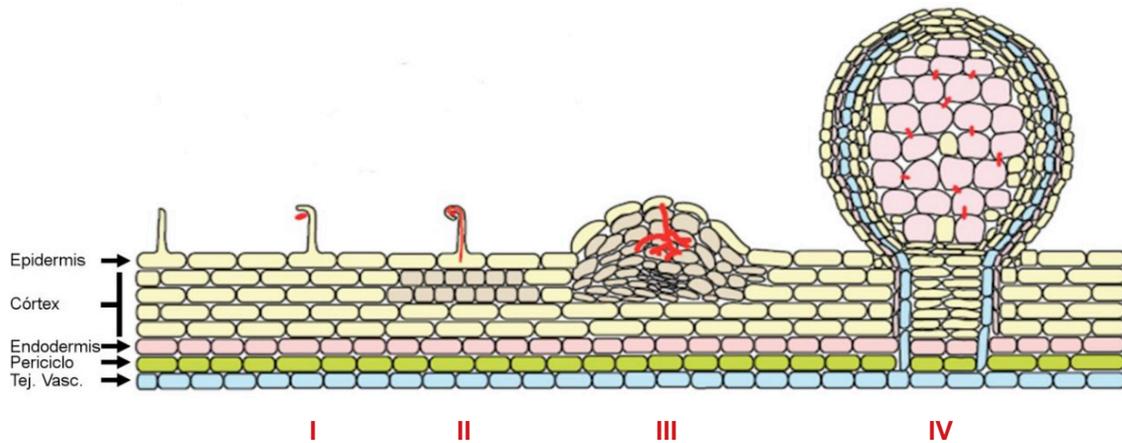


Figura 1. Esquema general del proceso de nodulación. El reconocimiento de las señales químicas específicas liberadas por las raíces de las leguminosas permite la adherencia de la rhizobia a los pelos radicales (I). Esto promueve el enroscamiento del pelo radical para la formación del HI, estructura por la cual la rhizobia ingresa a la raíz de la leguminosa (II). Simultáneamente las células corticales reactivan procesos de división celular para dar lugar a un primordio del nódulo, donde el HI se ramifica (III). El primordio del nódulo se desarrolla para formar un nódulo maduro donde la rhizobia es liberada del HI y endocitada en las células corticales, donde sufren un cambio a bacteroides. Estos últimos son los que realizan la fijación biológica del nitrógeno (IV) (Imágen tomada de Popp & Ott, 2011).

1.5 Familia *SnRK*

La proteína quinasa *SnRK* (quinasa relacionada con *SNF1* no fermentadora de sacarosa o sucrose non-fermenting (*SNF1*)-related protein kinase en inglés) es homóloga a las proteínas quinasas *SNF1* (no fermentadoras de sacarosa 1 o sucrose non-fermenting 1 en inglés) y a las proteínas quinasas *AMPK* (quinasas dependientes de *AMP* cíclico o *AMP*-activated protein kinases en inglés), la cual está ampliamente distribuida en plantas y participa en una amplia variedad de vías metabólicas y de señalización. Las quinasas *SNF1* en levadura, *AMPK* en mamíferos y *SnRK1* en plantas son homólogas, pertenecientes a la superfamilia de proteínas quinasas *SNF1*. La proteína quinasa *SnRK* funciona en la planta como el interruptor clave en la señalización del azúcar y puede activarse por condiciones muy diversas de estrés abiótico y biótico que directa o indirectamente causan un déficit de energía al afectar la fotosíntesis, la respiración o la distribución de carbono (Hedbacker & Carlson, 2008).

La familia de proteínas quinazas *SnRK* ha sido agrupada en tres subfamilias: *SnRK1*, *SnRK2* y *SnRK3* (Halford, 2005). En los eucariontes, esta proteína quinasa está altamente conservada. La estructura bien conservada de los complejos de *SNF1/AMPK/SnRK1* muestra una subunidad catalítica (denominada *SNF1*, *AMPK-α* o *SnRK1*) que está asociada con una subunidad activadora γ (*SNF4*, *AMPK γ* , *SnRK γ*) y una subunidad reguladora β (*SIP1/SIP2/GAL83*, *AMPK β* , *SnRK β*) (Mitchell et al., 1994; Jiang & Carlson, 1997). El gen *SnRK1* fue inicialmente descubierto en centeno (*Secale cereal* L.) (Alderson et al., 1991). En la actualidad, algunos miembros de la subfamilia *SnRK1* se han encontrado en una variedad de plantas modelo y algunos cultivos importantes, como *A. thaliana*, centeno, cebada (*Hordeum vulgare*), papas (*Solanum tuberosum*), tabaco, remolacha, etc. Sin embargo, los genes *SnRK2* y *SnRK3* no pueden sustituirse por el gen *SnRK1* (Halford & Hey, 2009), ya que no logran revertir el fenotipo del mutante de levadura *snf1Δ* (Hrabak et al., 2003).

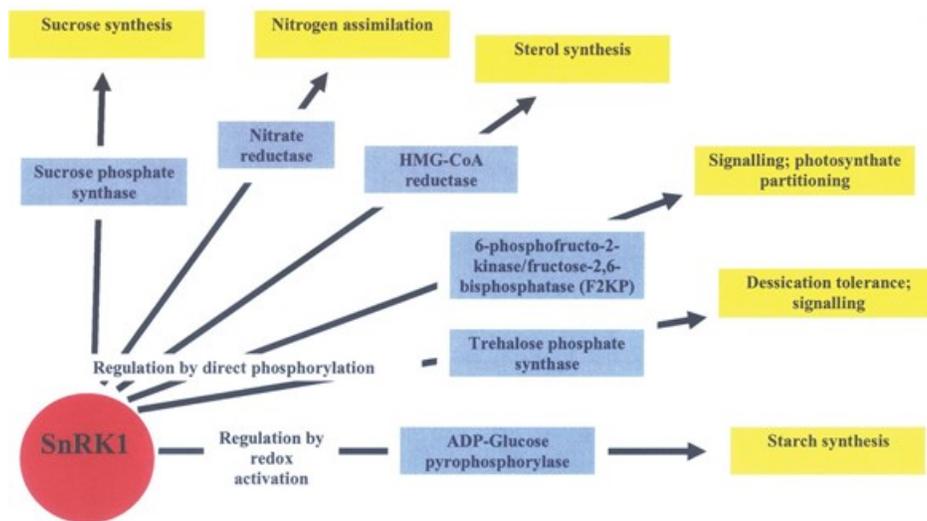


Figura 2. Enzimas que están reguladas por la quinasa *SnRK1* a través de la fosforilación directa o la activación redox y los procesos en los que participan. Figura tomada de Halford & Hey, (2009).

Subfamilia *SnRK1*

La proteína quinasa *SnRK1* es la homóloga en plantas de *SnF1* en levadura y de *AMPK* en animales (Halford & Hey, 2009; Smeekens et al., 2010). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el complejo *SNF1* es un componente central durante la respuesta al déficit de glucosa, mediando el cambio del metabolismo fermentativo al oxidativo a través de la regulación de la desrepresión de genes reprimidos relacionados a la glucosa (Carlson, 1999; Young et al., 2003). En plantas, la quinasa *SnRK1* participa en la regulación del metabolismo del carbono, el censo de energía, la respuesta al estrés y la activación de mecanismos para mantener la homeostasis y permitir la supervivencia de la planta (Tomé et al., 2014). La

quinasa *SnRK1* activa vías metabólicas catabólicas para la producción de energía, inhibiendo las rutas anabólicas que consumen energía (Emanuelle et al., 2016).

El primer miembro de esta subfamilia estudiado en plantas fue reportado por (Alderson et al., 1991), quienes a partir de una librería de cDNA de centeno, aislaron una secuencia de ADNc (ADN complementario), nombrada *RKINI*, la cual lograba revertir la deficiencia de *SNF1* en la mutante de levadura *snf1Δ*.

La quinasa *SnRK1* participa en diferentes procesos metabólicos; por ejemplo, fosforila enzimas como la *HMG-CoA* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa o 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductase en inglés) y la sacarosa fosfato sintasa, lo que lleva a su inactivación. También fosforila la nitrato reductasa, la trehalosa-fosfato sintasa y la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-1,6-bisfosfatasa (Coello et al., 2011), pero éstas enzimas también requieren la unión de una proteína 14-3-3 para su inactivación (Halford & Hey, 2009). Otra enzima metabólica clave en las plantas, la adenosin difosfato (ADP)-glucosa pirofosforilasa, está regulada por la quinasa *SnRK1* a través de la modulación de su estado redox (Tiessen et al., 2003). Además, la quinasa *SnRK1* causa cambios en la expresión génica en respuesta a la falta de nutrientes (Baena-González et al., 2007) y, paradójicamente, sacarosa (Purcell et al., 1998; McKibbin et al., 2006).

La subfamilia *SnRK1* es la más estudiada, por lo que se ha reportado en distintas plantas, entre las cuales se encuentran *Arabidopsis* con 2 miembros (Halford & Hey, 2009) y *Brachypodium distachyon* 3 (Wang et al., 2015).

Subfamilia *SnRK2*

La subfamilia *SnRK2* está estrechamente relacionada con las respuestas a estrés de las plantas. Algunos miembros de la subfamilia *SnRK2* se activan por medio del ácido abscísico (ABA) y participan en la respuesta al estrés salino y la sequía (Boudsocq et al., 2004; Boudsocq et al., 2007). Los miembros de la subfamilia *SnRK2* tienen dominios estructurales relativamente variables en el extremo C-terminal y comparten 2 regiones conservadas de aminoácidos en el bucle de activación y el dominio de unión a ATP. El dominio conservado del bucle de activación es el sitio blanco de la fosforilación de la proteína cinasa; y los residuos de Ser y Thr son críticos para la actividad de la quinasa *SnRK2* (Belin et al., 2006). Algunas de las funciones principales de esta subfamilia, por ejemplo, son la sobreexpresión del gen *SnRK2.8* en *Arabidopsis*, mejorando significativamente la tolerancia a la sequía (Shin et al., 2007; Umezawa et al., 2004). Las mutantes dobles de *Arabidopsis* con copias alteradas de los genes *SnRK2.2* y *SnRK2.3* mostraron una alta sensibilidad a ABA, así como una germinación de la semillas y desarrollo radicular severamente reprimidos (Fujii & Zhu, 2009). Tres proteínas quinasas *SnRK2* de *Arabidopsis*, *SRK2D/SnRK2.2*, *SRK2E/SnRK2.6/OST1* y *SRK2I/SnRK2.3*, involucradas en la señalización ABA son

esenciales para el control del desarrollo de semillas y la latencia (Fujita et al., 2009). Plantas de *Jatropha* con el gen *SnRK2* sobreexpresado mostraron una mayor tolerancia a la sal y la sequía (Chun et al., 2014). Recientemente se reportó que el gen *SnRK2.4* proveniente del trigo y el gen *SAPK8* proveniente del maíz aumentan la tolerancia a estreses múltiples y sal, respectivamente, en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Mao et al., 2009; Ying et al., 2011).

Estas proteínas se han encontrado en distintas plantas, en *Arabidopsis* 10 miembros (Halford & Hey, 2009), en *O. sativa* 10 miembros (Kobayashi et al., 2004), en Sorgo 10 miembros (Li et al., 2010), en *B. distachyon* 10 (Wang et al., 2015).

Subfamilia *SnRK3*

La subfamilia *SnRK3* es un grupo de proteínas quinasas denominadas quinasas que interactúan con proteínas similares a la calcineurina B o calcineurin B-like calcium sensor-interacting protein kinases en inglés (*CIPKs*) (Luan, 2009). Aunque en la literatura, se pueden encontrar diversos nombres para las quinasas *SnRK3*; quinasas similares a *SOS2* (Demasiado Sensible a la Sal 2) o *SOS2*-like kinases (Salt Overly Sensitive 2) en inglés, quinasas relacionadas a *SOS2* o protein kinases related to *SOS2* (PKS) en inglés y quinasas que interactúan con *CIPKs-CBL* o *CIPKs-CBL*-interacting protein kinases en inglés. Estas proteínas, como su nombre lo indica, interactúan con las proteínas similares a la calcineurina B o Calcium Sensor Calcineurin B-like proteins (*CBLs*) en inglés para regular la ruta de señalización del calcio (Guo et al., 2002). Tres sitios candidatos de fosforilación, tales como Ser-156, Thr-168 y Tyr-175 en el bucle de activación, se conservan entre la familia *SnRK3* (Chaves-Sanjuan et al., 2014). El reemplazo de estos residuos en la quinasa *SOS2* con un residuo de Asp aumenta significativamente la actividad de la enzima *in vitro*. Bajo estrés salino, la proteína de unión a calcio *SOS3* detecta el aumento en la concentración de calcio citosólico y en ese momento el complejo de proteína quinasa *SOS3-SOS2* activa el transportador de iones *SOS1*, que bombea el exceso de sodio citosólico fuera de las células de la planta (Ji et al., 2013).

Las quinasas *SnRK2* tienen un papel importante en respuesta al estrés salino, sequía, frío, azúcar, cambios en el pH y señales de transducción de ABA (Hrabak et al., 2003; Luan, 2009; Coello et al., 2011). Sin embargo, de todas las rutas en las que participa, la más estudiada es la ruta de señalización de *SOS*, en *A. thaliana*. (Liu et al., 2000). Las proteínas *CIPK* y *CBL* fueron identificadas por primera vez en *A. thaliana* (Kudla et al., 1999) y posteriormente, a través de análisis bioinformáticos se identificaron todas las proteínas pertenecientes a esta subfamilia en *A. thaliana* y *O. sativa* (Kolukisaoglu et al., 2004), lo cual representó un gran avance para el estudio de la subfamilia *SnRK3*.

Se han reportado en distintas plantas, por ejemplo, *Arabidopsis* con 25 (Halford & Hey, 2009), en *O. sativa* 30 (Kolukisaoglu et al., 2004), en *B. distachyon* 31 (Wang et al., 2015).

1.6 Elementos regulatorios de la expresión génica

La regulación de la expresión génica en diferentes tejidos y órganos, durante varias etapas de crecimiento y desarrollo, o como consecuencia de estímulos externos, está mediada a nivel transcripcional, postranscripcional y post-traducciona. La regulación transcripcional desempeña el papel más importante en la activación y supresión de la expresión, y está controlada principalmente por los promotores y sus elementos reguladores en *cis* de los genes (Zou et al., 2011). En términos más simples, los promotores de genes son secuencias de ADN ubicadas río arriba de las regiones codificantes de los genes y contienen múltiples elementos que actúan en *cis*, que son sitios de unión específicos para proteínas involucradas en el inicio y la regulación de la transcripción (Narlikar & Ovcharenko, 2009).

Los promotores utilizados con aplicaciones biotecnológicas se pueden agrupar en las siguientes clases:

- a) *Promotores constitutivos*: activos en la mayoría de los tejidos y etapas de desarrollo.
- b) *Promotores espacio-temporales*: ofrecen expresión específica de un tejido o etapa específica.
- c) *Promotores inducibles*: son regulados por una señal externa química o física.
- d) *Promotores sintéticos*: contienen elementos regulatorios definidos ubicados adyacentes o dentro de las secuencias promotoras. Los promotores sintéticos pueden producir combinaciones de expresión constitutivos, espacio-temporales, inducibles e incluso combinaciones únicas de patrones de expresión en transgénicos, según los elementos incluidos (Hernandez-Garcia & Finer, 2014).

Estructura Básica de los promotores

El análisis de la estructura del promotor es un tema importante, ya que el entendimiento de la estructura del promotor permite hacer predicciones acerca de su posición y perfiles de expresión, lo cual ayuda en el estudio de redes de regulación de la transcripción.

El tamaño de los promotores es variable, sin embargo, se dividen en dos clasificaciones dependiendo de los pares de bases que se tomen en cuenta a partir del sitio de inicio de la transcripción:

- *Promotor mínimo*: Esta es la región mínima requerida para iniciar la transcripción, Se encuentra aproximadamente -34 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen. Para que funcione correctamente, deben de estar presentes los siguientes elementos dentro de la región

del promotor; sitio de inicio de la transcripción, el sitio de unión para la ARN polimerasa y factores de transcripción general.

- *Promotor proximal*: Es la región promotora que contiene los elementos regulatorios primarios. Generalmente abarca -250 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen. Contiene la mayor parte de los sitios de unión a factores de transcripción (Porto et al., 2014).

En el caso de los organismos eucariontes, los promotores son muy diversos y suelen ser difíciles de caracterizar, pero la mayoría suele contener secuencias cortas conservadas:

- *Caja TATA*: Usualmente es una secuencia TATAAA que se encuentra entre -35 a -25 pares de bases arriba del codón de inicio de la transcripción. Este es el sitio de unión de la una proteína que ayuda a la formación del complejo transcripcional de la ARN polimerasa II.
- *Caja CAAT*: Es una secuencia corta, generalmente CAAT o CCAAT. Se localiza entre las -70 y -80 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.
- *Caja CG*: Es una o varias secuencias cortas, generalmente GGGCGG, las cuales se pueden presentar en una o múltiples copias dentro del promotor. Se encuentran aproximadamente -110 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Bucher, 1990).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Analizar la expresión del promotor del gen *PvSnRK3* durante la simbiosis del frijol común y *Rhizobium*.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificación y anotación del promotor del gen *PvSnRK3* usando herramientas bioinformáticas.
2. Aislamiento y clonación del promotor del gen *PvSnRK3::GUS*.
3. Análisis de la expresión espacio-temporal del promotor del gen *PvSnRK3* en hairy roots durante las diferentes etapas de simbiosis con *Rhizobium*.

3. Hipótesis

Se ha establecido que las quinasas *SnRK* regulan negativamente la vía de señalización de *TOR* (diana de rapamicina o target of rapamycin en inglés). Un estudio reciente demuestra que *TOR* regula la progresión de los hilos de infección y el desarrollo de nódulos en el frijol. Además, la quinasa *SnRK1* tiene un papel central en la señalización de azúcar y fosforila directamente en las enzimas, como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa fosfato sintasa, nitrato reductasa y trehalosa-fosfato sintasa. En los nódulos de leguminosas, se espera que la demanda de energía (sacarosa) sea mayor para soportar las bacterias fijadoras de nitrógeno. Como resultado, varios genes de señalización de azúcar (*PvTRE1* y *PvTPS9*) se activan en nódulos funcionales.

Basados en los hechos anteriores, se hipotetiza que la quinasa *SnRK* funciona como regulador río arriba de señalización de *TOR* y activa directamente los genes del metabolismo de los hidratos de carbono (sacarosa y trehalosa). Por lo tanto, los genes *SnRK* pueden desempeñar un papel clave en el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio.

3.1 Bases del trabajo propuesto

En un estudio reciente, se utilizó la secuenciación de nueva generación, ion torrent, para llevar a cabo análisis transcriptómicos comparativos de raíces de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) colonizadas por MA (Micorriza Arbuscular) o rizobios (Gómez et al., 2015; Nanjareddy et al., 2017a). Se analizaron los perfiles globales de expresión génica para identificar genes únicos y compartidos expresados diferencialmente (DEGs) que regulan estas dos interacciones simbióticas, y comparamos cuantitativamente los perfiles de los DEG. Se identificaron 3,219 (1,959 sobre-expresados y 1,260 regulados negativamente) y 2,645 (1,247 sobre-expresados y 1,398 regulados negativamente) genes únicos que se expresaron diferencialmente en respuesta a la colonización micorrízica o rizobial, respectivamente, en comparación con las raíces no inoculadas. Basados en los perfiles de expresión, algunos miembros de la subfamilia *SnRK3* se expresan diferencialmente durante la nodulación. Para el presente estudio, se ha seleccionado un miembro de la subfamilia *PvSnRK3* que aumenta la regulación durante la nodulación (Gómez et al., 2015; Nanjareddy et al., 2017a).

3.2 Justificación

Los genes pertenecientes a la familia *SnRK* desempeñan un papel central en la señalización de azúcar, *TOR* y ABA. Además, las proteínas *SnRKs* fosforilan diversas enzimas, como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa y trehalosa fosfato sintasa en *Arabidopsis*. En las leguminosas, el desarrollo de nódulos requiere alta energía (sacarosa), por lo que varios genes de señalización de azúcar (*PvTRE1* y *PvTPS9*)

se activan en los nódulos funcionales. Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios directos en leguminosas que revelen la función de los genes *SnRK* en la simbiosis de nódulos.

Estudios anteriores muestran que, en *M. truncatula*, una *HMG-CoA* reductasa interactúa con el RLK *MI2* y es esencial para la señalización y nodulación de FN temprana. Además, la señalización ABA afecta la señalización de los FN, el desarrollo de nódulos y la fijación de nitrógeno. Por lo tanto, las quinasas *SnRK* pueden impactar la señalización de los FN (Kevei et al., 2007).

Basados en los argumentos anteriores, se propone el presente proyecto “Aislamiento y caracterización del promotor de *PvSnRK3* durante la nodulación de frijol común”.

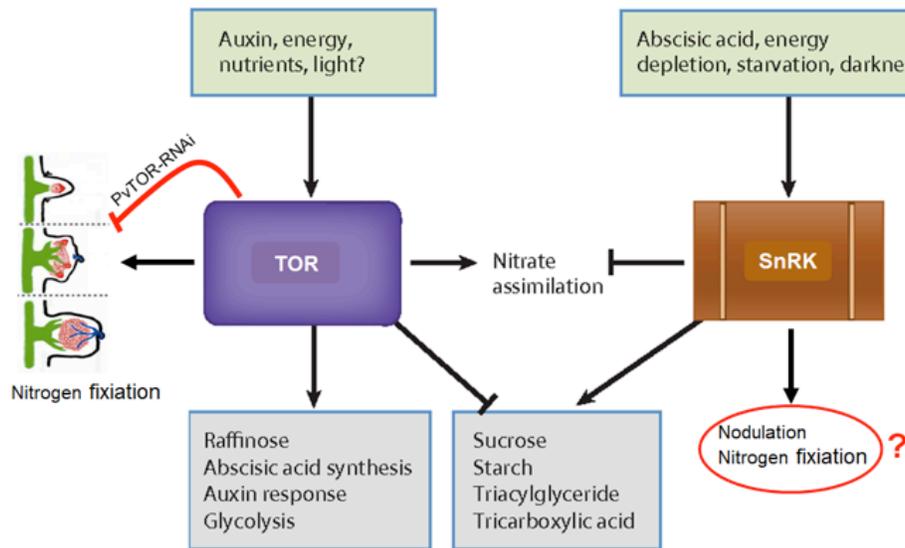


Figura 3. Resumen de los metabolitos y procesos biológicos regulados por las quinasas *TOR* y *SnRK* en respuesta a diferentes estímulos y señales. Las quinasas *TOR* y *SnRK*, ambas cruciales y conservadas, forman parte del metabolismo celular y el crecimiento. De hecho, ambas quinasas representan fuerzas contrarias y vitales que están interconectadas y en aumento y disminución recíprocos y constantes (Dobrenel et al., 2016). Cuando el gen *TOR* es silenciado en *Phaseolus*, afecta la formación de hilos de infección y el desarrollo de nódulos (Nanjareddy et al., 2016).

4. Antecedentes

4.1 Vía simbiótica de las leguminosas

La característica de las plantas leguminosas es su capacidad para establecer una simbiosis mutualista con bacterias rizobias. La interacción simbiótica es un proceso complejo de desarrollo gobernado por los genes de las bacterias y las plantas. Primero, en respuesta a los exudados de la raíz, (iso) flavonoides, los rizobios sintetizan y secretan los FN. Los receptores de entrada en las células ciliadas de la raíz

perciben los factores de nod e inducen el rizado del cabello (Mortier et al., 2012). En segundo lugar, la señal se transduce a través de la vía de simbiosis común o common symbiotic pathway en inglés (CSP), que se comparte con la simbiosis de hongos micorrízicos arbusculares o arbuscular mycorrhizal fungi en inglés (AMF). Entre los genes de simbiosis comunes, *SYMRK*, *CASTOR*, *POLLUX*, *NUP85* y *NUP133* son necesarios para la inducción de aumento de calcio, una respuesta fisiológica distintiva en la CSP. Los genes de las quinasas de proteínas dependientes de calcio y calmodulinas o Calcium- and calmodulin-dependent protein kinases en inglés (*CcaMK*), que tienen el papel de un decodificador de la señalización de calcio, y los genes *CYCLOPS* funcionan más abajo del aumento de calcio (Oldroyd & Downie, 2008). Por lo tanto, los genes CSP actúan en una vía de señalización temprana que reconoce los simbiontes y desencadena la inducción de varios factores de transcripción, incluidos los FT de la vía de señalización de nodulación o nodulation signal pathway en inglés (*NSP1* y *NSP2*) (Smit et al., 2005). *NSP1* se asocia con los promotores de los genes tempranos de la nodulina, como *ENOD*, *NIN* y *ERN1* (Hirsch et al., 2009). Lo anterior inicia la infección y la formación de nódulos primordios y nódulos (Oldroyd & Downie, 2008).

4.2 Transformación transitoria de frijol por hairy roots

Agrobacterium rhizogenes es la responsable de enfermar una amplia variedad de plantas, desarrollando múltiples raíces peludas o hairy roots en inglés. Biotecnológicamente, dichas raíces inducidas por *A. rhizogenes*, son atractivas, dada su capacidad para crecer rápidamente *in vitro* sin la adición de ninguna fitohormona (Willmitzer et al., 1982). Por lo anterior, es que se han adoptado como una herramienta biotecnológica, empleada ampliamente, para la producción de metabolitos secundarios o proteínas recombinantes, principalmente (Veena & Taylor, 2007). Dichas hairy roots han sido empleadas, además, en estudios de interacción planta-simbionte o planta-patógeno (Christey, 2001). Su capacidad para producir las proteínas foráneas deseadas, está determinada por la inserción del ADN deseado (que codifica la proteína de interés) en la posición del ADN de transferencia dentro del plásmido *Ri*.

Aunque a la fecha, esta tecnología se ha empleado experimentalmente en una gran variedad de especies y para distintos fines de investigación, por muchos años; no siempre se contó con las bases técnicas ahora disponibles (Veena & Taylor, 2007). Se tuvo que pasar por distintas dificultades para el desarrollo de las mismas. Un ejemplo de ello es la ya mencionada recalcitrancia de especies del género *Phaseolus*, lo cual impulsó el empleo de hairy roots en el estudio de estas. Sin embargo, derivado del protocolo desarrollado por Estrada-Navarrete et al. (2007), para generar plantas compuestas del género *Phaseolus*, es que se abrió paso a una alternativa de transformación/investigación para estas especies de gran interés. Y con ello, han surgido diversos trabajos que citan y emplean, dicho protocolo. Estos trabajos, van desde el estudio de controles epigenéticos en el desarrollo de nodulación (Barraza et al., 2018), hasta la develación de mecanismos de silenciamiento por microRNAs y su represión ante condiciones de

estrés por déficit de agua en especies de este género (De la Rosa et al., 2019). Así como, algunos otros trabajos en distintas especies (Plasencia et al., 2016).

Otro factor importante para el aumento en el uso de esta biotecnología fue, el desarrollo de herramientas moleculares complementarias. Haciendo del sistema de generación de plantas compuestas mediante hairy roots, una opción más para el estudio de genes específicos.

4.3 Análisis del promotor de frijol

Los promotores son herramientas biológicas moleculares importantes que desempeñan un papel crucial en la comprensión de la regulación de la expresión de genes de interés. Dependiendo de los patrones de expresión, los promotores de plantas se clasifican como constitutivos, específicos de tejido o específicos de etapa de desarrollo e inducibles. Los avances en tecnologías transcriptómicas, las mejoras en el modelado por computadora y la disponibilidad de un número creciente de secuencias genómicas para diferentes especies de plantas han facilitado la predicción a gran escala de secuencias promotoras (Dhanapal & Govindaraj, 2015).

A diferencia de las otras plantas, la caracterización funcional de los genes de leguminosas de frijol se ve obstaculizada principalmente por la naturaleza recalcitrante de *Phaseolus* sp. para la transformación genética estable. Los sistemas de transformación transitoria sirven como una alternativa para los estudios rápidos de caracterización génica funcional. En la investigación de la simbiosis de leguminosas, la interacción entre el huésped y el rizobio es uno de los sistemas modelo más adecuados para los estudios de promotores. Hasta ahora, se han caracterizado varios promotores de leguminosas relacionados con las simbiosis (Nanjareddy et al., 2017b), *M. truncatula* PT4, *SWEET11*, *L. japonicus* Cyclops, *UBQ*, *VAG1*, *Glycine max* PT5, *Exo70J*, *P. vulgaris* *RbohB*, *TRE1*, *PI3K*, *TOR*, etc. Los elementos en *cis* influyen directamente en la regulación de los genes. El factor de transcripción *ENBP1A* se une a una región reguladora en *cis* (-692 pb) de la nodulina temprana *VfENOD12*, y esto facilita la expresión de un gen informador en los primordios de nódulos de *Vicia faba* (Frühling et al., 2000). El reemplazo de las regiones reguladoras en *cis* (-161 a -48 pb) del promotor específico de nódulos de la leghemoglobina *GLB3* con los promotores truncados heterólogos δ -p35S y δ -pNOS, dio lugar a una pérdida de especificidad de nódulos (Szabados et al., 1990).

En este estudio, se clonó el promotor del gen *SnRK3* fusionado con el gen reportero (*GUS*) y se expresó en hairy roots de frijol utilizando el protocolo publicado en (Nanjareddy et al., 2017b).

4.4 Genes expresados específicamente durante la simbiosis frijol-rizobia

En un estudio reciente, se realizaron análisis de transcriptomas comparativos de raíces de *P. vulgaris* colonizadas por rizobios e identificaron genes únicos expresados diferencialmente (Nanjareddy et al., 2017a). Este estudio identificó 2,645 (1,247 upregulated y 1,398 downregulated) unigenes que se

expresaron diferencialmente en respuesta a la colonización rizobial, en comparación con las raíces no inoculadas. Este estudio también muestra los perfiles de expresión cuantitativos de genes únicos y compartidos asociados con la simbiosis rizobial.

Este repositorio se utilizó para buscar los nuevos miembros del gen asociados con los rizobios en este caso, los miembros de la familia *SnRK*.

4.5 Papel de los genes *SnRK* en la simbiosis

En *Arabidopsis* el gen *SnRK1* tiene un papel central en la señalización del azúcar y participa en la activación redox postraduccional de la ADP-glucosa- pirofosforilasa y, por lo tanto, en la biosíntesis del almidón y el metabolismo de los carbohidratos (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009). Además, los *SnRK* están implicados en la señalización de ABA y en la fosforilación directa de varias enzimas, tales como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa fosfato sintasa, nitrato reductasa y trehalosa-fosfato sintasa. La *HMG-CoA* reductasa es una enzima clave en la ruta del mevalonato de la biosíntesis de isoprenoides. En *M. truncatula*, una *HMG-CoA* reductasa interactúa con la quinasa similar al receptor *DMI2* y es esencial para la señalización y nodulación temprana de FN (Kevei et al., 2007). Además, la señalización ABA afecta la señalización de los FN, el desarrollo de nódulos y la fijación de nitrógeno. Por lo tanto, las quinasas *SnRK* pueden afectar la señalización de los FN a través de la ruta de isoprenoides o la ruta de señalización de ABA. En otro estudio, el estado de fosforilación de la quinasa *SnRK1* aumentó después del tratamiento con FN en las raíces de *M. truncatula* (van Ness et al., 2016).

También se sabe que la quinasa *SnRK1* funciona en la señalización de azúcar. Las quinasas *SnRK* directamente fosforilan las enzimas del metabolismo de la sacarosa, como la sacarosa fosfato sintasa y la trehalosa-fosfato sintasa (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009). En nódulos maduros, se espera que la demanda de energía (sacarosa) sea mayor para soportar bacterias fijadoras de nitrógeno (Kavroulakis et al., 2000). Como resultado, varios genes de señalización de azúcar se activan en nódulos funcionales. Informes recientes muestran que el silenciamiento del gen *PvTRE1* mejora la biomasa de nódulos y el número de bacteroides en el frijol (Barraza et al., 2013). El gen de clase II *PvTPS9* modula el metabolismo de la trehalosa en los nódulos del frijol (Barraza et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento no se reportan evidencias experimentales directas sobre la función de las quinasas *SnRK* en la simbiosis.

5. Metodología

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

Anteriormente, se llevó a cabo un perfil global transcripcional de las raíces de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa colonizadas con esporas de *Rhizophagus irregularis*, o la cepa CIAT899 de *Rhizobium*

tropici (Nanjareddy et al., 2017a). Utilizando los datos transcriptómicos, se buscaron los genes *SnRK* que aumentaron su regulación en condiciones simbióticas rizobiales y se seleccionó un miembro de la subfamilia *SnRK3*.

5.2 Material vegetal

Para validar los datos de secuenciación de ARN, se esterilizaron superficialmente semillas de *P. vulgaris* L. cv. Negro Jamapa las cuales se germinaron tal como describe (Nanjareddy et al., 2017a). Las plántulas germinadas de dos días de edad se trasplantaron a vermiculita estéril y se inocularon con *Rhizobium tropici* de acuerdo con Nanjareddy et al., 2017b. Plantas de *P. vulgaris* sin inocular sirvieron como controles. Los tejidos de la raíz se separaron de los tallos una semana después de la inoculación, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta necesitarse durante la extracción de ARN.

5.3 Aislamiento de ARN

Los tejidos de la raíz se trituraron en nitrógeno líquido y el ARN total se extrajo usando el Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La contaminación de ADN en las muestras de ARN se eliminó incubando las muestras con ADNasa libre de ARNasa (1 U μl^{-1}) a 37 °C durante 15 minutos y posteriormente a 65 °C durante 10 minutos. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis y la concentración se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA).

5.4 Identificación y Análisis del promotor del gen *PvSnRK3*

Para la identificación del promotor del gen *SnRK3* de *P. vulgaris*, se realizó la búsqueda de la secuencia del gen *SnRK3* en el genoma del frijol (*Phaseolus vulgaris* v2.1) de la base de datos Phytozome (Phytozome version 12.02.2; <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (Goodstein et al., 2012). A partir de la secuencia del gen *PvSnRK3*, se tomaron 2029 bp río arriba del codón de inicio de la traducción. Esta región fue considerada la región promotora del gen *SnRK3*.

La secuencia de las regiones promotoras 2,029 pb cadena arriba de la región codificante del gen *SnRK3* fue descargada de Phytozome v12.1, de la base de datos del genoma de *P. vulgaris*. El análisis bioinformático de la secuencia del promotor se realizó utilizando el software PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot et al., 2002), y PlantRegMap (PlantTFDB; <http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/index.php>) (Jin et al., 2017) para identificar los elementos

regulatorios en cis y los posibles sitios de unión de los factores de transcripción del promotor del gen *PvSnRK3*. La frecuencia de los motivos encontrados en el promotor del gen *SnRK3* se representó en forma de tabla.

5.5 Diseño de oligos específicos para el promotor del gen *SnRK3*

Los oligos específicos para el promotor del gen *SnRK3* fueron diseñados para cumplir los objetivos de este trabajo. Se diseñó un par de oligos para promotor *PvSnRK3* que amplifica un fragmento de 2029 pb. Para ello, se utilizó la herramienta en línea Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). El juego de oligonucleótidos que se empleó para el PCR fue el siguiente:

Gen	Oligos para el promotor	Secuencia de los oligos
<i>PvSnRK3</i>	<i>prSnRK3</i> For	5'- CACCCTCCTCCTAGGTTTTCTTAAATG -3'
	<i>prSnRK3</i> Rev	5'- CGTTGTGGAAATGAATCACC -3'

5.6 Extracción de ADN genómico de frijol

Se aisló ADN genómico de puntas de raíces provenientes de semillas de frijol germinadas durante dos días en oscuridad, utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en un 0,8% de gel de agarosa y la concentración se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific).

5.7 Clonación del promotor *PvSnRK3*

Amplificación del promotor del gen *PvSnRK3*

La amplificación del promotor del gen *PvSnRK* se llevo a cabo por PCR. Cada reacción de PCR, tuvo un volumen de 20µL (0.5µL (100 ng) de ADN de frijol, 15.5µL de agua, 2µL de 10X Roche PCR Buffer+Mg, 0.5 µL de 10 mM dNTPs Mix, 0.5µL de oligo *prSnRK3*-For, 0.5µL de oligo *prSnRK3*-Rev, 0.5µL de 50X Advantage Polymerase). Las condiciones de PCR que se utilizaron fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 4 minutos a 94 °C, amplificación durante 31 ciclos (desnaturalización por 45 segundos a 94 °C, alineamiento por 45 segundos a 55 °C, extensión por 2 minutos a 72 °C) y extensión

final por 10 minutos a 72 °C. El fragmento amplificado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, se tiñó con SYBR Safe DNA Gel Stain, y se visualizó bajo luz ultravioleta.

Como referencia se utilizó un marcador de ADN de 1kb. Utilizando el Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit de la compañía Thermo Scientific, se realizó la purificación del producto de PCR del gel de agarosa.

Ligación del promotor del gen *SnRK3* al vector de entrada pENTR

Al tener el fragmento amplificado del gen *SnRK3*, se realizó la ligación al vector de entrada pENTR (Figura A1), por medio de recombinación dirigida. Para ello se utilizó el pENTR/D-TOPO Cloning Kit. Para llevar a cabo esto, se utilizó el kit de clonación pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Transformación de *E. coli* con el vector pENTR/promotor del gen *PvSnRK3*

Se utilizaron 2 µL de la mezcla de reacción de ligación para transformar células competentes de *Escherichia coli* (*DH5α*; Invitrogen) usando las instrucciones del fabricante y se agregaron 150 µL de la mezcla de transformación en caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 mg/L de kanamicina (Kan50). Se cultivaron las células en placas a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se seleccionaron entre 3-6 colonias y se cultivaron durante toda la noche en medio LB con Kan50. Utilizando el método de selección y análisis de plásmidos mediante PCR utilizando los oligos M13 específicos del vector, se aisló el ADN plasmídico. Para el PCR, se usaron 100 ng de plásmido, 0.3 pm. de oligos, 10X de buffer de PCR, 0,5 U de ADN Taq polimerasa y 10 mM dNTP. Utilizando las siguientes condiciones de amplificación de PCR; 95 °C durante 3 minutos; 30 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 75 segundos); y 72 °C durante 7 minutos. Se visualizó los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.2%. Se aseguró que las inserciones fueran correctas, ya que aquellas donde la inserción fue un éxito cuentan con una banda a 2,353 bp y los vectores sin inserciones una banda de 324 bp.

Ligación del promotor *PvSnRK3* al vector PBGWFS7.0

Se llevó a cabo la reacción LR entre el vector de entrada (pENTR/D-TOPO-*prSnRK3*) y el vector destino PBGWFS7.0 (Figura A2) utilizando una mezcla de enzimas comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Más tarde, se utilizaron 2 µL de reacción LR para transformar células competentes de *E. coli* usando técnicas estándar tal y como se describe en las instrucciones del fabricante, para posteriormente cultivarse 150 µL de la mezcla de transformación en LB con 100 mg/L de espectinomicina (Spe100). Se cultivaron las células en placa a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron aproximadamente 5 colonias y se cultivaron durante toda la noche en medio LB con Spe100. Se aisló el ADN plasmídico y se analizó el plásmido mediante PCR utilizando los oligos específicos del promotor y las condiciones de PCR descritas anteriormente para esos oligos. Se

visualizaron los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1.2% para confirmar la amplificación. Los amplicones obtenidos fueron de 2,029 pb. El plásmido positivo (pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS-GFP*) se envió al IBT-UNAM para la verificación de la secuencia con los oligos específicos del promotor.

Transformación de *A. rhizogenes* con el vector PBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS*

Se utilizaron los plásmidos obtenidos para transformar la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes*. Se agregaron 2 µL de plásmido pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS* a 50 µL de células electrocompetentes y se sometieron a electroporación en una cubeta de 1 mm con las siguientes condiciones: 1.8 kV, 25 µF y 200 Ω. Se les permitió a las células recuperarse en ~500 µL de medio SOC y se agitaron a 28 °C durante 2 horas. Se cultivaron en placas con LB con Spe100 y se crecieron a 28 °C durante 2 días. Posteriormente, los plásmidos se aislaron de las colonias y el inserto se verificó mediante PCR utilizando oligos específicos del gen como se describe anteriormente. Se elaboraron reservas de los clones positivos en glicerol y se almacenaron a -80 °C. El cultivo de *A. rhizogenes* que alberga el vector pBGWFS7.0 vacío se utilizó como control negativo.

5.8 Transformación de Hairy Roots en frijol con *A. rhizogenes*

Se utilizó el protocolo descrito por (Nanjareddy et al., 2017b). Brevemente, se esterilizaron las semillas de frijol (*P. vulgaris* cv. Negro Jamapa) y se germinaron en papeles filtro estériles, humedecidos con solución de Broughton & Dilworth (B&D) (Tabla A1) durante 2 días en oscuridad a 28 °C (Nanjareddy et al., 2017b). Después, se raspó de la placa sólida de LB el cultivo con sólo un día de crecimiento de *A. rhizogenes* K599 que contiene pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS* y se inyectó en plantúlas con 2 días de germinación en el sitio donde se encuentra el hipocótilo, posteriormente se colocaron en tubos de vidrio que contenían solución B&D y se incubaron a 28 °C con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El callo que se formó en los sitios de las heridas se observó entre los 5-7 días, y encontró aproximadamente 2 cm de raíces peludas a los 10-12 días después de la transformación. Después de 2 semanas, se retiró la raíz primaria cortando el tallo 2 cm por debajo de las hairy roots y se trasplantaron a macetas con vermiculita estéril (Figura 4). Se mantuvieron las plantas en una cámara de crecimiento (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 28 °C) y se irrigaron con solución B&D.

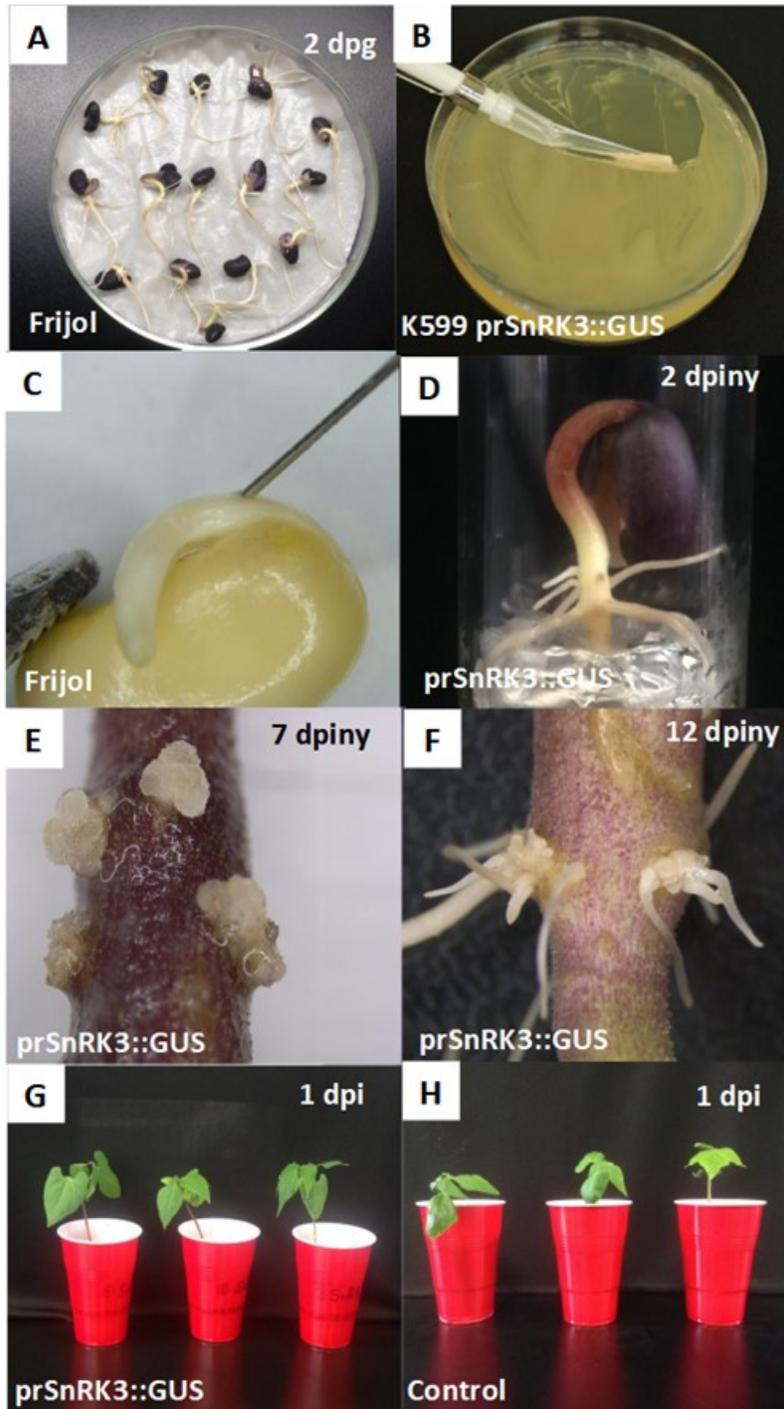


Figura 4. Transformación de hairy roots en frijol con *A. rhizogenes*. **(A)** Semillas esterilizadas de *P. vulgaris* germinando sobre papel filtro estéril. **(B)** Extracción del cultivo de *A. rhizogenes* (*prSnRK3::GUS*) **(C)** Inyección de células bacterianas dentro de hipocótilo **(D)** Plántula de frijol inyectada con células bacterianas 2 días después de la inyección (dpiny) **(E)** Callos formados en el sitio de la herida 5-7 dpiny **(F)** Hairy Roots 12 dpiny. Plantas compuestas trasplantadas en vermiculita estéril **(G)** *prSnRK3::GUS* **(H)** Control. dpi, días después de la inoculación.

5.9 Inducción de nódulos por la bacteria *Rhizobium* en las raíces de frijol común

Para la inducción de nódulos radiculares (Nanjareddy et al., 2017b), se cultivó la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* (esta especie es compatible con el frijol común) en 100 ml de medio PY (0.5 gr de peptona, 0.3 gr de extracto de levadura) suplementado con 7 mM/ml CaCl_2 y 20 mg/ml de ácido nalidíxico y se incubó a 30 °C durante 24 horas con agitación a 200 rpm. Más tarde, las células se sedimentaron en una centrifugadora durante 3 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante, posteriormente se resuspendió el sobrenadante en MgSO_4 10 mM o agua estéril. Posteriormente, se ajustó el OD de las células de rhizobia a 0.05 a OD_{600} al diluir con MgSO_4 10 mM o agua estéril.

Para inducir la nodulación, se inoculó 1 ml del cultivo anterior en la zona de la raíz de plántulas de frijol común mantenidas 2 días anteriores a la inoculación en macetas que contienen vermiculita estéril. Se mantuvieron las plantas inoculadas en cámaras de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas luz y una humedad relativa del 65% a 28 °C. Las plantas se irrigaron regularmente con una solución B&D con nitrógeno limitado (KNO_3 2 mM) para promover la nodulación.

5.10 Ensayo histoquímico *GUS* en raíces transgénicas

Para observar la actividad espacio-temporal del promotor durante la simbiosis de frijol con *Rhizobium*, se tomaron muestras de las raíces transformadas en diversas etapas del proceso de la simbiosis, se tiñeron con buffer Gus X-gluc (Tabla A2) siguiendo el protocolo de (Jefferson, 1987), y se incubaron en oscuridad de 8 a 16 horas a 37 °C. Después de la tinción, las muestras se enjuagaron en etanol al 70% durante al menos 5 minutos, y se examinaron en el microscopio para la tinción *GUS*.

5.11 Microscopía

Para analizar el fenotipo de la infección rhizobial, las raíces transgénicas control y el promotor *prSnRK3::GUS* inoculadas con *R. tropici* se recolectaron en diferentes puntos de tiempo y se tiñeron para determinar la actividad de *GUS* acorde a (Jefferson, 1987). Las raíces teñidas con *GUS* se clarificaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 8 horas y luego se examinaron para determinar el fenotipo de simbiosis de nódulos, hilos de infección (HI), divisiones de células corticales, primordios de nódulos y nódulos bajo un microscopio óptico (Leica, DMLB bright-field microscope, Buffalo Grove, IL, EE. UU.). Los nódulos de 21 y 40 días teñidos con *GUS* se seccionaron usando una cuchilla de afeitar. Las secciones se montaron en glicerol al 10% y se observaron bajo un microscopio óptico. Las raíces transgénicas teñidas con *GUS* que expresan el promotor del gen *PvSnRK3::GUS* se observaron con un microscopio estereoscópico (Leica) y se obtuvieron imágenes de los primordios de los nódulos y los

nódulos maduros. Para observar la morfología de la raíz, se retiraron las raíces no inoculadas e inoculadas con *R. tropici* de los tubos de vidrio y los segmentos de la raíz se montaron rápidamente en portaobjetos para microscopio con buffer de montaje (buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 en glicerol al 40%). Las imágenes se obtuvieron uniformemente de las zonas de elongación de la raíz bajo un microscopio óptico.

6. Resultados

6.1 Selección del gen candidato *SnRK*

Anteriormente, se publicó el perfil transcripcional global de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa, específicamente de las raíces colonizadas con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* (Brenda Mariana et al., 2015; Nanjareddy et al., 2017a). En el presente estudio, se buscaron en los mismos perfiles transcripcionales y se seleccionó una subfamilia del gen *SnRK3*, tomándose como guía la expresión transcripcional. En *P. vulgaris*, el gen *SnRK3* (Phvul.007G279600) se encontró sobre regulado en condiciones simbióticas rizobiales.

6.2 Identificación y análisis de la secuencia del promotor de *SnRK3*

La base de datos de Phytozome muestra que el gen *SnRK3* se localiza en el cromosoma número 7 de *P. vulgaris*. El análisis estructural del gen mostró un solo exón con 125 pb dentro de la región no traducida 5' (UTR) y 218 pb dentro de la región 3' UTR (Figura A3). La quinasa SnRK3 tiene 422 aminoácidos (Figura 5). En el presente estudio, se seleccionaron aproximadamente 2029 pb de ADN río arriba del gen y se diseñaron un set de oligos para amplificar el promotor del gen *PvSnRK3* (Figura 5).

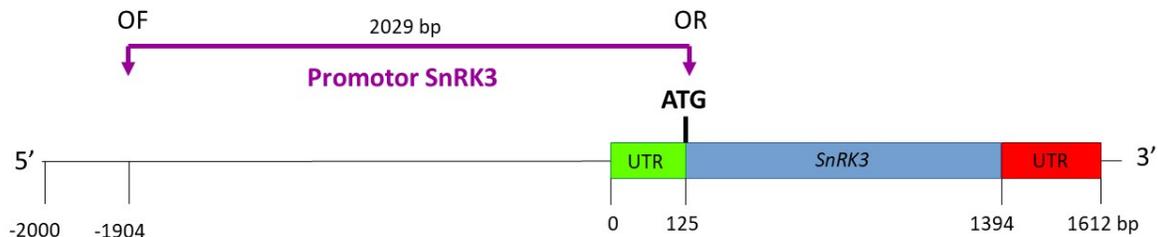


Figura 5. Estructura génica y análisis del promotor del gen de *Phaseolus SnRK3*. Se localizó la secuencia del gen *SnRK3* en el genoma de *Phaseolus vulgaris* y se seleccionó -2029 bp río arriba del codón de inicio de la transcripción del gen. Los oligos para la amplificación del promotor fueron diseñados para amplificar esta región.

6.3 Identificación de TF en la secuencia del promotor del gen *PvSnRK3*

Para comprender la regulación transcripcional y la función potencial del gen *SnRK3*, se analizaron los elementos reguladores en *cis* y los posibles sitios de unión de factores de transcripción o transcription factors en inglés (TF) en la secuencia del promotor (Tabla 1) utilizando el software PlantCARE y PlantRegMap. Los resultados muestran 47 factores de transcripción, pertenecientes a 11 familias para la región promotora de 2029 pb del gen *SnRK3* (Tabla 1). Entre ellos, 13 TF pertenecen a la familia *MYB*, también conocida como familia relacionada con la mieloblastosis o myeloblastosis related *family en inglés* y están involucrados en la diferenciación y proliferación de tipos celulares. Al menos 7 factores de transcripción llamados cremallera de homeodominio de leucina o Homeodomain-leucine zipper en inglés (*HD-ZIP*) que se sabe funcionan durante el estrés biótico (Elhiti & Stasolla, 2009) y también participan en el desarrollo de nódulos (Boualem et al., 2008). De manera similar, se encontraron 6 TF *C2H2* (relacionado con Cys2His2 o Cys2His2-like en inglés) en la región promotora del gen *SnRK3* y se sabe que estos miembros están involucrados en la diferenciación del simbiosoma durante el desarrollo del nódulo (Sinharoy et al., 2013). Los TF *Dof* y relacionado con la mieloblastosis o myeloblastosis related en inglés *MYB-related* (4 encontrados de cada uno) participan en la regulación de la luz, en genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, la regulación del fitocromo y el desarrollo de nódulos (Duangkhet et al., 2016). Se encontraron al menos 3 TF, de cada uno, *bZIP* (dominio de cremallera de leucina básica o basic leucine zipper domain en inglés), *GATA* y *NAC* en la región promotora. Entre ellos, se sabe que los miembros de *NAC* están involucrados en la senescencia del nódulo (De Zélicourt et al., 2012). Además, en el promotor también se encontraron 2 TF de *TCP*, llamados también teosinte ramificado 1 o teosinte branched 1 en inglés y un miembro de *AP2* (Proteína activa 2 o activating protein 2 en inglés) y *BBR-BPC* (barley B recombinant (BBR)/basic pentacysteine (BPC) en inglés). *AP2* ha sido bien caracterizado en el desarrollo de hilos de infección en la simbiosis de leguminosas con *Rhizobium* (Yano et al., 2017). En conjunto, los reportes anteriores y el análisis del promotor, muestran que los TF presentes en las regiones promotoras del gen *SnRK3* demuestran su papel esencial en el crecimiento, desarrollo y en la simbiosis de leguminosas y *Rhizobium*.

Tabla 1. Factores de Transcripción encontrados en el promotor del gen *SnRK3*.

FT Familia	Sitios de unión	FT	Función
<i>AP2</i>	4	1	Regulación transcripcional del crecimiento y desarrollo. Respuesta a estímulos ambientales. Desarrollo de hilos de infección en la simbiosis de leguminosas con <i>Rhizobium</i> (Yano et al., 2017).

<i>BBR-BPC</i>	1	1	Forma de la hoja, señalización de hormonas (Hecker et al., 2015).
<i>bZIP</i>	3	3	Desarrollo, procesos fisiológicos, estímulos ambientales, respuesta a estrés biótico y abiótico, regulación por luz (Wang et al., 2015a).
<i>C2H2</i>	12	6	Diferenciación del simbiosoma durante el desarrollo del nódulo (Sinharoy et al., 2013).
<i>Dof</i>	4	4	Regulación por luz de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, mecanismos de defensa en plantas, germinación, respuesta a auxinas y giberelinas.
<i>GATA</i>	12	3	Regulación de la transcripción en respuesta a luz.
<i>HD-ZIP</i>	10	7	Respuesta a estrés abiótico, ácido abscísico, luz azul, embriogénesis, señalización de auxinas, acumulación de antocianinas, funcionamiento del meristemos, diferenciación de células de la epidermis, formación de tricomas y desarrollo de la raíz (Elhiti & Stasolla, 2009). Desarrollo del nódulo (Boualem et al., 2008).
<i>MYB</i>	14	13	Diferenciación y proliferación de tipos celulares.
<i>MYB-related</i>	4	4	Regulación del fitocromo, regulación de la biosíntesis de antocianinas. Desarrollo del nódulo (Duangkhet et al., 2016).
<i>NAC</i>	3	3	Respuesta a patógenos, infecciones virales, estímulos ambientales, sequía, salinidad y baja temperatura. Senescencia del nódulo (De Zélicourt et al., 2012).
<i>TCP</i>	2	2	Desarrollo de la planta, germinación, desarrollo vegetativo, formación de flores y frutos, crecimiento, respuesta a señales ambientales (Danisman, 2016).

6.4 Aislamiento y clonación del promotor del gen *SnRK3* en fusión con *GUS* usando el sistema Gateway

Amplificación del promotor de SnRK3

El fragmento del promotor del *SnRK3* de 2029 pb se amplificó usando los oligos específicos del promotor utilizando ADN Taq polimerasa de alta fidelidad. La mezcla de reacción, compuesta de ADN genómico de frijol recién aislado (100 ng = 0.5 µL), 10X Roche + Mg PCR buffer (2 µL), mezcla de dNTP 10 mM (0.5 µL), *prSnRK3* For oligo (0.5 µL), *prSnRK3* Rev oligo (0.5 µL), Advantage 50X Taq polimerasa (0.5 µL y H₂O (15.5 µL), la reacción de PCR se realizó utilizando un programa que consiste en las siguientes condiciones: 94 °C durante 4 min, 31 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 2 minutos, y finalmente a 72 °C durante 10 minutos. El producto amplificado se separó en un gel de agarosa al 1.2% a 100 V durante 25 minutos. Los resultados muestran el fragmento promotor esperado de 2019 pb visualizado bajo un transiluminador UV (Figura 6). El fragmento del gel se aisló y se

purificó utilizando el kit de extracción de gel Thermo Scientific GeneJET siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el fragmento purificado se clonó en el vector pENTR/D-TOPO de acuerdo con el Instrucciones del fabricante y transformadas en *E. coli*.

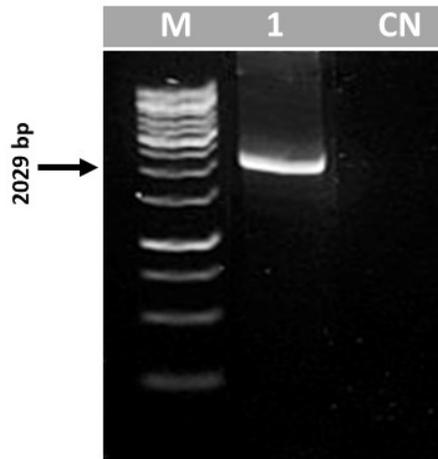


Figure 6. Amplificación por PCR del promotor del gen *SnRK3* del ADN genómico de *P. vulgaris*. Gel de agarosa que muestra el tamaño esperado del promotor de 2029 pb (flecha). M: Marcador de peso molecular 1 kb. 1: producto de PCR amplificado del promotor *prSnRK3*; CN: Control negativo, es decir, todos los componentes de la reacción, excepto el templado de ADN.

Clonación del promotor *prSnRK3* en el vector final pBGWFS7.0 y transformación de *A. rhizogenes* K599

Se amplificó el fragmento de 2,353 pb del plásmido pENTR/D-TOPO/*prSnRK3* utilizando los oligos M13 (Figura 7A). El fragmento M13 purificado se usó más tarde para llevar a cabo una reacción LR con el vector final pBGWFS7.0. Los plásmidos positivos de pBGWFS7.0/*prSnRK3*::*GUS* se verificaron por PCR utilizando los oligos específicos del promotor. Los resultados muestran dos plásmidos positivos con un tamaño de fragmento esperado de 2,029 pb (Figura 7B). El plásmido positivo por PCR fue secuenciado usando la tecnología Sanger con los oligos específicos del promotor para verificar la autenticidad del inserto. La secuencia tuvo una identidad del 100% con la secuencia del promotor del gen *SnRK3* proveniente del ADN genómico (Figura A4). A continuación, se transformó la cepa K599 de *A. rhizogenes* usando el plásmido pBGWFS7.0/*prSnRK3*::*GUS* positivo. Los plásmidos positivos de K599-pBGWFS7.0/*prSnRK3*::*GUS* muestran el tamaño de fragmento esperado de 2,029 pb (Figura 7C).

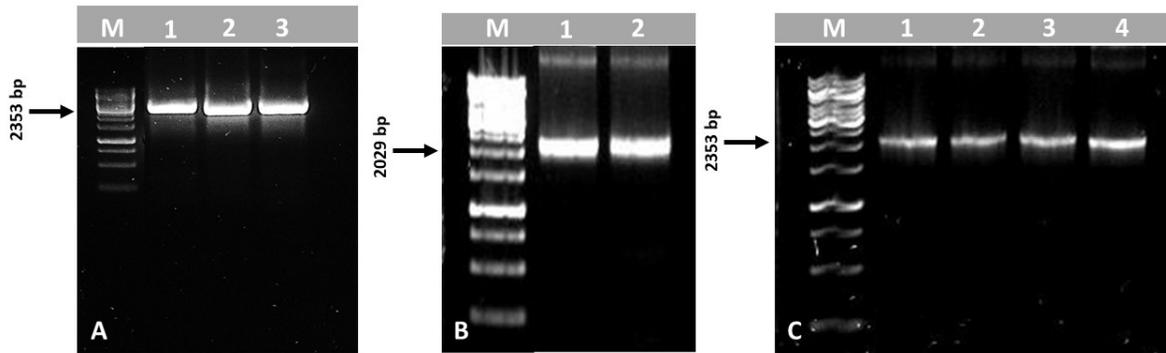


Figure 7. Amplificación por PCR del promotor del gen *PvSnRK3* en vectores plasmídicos. **(A)** Amplificación por PCR de pENTR/D-TOPO/*prSnRK3* con oligos M13 que muestran un fragmento de 2353 pb. **(B)** Amplificación por PCR de pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS* con oligos específicos del promotor que muestran un fragmento de 2029 pb. **(C)** Amplificación por PCR de K599-pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS* con oligos específicos del promotor que muestran un fragmento de 2029 pb. M: Marcador de peso molecular 1 kb. 1-4: vectores plasmídicos aislados de colonias positivas.

6.5 Análisis de la expresión espacio temporal del promotor del gen *SnRK3* en hairy roots de frijol durante la simbiosis con *Rhizobium*

Respuestas simbióticas tempranas de promotor *PvSnRK3* en raíces transgénicas hairy roots

Se evaluó la actividad espacio-temporal del promotor del gen *PvSnRK* durante la simbiosis rizobial. Primero, la colonia positiva de *A. rhizogenes* K599 que lleva el plásmido pBGWFS7.0/*prSnRK3::GUS* (de aquí en adelante *prSnRK3::GUS*) se cultivó en medio fresco y se inyectó a una plántula 2 días después de su germinación como se describe en la sección de materiales y métodos (Figura 4). Los resultados muestran que 7 días posteriores a la inyección (dpiny), las plantas de frijol generaron callos frágiles (Figura 4E) y en 12 días emergieron hairy roots (Figura 4F). En esta etapa, se cortaron y eliminaron las raíces de tipo salvaje y sólo se conservaron las hairy roots (estas plantas se denominan plantas compuestas: planta que tiene parte aérea de tipo salvaje pero raíces transgénicas). También se generó un conjunto de hairy roots control utilizando un vector vacío (*A. rhizogenes* K599 que lleva el vector pBGWFS7.0 solo). Las plantas compuestas control y con el promotor *prSnRK3::GUS* se trasplantaron en vermiculita estéril; un set de plantas (cada set tenía 9 plantas control o *prSnRK3::GUS*) se mantuvieron en condiciones sin inocular y el otro set se inoculó con *Rhizobium tropici* recién cultivado.

Posteriormente, las raíces control y con el promotor *prSnRK3::GUS* se sometieron al ensayo histoquímico *GUS*. Los resultados muestran la fuerte expresión de *GUS* en las puntas meristemáticas de las raíces no inoculadas con el promotor *prSnRK3::GUS* y también en la vasculatura de la raíz a los 3 días después del trasplantadas (Figura 8B). Sin embargo, después de la inoculación con *R. tropici*, la expresión de *GUS* se

incrementó en la zona de elongación (Figura 8D), lo que indica la regulación positiva de *prSnRK3* en respuesta a los rizobios. No se observó tal expresión de *GUS* ni en las raíces control no inoculadas ni inoculadas con *R. tropici* (Figura 8A,C). Estos experimentos confirman que la actividad del promotor del gen *SnRK3* se incrementó en la zona de elongación de la raíz de *P. vulgaris*.

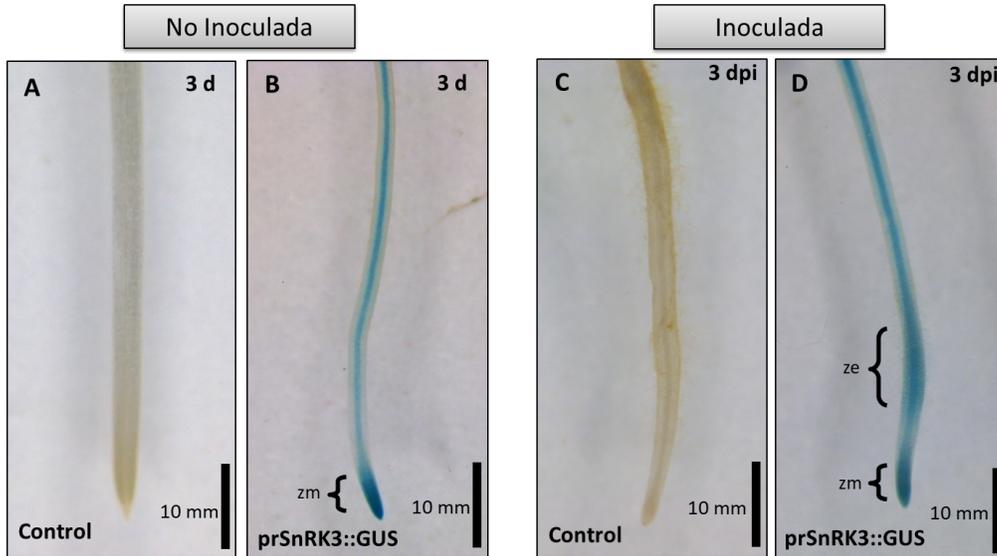


Figura 8. Expresión del promotor del gen *SnRK* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* durante las etapas tempranas de la infección de *Rhizobium tropici*. Tinción histoquímica con *GUS* en raíces no inoculadas de (A) control (vector vacío) y (B) promotor *prSnRK3::GUS*. De manera similar, *R. tropici* inoculó (C) la raíz de control y (D) la raíz transgénica con el promotor *prSnRK3::GUS*. (C-D) revelan expresión del promotor del gen *SnRK* en hairy roots incubadas con *GUS* como sustrato. Llaves negras señalan aumento de expresión espacio temporal del promotor de *SnRK*. d: días, dpi: días post inoculación, zm: zona meristemática, ze: zona de elongación.

6.6 Actividad del promotor del gen *PvSnRK3* en hairy roots

Para comprender mejor el papel del gen *SnRK3* durante la formación de hilos de infección, las raíces transgénicas que expresan el promotor *PrSnRK3::GUS* y las construcciones control se inocularon con el tipo salvaje de *R. tropici*. Las raíces se sometieron al ensayo de *GUS* a 3 dpi y las observaciones bajo el microscopio revelaron que los pelos de la raíz infectados con *R. tropici* estaban rizados, mostrando una bolsa de infección e hilos de infección (Figura 9A-B). La expresión de *GUS* fue intensa en los hilos de infección y la bolsa de infección (Figura 9A), lo que indica la actividad del promotor del gen *SnRK3* durante las etapas tempranas del proceso de infección rizobial en las leguminosas.

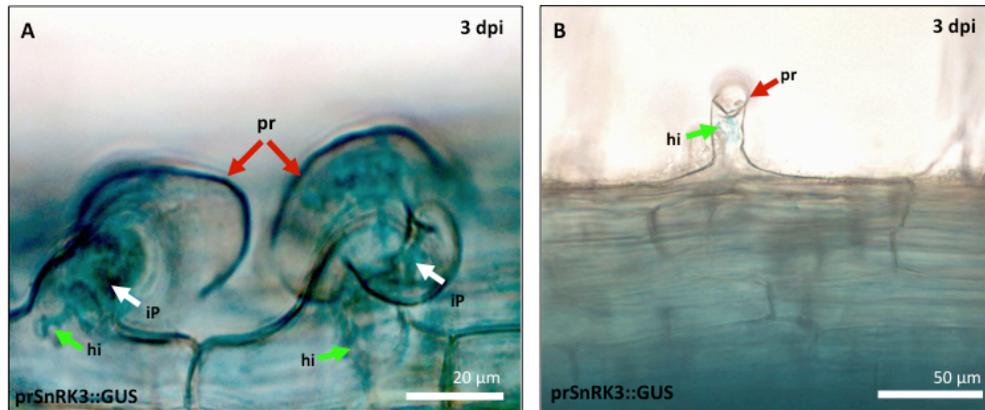


Figura 9. Análisis del promotor del gen *SnRK3* en pelos radicales de raíces transformadas de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici*. **(A-B)** muestran expresión del promotor del gen *SnRK3::GUS* en hairy roots incubadas con *GUS* como sustrato. Los hilos de infección están señalados con flechas verdes y flechas rojas señalan zonas sin expresión del promotor del gen *SnRK3*. Las flechas blancas indican el infection pocket (bolsillo de la infección) de rizobios. dpi: días post inoculación, hi: hilo de infección, pr: pelo radical, IP, infection pocket.

6.7 Actividad del promotor del gen *PvSnRK3* durante las divisiones de células corticales y desarrollo primordial de nódulos

Para comprender los patrones espacio-temporales de la actividad del promotor del gen *SnRK3*, se incubaron las raíces transgénicas con el promotor *prSnRK3::GUS* (5 a 8 dpi) en el buffer del ensayo *GUS* y se observaron en un microscopio óptico. Las hairy roots transgénicas muestran una expresión de *GUS* irregular a los 5 dpi. La expresión de *GUS* se restringió sólo a los sitios de división de células corticales (Figura 10A). De 6 dpi a 8 dpi, se observó una fuerte expresión de *GUS* en el nódulo primordio y se observó una expresión moderada de *GUS* en los tejidos vasculares (Figura 10B-C). Sin embargo, no se observó expresión de *GUS* en los tejidos de la corteza de las raíces transgénicas.

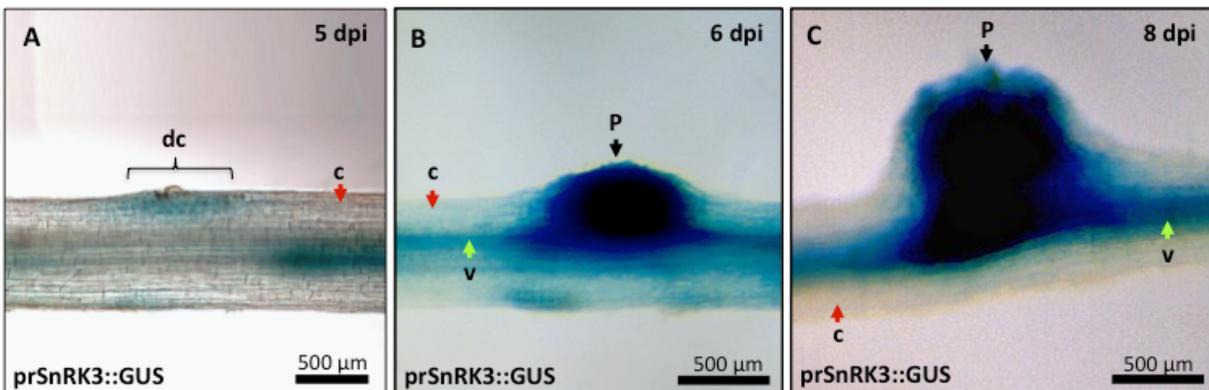


Figura 10. Actividad del promotor *prSnRK3* en las raíces transgénicas de *P. vulgaris* durante las divisiones de las células corticales y el desarrollo primordial de los nódulos. Actividad del promotor del

gen *SnRK3* fue detectada por tinción con *GUS* en la división de las células del contexto durante la formación del primordio (A), en el primordio (B) y en el nódulo joven (C). Flechas verdes señalan la actividad del promotor del gen *SnRK3*, flechas rojas indican la ausencia de actividad del promotor. dpi: días post inoculación, dc: división celular, c: córtex, v: vasculatura, p: primordio.

De manera similar, los nódulos jóvenes a 11 dpi muestran una expresión intensa de *GUS* en la región central de los nódulos, también en la vasculatura de nódulos y raíces (Figura 11A-B). En esta etapa, la corteza nodular está completamente ausente de la expresión de *GUS*. En conjunto, estos resultados muestran que el promotor del gen *SnRK3* está activo durante las primeras etapas del desarrollo del nódulo primordio en frijol.

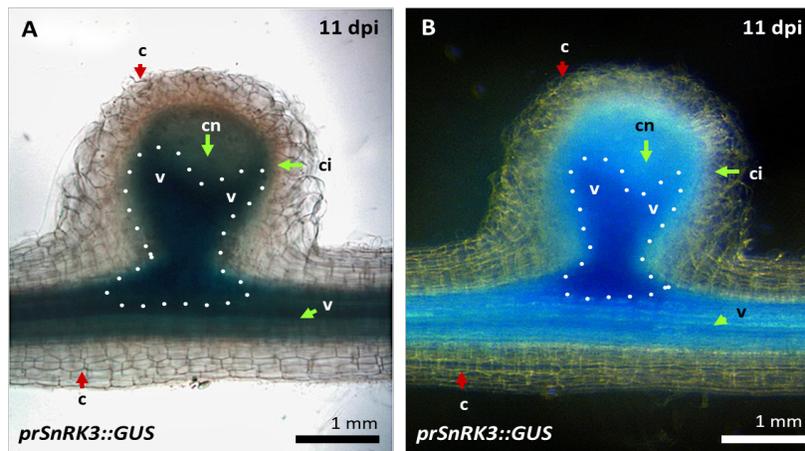


Figura 11. Expresión del promotor *prSnRK* en nódulos jóvenes durante la colonización de *R. tropici* en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. (A-B) muestran expresión del promotor *prSnRK* en el núcleo del nódulo y más intensamente dentro de la zona delimitada por la línea punteada, la cual corresponde a la vasculatura de los nódulos jóvenes en hairy roots sometidas a una tinción histoquímica con *GUS*. Flechas verdes señalan actividad del promotor del gen *SnRK3*, flechas rojas indican ausencia de actividad del promotor. c: córtex, cn: core del nódulo, ci: córtex interior, v: vasculatura, dpi: días post inoculación.

6.8 Análisis de la expresión del promotor del gen *PvSnRK3* en nódulos maduros

A continuación, se analizó la actividad del promotor del gen *SnRK3* en nódulos maduros de 21 dpi de plantas transgénicas y de control. Típicamente, a los 21 dpi, los nódulos están completamente maduros, funcionalmente activos, muestran claramente tejidos vasculares y son rosados, lo que indica la expresión de leghemoglobina (Gage, 2004; Figura 12A-B). A diferencia de los nódulos 11 de dpi, la intensidad de *GUS* en nódulos de 21 dpi fue uniforme en todos los nódulos, excepto en la corteza externa (Figura 12C,D).

Con el fin de obtener una visión clara, los nódulos que expresan el promotor *PvSnRK3* se examinaron bajo un microscopio compuesto. Como se muestra en la Figura 13A-B, la expresión de *GUS* está completamente ausente en las células corticales externas de los nódulos, mientras que se observa una tinción de *GUS* densa en la corteza interna y las regiones centrales de los nódulos.

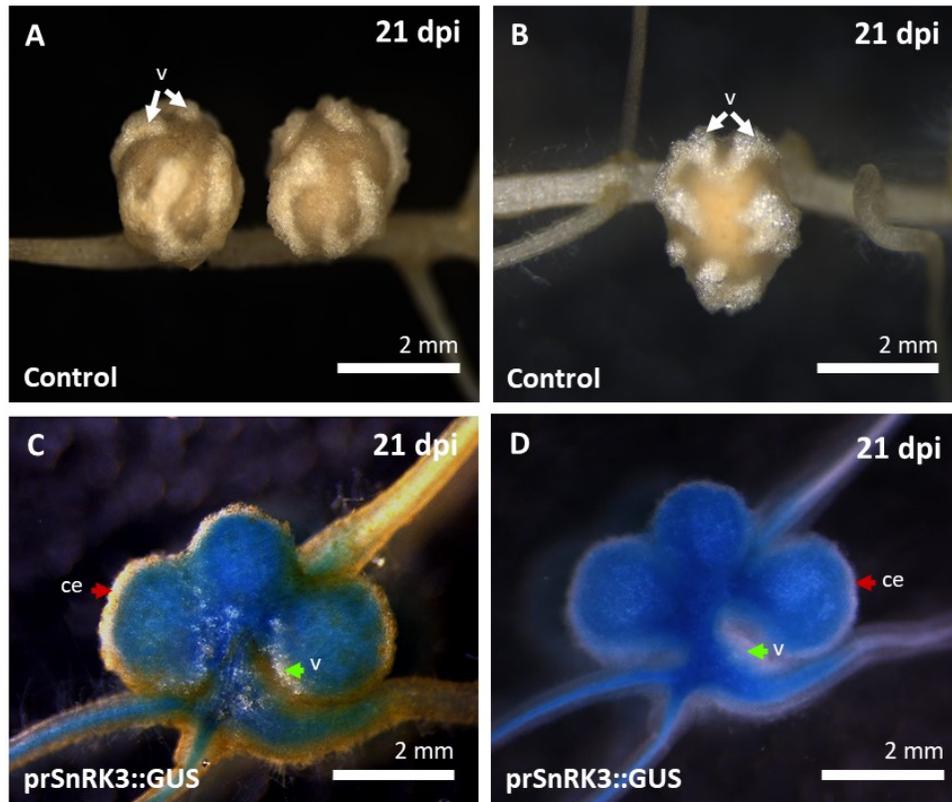


Figura 12. Actividad del promotor *prSnRK3* en nódulos maduros en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. (A-B) Ejemplifican nódulos maduros (control). (C-D) Muestran la expresión del promotor *prSnRK3* en el núcleo de los nódulos, con mayor actividad del promotor en la vasculatura. Flechas verdes señalan actividad del promotor del gen *SnRK3*, flechas rojas indican ausencia de actividad del promotor. v: vasculatura, ce: córtex externa.

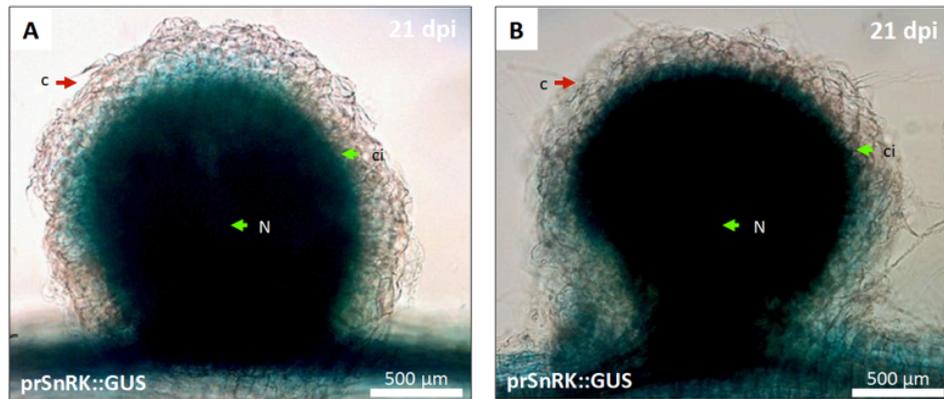


Figura 13. Actividad del promotor *prSnRK3* en dos nódulos maduros en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. **(A-B)** presentan intensa actividad del promotor *prSnRK3* en el núcleo de ambos nódulos. Flechas verdes señalan actividad del promotor del gen *SnRK3*, flechas rojas indican ausencia de actividad del promotor. c: córtex, ci: córtex interior, N: núcleo del nódulo, dpi: días post inoculación.

Posteriormente, los nódulos maduros teñidos con *GUS* se seccionaron a mano y se observaron bajo un microscopio óptico con un aumento mayor. En esta etapa, se observó una tinción de *GUS* en la corteza interna del nódulo y también en las células no infectadas (Figura 14A-B). Mientras que se observó una fuerte tinción de *GUS* en las células infectadas (células que contienen simbiosomas) y haces vasculares (Figura 14B-C). En conjunto, estos resultados muestran que el promotor del gen *PvSnRK3* está activo en todos los tipos de células de los nódulos maduros, excepto las células corticales externas.

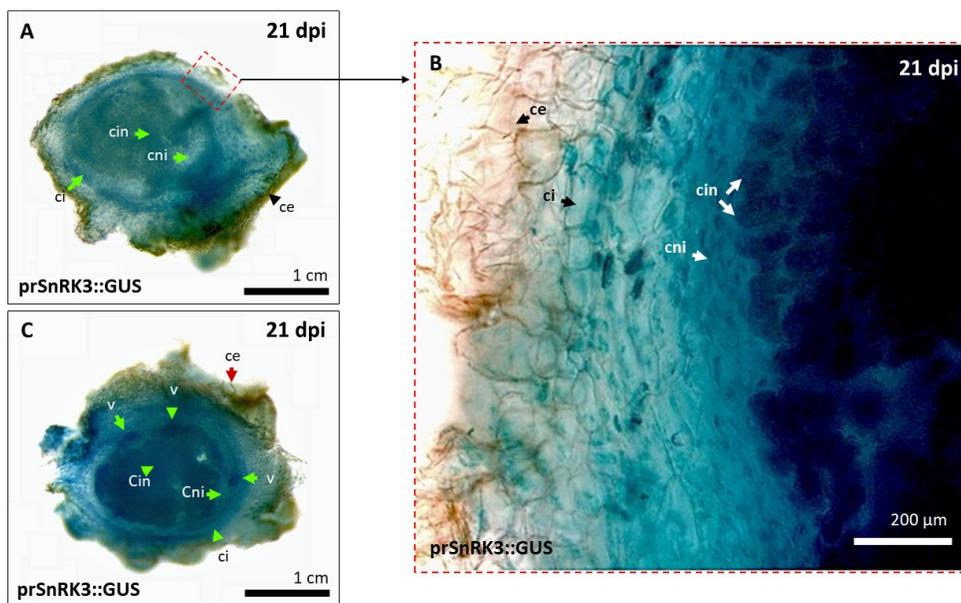


Figura 14. Actividad del promotor del gen *PvSnRK3* en nódulos maduros en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. (A and C) Imágenes de estereomicroscopios que muestran secciones transversales de nódulos maduros teñidos con GUS de 21 dpi. (B) Una vista ampliada de parte de la sección de nódulos bajo microscopio compuesto. La imagen muestra la tinción GUS en la corteza interna, las células no infectadas y una tinción GUS intensa en las células infectadas. ce: córtex externo, ci: córtex interior, v: vasculatura, Cin: células infectadas, Cni; células no infectadas, dpi: días post inoculación.

6.9 Análisis de la expresión del promotor del gen *PvSnRK3* en nódulos senescentes

Luego, se tenía la curiosidad por conocer los perfiles de expresión del promotor del gen *PvSnRK* en los nódulos senescentes. Por lo tanto, se permitió que las plantas compuestas crecieran hasta 40 dpi para que los nódulos envejecieran. Estos nódulos senescentes fueron analizados bajo el ensayo GUS. Bajo el estereomicroscopio, todos los nódulos senescentes con el promotor *prSnRK::GUS* mostraban una expresión de GUS muy débil (Figura 15A-C).

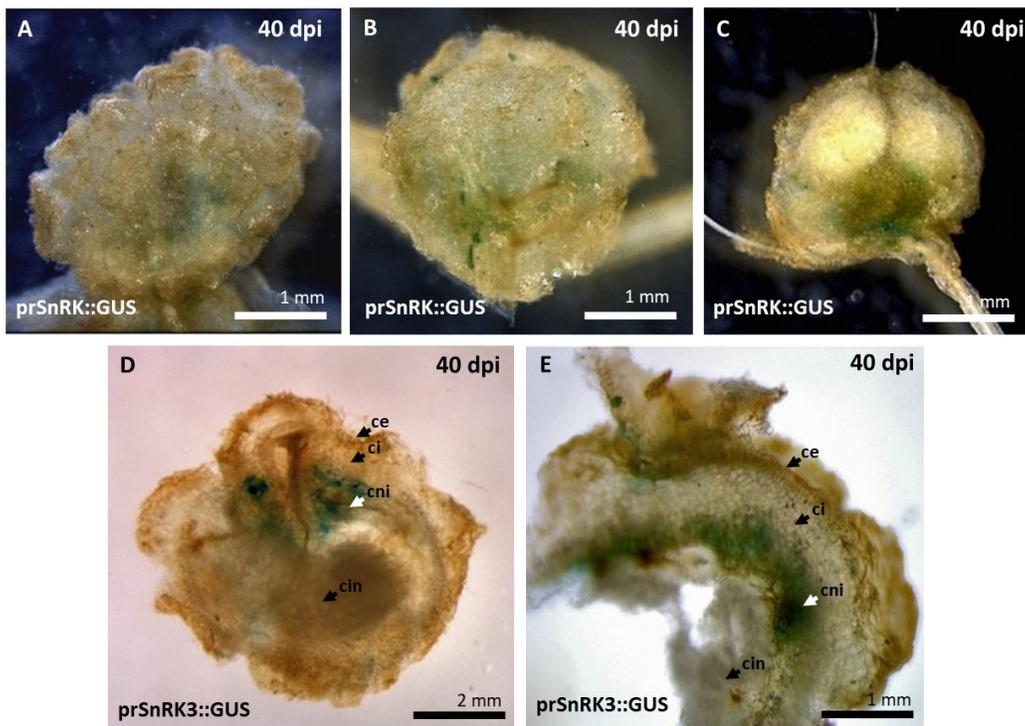


Figura 15. Expresión del promotor *prSnRK* en nódulos senescentes en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. La actividad del promotor *prSnRK* es muy débil, como se observa en las imágenes (A-C). (D-E) muestran cortes transversales de nódulos senescentes (40 dpi), donde se aprecia que la actividad del promotor *prSnRK* es casi inexistente, limitándose a algunas cuantas células del núcleo de nódulo. ce: córtex externo, ci: córtex interior, v: vasculatura, Cin: células infectadas, Cni; células no infectadas, dpi: días post inoculación.

Sin embargo, la expresión también disminuyó en los tejidos de la raíz. Estos nódulos teñidos con *GUS* se seccionaron transversalmente para ver el patrón interno de la expresión de *GUS*. Como se muestra en la Figura 15A-B, la expresión de *GUS* disminuye en los nódulos senescentes. La tinción *GUS* no se detectó en los nódulos, excepto en las regiones de la corteza interna del nódulo (Figura 15D-E). En conjunto, estos resultados muestran que la actividad del promotor del gen *PvSnRK* se reduce a medida que el nódulo está en proceso de senescencia y está completamente ausente en las células no infectadas e infectadas del nódulo central.

7. Discusión

Un elemento crucial de la regulación transcripcional y metabólica en respuesta al estrés y al estado energético son las proteínas, conservadas evolutivamente, quinasas sensoras de energía, las *SNF1* en levadura, las *AMPK* en mamíferos y las *SnRK* en plantas (Baena-Gonzalez y Sheen, 2008). En plantas, las quinasas *SnRK1* tienen un papel central en la señalización del azúcar y participación en la reacción redox postraducciona de la *ADP- glucosa- pirofosforilasa* y, por lo tanto, en la biosíntesis del almidón y el metabolismo de los carbohidratos (Tiessen et al., 2003; Jossier et al., 2009). Además, la qinasa *SnRK* está implicada en la señalización de ABA y en la fosforilación directa de varias enzimas, tales como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa fosfato sintasa, nitrato reductasa y *trehalosa 6-fosfato sintasa*. La *HMG-CoA* reductasa es una enzima clave en la ruta del mevalonato de la biosíntesis de isoprenoides. En *M. truncatula*, una *HMG-CoA* reductasa interactúa con la quinasa receptor-like kinase *DMI2* y es esencial para la señalización de los FN y la nodulación temprana (Kevei et al., 2007). Además, la señalización de ABA afecta la señalización de los FN, el desarrollo de nódulos y la fijación de nitrógeno. Por lo tanto, *SnRK* puede afectar la señalización de los FN a través de la ruta de isoprenoides o la ruta de señalización de ABA. Según nuestro conocimiento, hasta el momento no se han reportado evidencias experimentales directas sobre la función de *SnRK* en la simbiosis. En los procesos simbióticos, el único reporte hasta la fecha es el descrito por Van Ness et al., (2016) en la simbiosis rizobia-leguminosa. Estos autores mostraron que dentro de la primera hora existe un aumento en el estado de fosforilación de *SnRK* después del tratamiento con NF en las raíces de *M. truncatula* de tipo salvaje. En este trabajo, el papel potencial del promotor del gen *SnRK3* de *P. vulgaris* durante la simbiosis establecida con *Rhizobium* se analizó mediante el estudio de la expresión de un promotor transitorio. Usando diferentes herramientas microscópicas, se encontró que el promotor del gen *PvSnRK3* está activo en hilos de infección, primordios de nódulos, nódulos jóvenes y nódulos funcionales maduros, pero no en nódulos senescentes.

7.1 Regulación del promotor del gen *SnRK3* por factores de transcripción relacionados con la simbiosis

El análisis del elemento regulador en *cis* en el promotor del gen *PvSnRK3* de *Phaseolus* sugirió que desempeña un papel en la regulación de las respuestas a estrés biótico y en el crecimiento y desarrollo de las plantas. En el presente estudio *in silico*, se predijeron tres tipos de elementos en *cis* sensibles a hormonas en el promotor del gen *PvSnRK3*, que incluyen elementos sensibles a auxinas, giberelinas y ABA. Por otro lado, los estudios *in vivo* del análisis del promotor *prSnRK3::GUS* muestran la expresión de *GUS* en las etapas tempranas de la infección por rizobios, en la división de células del nódulo primordio y en los nódulos maduros. Sin embargo, el papel de las hormonas vegetales en la simbiosis de leguminosas y rizobios ha sido bien caracterizado (Liu et al., 2018). Las auxinas regulan el desarrollo de los nódulos mediante la modulación de la división celular y los genes relacionados al ciclo celular en *L. japonicas* y *M. truncatula* (Suzaki et al., 2012; Breakspear et al., 2014). Además, se ha encontrado que la hormona ABA coordina el factor *nod* y la señalización de citoquinina en *M. truncatula* durante la nodulación (Ding et al., 2008). También se sabe que el ácido giberélico desempeña un papel fundamental durante la infección de rizobios y el desarrollo de nódulos (Lievens et al., 2005; Ferguson et al., 2005; Ferguson et al., 2011; Libault et al., 2010; Hayashi et al., 2012; Middleton et al., 2012). Aparte de las hormonas, el promotor del gen *SnRK3* también contiene otros elementos reguladores *cis* como *AP2*, *C2H2*, *HD-ZIP*, *MYC-RELATED* y *NAC*. En estudios previos se ha reportado que *AP2* participa en el desarrollo de los hilos de infección en la simbiosis de leguminosas con *Rhizobium* (Yano et al., 2017), *C2H2* (Sinharoy et al., 2013), *HD-ZIP* y *MYC-RELATED* (Boualem et al., 2008) están involucrados en la diferenciación del simbiosoma durante el desarrollo del nódulo.

El presente estudio también revela el elemento regulatorio en *cis* llamado *NAC* en el promotor del gen *PvSnRK3*. El elemento regulatorio *NAC* se mostró en asociación con la senescencia del nódulo (De Zélicourt et al., 2012). En el análisis *in vivo*, se observa una disminución de la expresión de *GUS* en los nódulos senescentes, lo que indica una regulación negativa de la expresión del gen *SnRK3*. Por lo tanto, el promotor del gen *SnRK3* revela varios elementos reguladores en *cis* específicos de la simbiosis rizobial y que corresponden con la etapa específica de desarrollo de nódulos en el frijol.

7.2 Activación del promotor del gen *PvSnRK3* durante las etapas tempranas de la simbiosis con *Rhizobium*

La comunicación entre la bacteria con la planta es fundamental para que la simbiosis se lleve a cabo de forma exitosa. Durante el reconocimiento entre ambos organismos, se encienden y apagan varios genes para permitir a la bacteria entrar a la raíz (Oldroyd & Downie, 2008). La zona donde ocurre este primer

reconocimiento en la zona de elongación de la raíz (Gage, 2004), donde se concentran los pelos radicales, los cuales, reconocen los factores NOD liberados por la bacteria para que comience la infección. En este trabajo, los resultados mostraron que existe un incremento en la actividad del promotor del gen *PvSnRK3* en la zona de elongación de la raíz a los 3 días después de haber inoculado con *Rhizobium*. La expresión observada del promotor del gen *PvSnRK3* sugiere que tiene un papel importante para que se lleve a cabo la relación simbiótica.

Para que tenga lugar la simbiosis, los rizobios ingresan al pelo radicular de la raíz a través de su punta, donde comienzan a formarse hilos de infección. Los hilos de infección actúan como conductos para los rizobios y facilitan su progresión hacia el nódulo primordio, donde las bacterias finalmente se liberan en las células huésped mediante un proceso similar a la endocitosis (Gage, 2002), lo que hace que el nódulo primordio se diferencie en un nódulo. Dentro del nódulo, los rizobios se multiplican y se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno. Las observaciones realizadas con el microscopio mostraron una fuerte actividad promotora del gen *PvSnRK3* en la bolsa de la infección, hilos de infección de las células ciliadas de la raíz del frijol. Esto indica que posiblemente la quinasa *SnRK* juegue un papel importante durante el proceso de infección de *Rhizobium* en el frijol. Estas observaciones fueron respaldadas por un trabajo reciente sobre la quinasa *SnRK* (Van Ness et al., 2016). La fosforilación de esta proteína aumentó significativamente durante el tratamiento con el factor nod en las raíces de *M. truncatula* de tipo salvaje (Van Ness et al., 2016), lo que sugiere un aumento de la expresión y actividad de la transcripción durante la simbiosis.

Además, también se ha observado la actividad del promotor del gen *PvSnRK3* en la división de células corticales, primordios y nódulos jóvenes. Curiosamente, la intensidad de la expresión del gen *PvSnRK3::GUS* aumentó a medida que avanzaba el desarrollo del nódulo. Este aumento en la actividad del promotor fue compatible con el aumento de la expresión de la transcripción de *SnRK3* (verificada por RT-qPCR en trabajos anteriores) en raíces de frijol de tipo salvaje a los 7 dpi. Junto con todos los argumentos anteriores, se infiere que la quinasa *SnRK3* puede tener un papel crucial en la formación de los primordios de los nódulos y el desarrollo de nódulos en el frijol.

7.3 Promotor del gen *PvSnRK3* está altamente activo en nódulos funcionales pero ausente en nódulos senescentes

En *Arabidopsis*, se ha reportado que la quinasa *SnRK1* está involucrada en la señalización del azúcar (Jossier et al., 2009). La quinasa *SnRK* directamente fosforila las enzimas del metabolismo de la sacarosa, como la sacarosa fosfato sintasa y la *trehalosa 6-fosfato sintasa* (Tiessen et al., 2003; Jossier

et al., 2009). En nódulos maduros y funcionales, se espera que la demanda de energía (sacarosa) sea mayor para dar soporte a las bacterias fijadoras de nitrógeno (Kavroulakis et al., 2000). Como resultado, varios genes de señalización del azúcar se activan en nódulos funcionales. Reportes recientes muestran que la regulación negativa de *PvTRE1* mejora la biomasa de nódulos y el número de bacteroides en el frijol común (Barraza et al., 2016). El gen de la *trehalosa 6-fosfato sintasa* clase II (*PvTPS9*) también desempeña un papel clave en la modulación del metabolismo de la trehalosa en los nódulos simbióticos del frijol (Barraza et al., 2016). En este estudio, se observa que el promotor del gen *PvSnRK3* está activo en los haces vasculares, células no infectadas y células infectadas de los nódulos maduros (21 dpi). La expresión es muy fuerte en los simbiosomas que contienen células (es decir, células infectadas). Este aumento de la actividad del promotor fue compatible con el aumento la expresión de la transcripción del gen *SnRK3* (verificada por RT-qPCR en trabajos anteriores) en raíces de frijol de tipo salvaje a 21 dpi. Por lo tanto, se asume que el gen *PvSnRK3* puede funcionar en procesos de metabolización de sacarosa o trehalosa en los nódulos. Sin embargo, se necesita más evidencia experimental para demostrar la hipótesis propuesta. Curiosamente, el promotor del gen *PvSnRK3* está completamente ausente en los nódulos senescentes, específicamente en las células no infectadas e infectadas del nódulo central, lo que indica el papel del gen *PvSnRK3* en el establecimiento, desarrollo y funcionamiento de los nódulos, pero no en los nódulos senescentes.

8. Conclusiones

En las plantas, la familia *SnRK* desempeña un papel central en la señalización del azúcar, la señalización ABA y también regula directamente varias enzimas, como la *HMG-CoA* reductasa, sacarosa fosfato sintasa, nitrato reductasa y trehalosa-fosfato sintasa (Kevei et al., 2007). En las leguminosas, el desarrollo de nódulos requiere alta energía (sacarosa), por lo que varios genes de señalización de azúcar se activan en nódulos funcionales. Sin embargo, en leguminosas, la función de los genes de la familia *SnRK* en la simbiosis de nódulos ha sido poco estudiada. Aquí, el papel del promotor del gen *SnRK3* de *P. vulgaris* en la simbiosis establecida con *Rhizobium* se analizó mediante estudios de expresión de promotores transitorios. Primero, se aisló y clonó el promotor del gen *SnRK3* de *P. vulgaris* en fusión con el gen reportero *GUS* (*prSnRK3::GUS*). Para analizar la expresión espacio-temporal de la actividad del promotor, se generaron plantas compuestas con el sistema de inducción de hairy roots con *A. rhizogenes* y se observó por tinción histoquímica con *GUS* los patrones de expresión en distintas etapas del establecimiento de la simbiosis.

Después de 3 días posteriores a la inoculación con *Rhizobium tropici*, se observa un aumento de la expresión del promotor *prSnRK3::GUS* en las raíces transgénicas y los pelos radiculares. La actividad del

gen *PvSnRK3* esta presente en las bolsas de infección y en los hilos de infección. En los primordios de los nódulos (5 dpi) se observa una expresión débil del promotor *prSnRK3::GUS*, mientras que en los nódulos de 7 a 21 dpi se observa una fuerte expresión de *GUS*. El análisis RT-qPCR de raíces de tipo salvaje de 7 y 21 dpi muestra un patrón similar de niveles de transcripción aumentados de *SnRK3*. Las secciones de los nódulos muestran que la expresión del promotor *prSnRK3::GUS* está presente en las células corticales externas, las células no infectadas y las células infectadas. Curiosamente, en los nódulos senescentes, la expresión del promotor se suprime por completo. En base a los hallazgos anteriores, se llega a la conclusión de que el gen *PvSnRK3* se expresa débilmente en las etapas iniciales (como las células ciliadas infectadas y los primordios de nódulos), fuertemente en nódulos funcionales maduros (21 dpi) y ausentes durante la senescencia de los nódulos. Esto indica que el gen *SnRK3* podría jugar un papel importante durante el desarrollo y la función de los nódulos de *P. vulgaris*.

9. Productos generados

9.1 Artículos publicados

1. Kalpana Nanjareddy, Manoj-Kumar Arthikala, Alma-Leticia Aguirre, **Brenda-Mariana Gómez**, Miguel Lara (2017). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in common bean. *Journal of Visualized Experiments* (130), e56140. [doi:10.3791/56140](https://doi.org/10.3791/56140)
2. Kalpana Nanjareddy, Manoj-Kumar Arthikala, **Brenda-Mariana Gómez**, Lourdes Blanco, Miguel Lara (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>
3. Kalpana Nanjareddy, Manoj-Kumar Arthikala, **Brenda-Mariana Gómez**, Lourdes Blanco, Miguel Lara (2017). Induction of root symbioses in common bean. *protocols.io*. dx.doi.org/10.17504/protocols.io.h83b9yn

9.2 Congreso

1. **Brenda Mariana Gómez Ramírez**, Alma Leticia Aguirre Alcala, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco, Miguel Lara, Manoj-Kumar Arthikala (2015). Comparative transcriptomics of common bean reveals a conserved genetic program between arbuscular mycorrhizal and rhizobial symbioses. *XVI National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & IX Symposium Mexico/USA*, Queretaro, Mexico, 7 - 11 December 2015. P81.
2. **Brenda-Mariana Gómez**, Kalpana Nanjareddy, Miguel Lara, Manoj-Kumar Arthikala (2016). Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the common bean nutrient transporter families. *XXXI Congreso Nacional de Bioquímica*, Aguascalientes, Mexico, 6 - 11 November 2016. SB-14; P 13.

10. Bibliografía

- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., ... Halford, N. G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(19), 8602–8605.
- Aragao, F. J. L., Vianna, G. R., Albino, M., & Rech, E. L. (2002). Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science*, *42*(4), 1298–1302.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938.
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in plant science*, *13*(9), 474-482.
- Barraza, A., Estrada-Navarrete, G., Rodriguez-Alegria, M. E., Lopez-Munguia, A., Merino, E., Quinto, C., & Sanchez, F. (2013). Down-regulation of PvTRE1 enhances nodule biomass and bacteroid number in the common bean. *New Phytologist*, *197*(1), 194-206.
- Barraza, A., Contreras-Cubas, C., Estrada-Navarrete, G., Reyes, J. L., Juárez-Verdayes, M. A., Avonce, N., ... & Sanchez, F. (2016). The Class II Trehalose 6-phosphate Synthase Gene PvTPS9 Modulates Trehalose Metabolism in Phaseolus vulgaris Nodules. *Frontiers in plant science*, *7*, 1589.
- Barraza, A., Coss-Navarrete, E. L., Vizuet-de-Rueda, J. C., Martínez-Aguilar, K., Hernández-Chávez, J. L., Ordaz-Ortiz, J. J., ... & Alvarez-Venegas, R. (2018). Down-regulation of PvTRX1h increases nodule number and affects auxin, starch, and metabolic fingerprints in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, *274*, 45-58.
- Beebe, S., Gonzalez, A. V., & Rengifo, J. (2000). Research on trace minerals in the common bean. *Food and Nutrition Bulletin*, *21*(4), 387-391.
- Belin, C., De Franco, P. O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J. M., Vavasseur, A., ... & Thomine, S. (2006). Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant physiology*, *141*(4), 1316-1327.
- Blair, M. W., González, L. F., Kimani, P. M., & Butare, L. (2010). Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(2), 237-248.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., & Barker, D. G. (2001). Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(6), 695–700.

- Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combiér, J.-P., ... Frugier, F. (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 54(5), 876–887.
- Boundsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Lauriere, C. (2004). Identification of nine sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 41758-41766.
- Boudsocq, M., Droillard, M. J., Barbier-Brygoo, H., & Laurière, C. (2007). Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant molecular biology*, 63(4), 491-503.
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., ... & Downie, J. A. (2014). The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection. *The Plant Cell*, tpc-114.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Bucher, P. (1990). Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *Journal of Molecular Biology*, 212(4), 563–578.
- Cárdenas, L., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., Sánchez, F., Holdaway-Clarke, T., Hepler, P. K., & Quinto, C. (1999). Rhizobium Nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs. *The Plant Journal*, 19(3), 347-352.
- Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., & Quinto, C. (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *The Plant Journal*, 56(5), 802-813.
- Cárdenas, L., Holdaway-Clarke, T. L., Sánchez, F., Quinto, C., Feijó, J. A., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2000). Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant Physiology*, 123(2), 443-452
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 202-207
- Chaves-Sanjuan, A., Sanchez-Barrena, M. J., Gonzalez-Rubio, J. M., Moreno, M., Ragel, P., Jimenez, M., ... & Albert, A. (2014). Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), E4532-E4541.

- Cheon, C.-I., Lee, N.-G., Siddique, A. B., Bal, A. K., & Verma, D. P. S. (1993). Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *The EMBO Journal*, 12(11), 4125.
- Christey, M. C. (2001). Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 687-700.
- Christou, P. (1997). Biotechnology applied to grain legumes. *Field Crops Research*, 53(1–3), 83–97.
- Chun, J., Li, F. S., Ma, Y., Wang, S. H., & Chen, F. (2014). Cloning and characterization of a SnRK2 gene from *Jatropha curcas* L. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 10958-10975.
- Coello, P., Hey, S. J., & Halford, N. G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 883–893.
- Danisman, S. (2016). TCP Transcription Factors at the Interface between Environmental Challenges and the Plant's Growth Responses. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- De la Rosa, C., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2019). A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant, cell & environment*, 42(1), 133-144.
- De Ruijter, N. C., Bisseling, T., & Emons, A. M. C. (1999). Rhizobium Nod factors induce an increase in sub-apical fine bundles of actin filaments in *Vicia sativa* root hairs within minutes. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(9), 829-832.
- de Velde, W., Mergeay, J., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2003). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Sesbania rostrata*. *Plant Science*, 165(6), 1281–1288.
- De Zélicourt, A., Diet, A., Marion, J., Laffont, C., Ariel, F., Moison, M., ... Frugier, F. (2012). Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *The Plant Journal*, 70(2), 220–230.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
- Dhanapal, A.P., & Govindaraj, M. (2015). Unlimited Thirst for Genome Sequencing, Data Interpretation, and Database Usage in Genomic Era: The Road towards Fast-Track Crop Plant Improvement. *Genetics Research International*. 684321.

- Díaz, C. L., Spaink, H. P., & Kijne, J. W. (2000). Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(3), 268-276.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J. F., ... & Oldroyd, G. E. (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 20(10), 2681-2695.
- Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., ... & Robaglia, C. (2016). The Arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in plant science*, 7, 1611.
- Duangkhet, M., Thepsukhon, A., Widyastuti, R., Santosa, D. A., Tajima, S., Nomura, M., & others. (2016). A MYB-related transcription factor affects nodule formation in *Lotus japonicus*. *Plant Biotechnology*, 33(3), 187–194.
- Ehrhardt, D. W., & Atkinson, E. M. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 256(5059), 998-1000.
- Ehrhardt, D. W., Wais, R., & Long, S. R. (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, 85(5), 673-681.
- Elhiti, M., & Stasolla, C. (2009). Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 4(2), 86–88.
- Emanuelle, S., Doblin, M. S., Stapleton, D. I., Bacic, A., & Gooley, P. R. (2016). Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1. *Trends in Plant Science*, 21(4), 341–353.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... others. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1385–1393.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.-E., Guillén, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., ... Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2(7), 1819–1824.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *FAOSTAT statistics database*. Obtenido de <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>
- Felle, H. H., Kondorosi, É., Kondorosi, A., & Schultze, M. (1996). Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *The Plant Journal*, 10(2), 295-301.

- Ferguson, B. J., Foo, E., Ross, J. J., & Reid, J. B. (2011). Relationship between gibberellin, ethylene and nodulation in *Pisum sativum*. *New Phytologist*, *189*(3), 829-842.
- Ferguson, B. J., Ross, J. J., & Reid, J. B. (2005). Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*, *138*(4), 2396-2405.
- Franklin, C. I., Trieu, T. N., Cassidy, B. G., Dixon, R. A., & Nelson, R. S. (1993). Genetic transformation of green bean callus via *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Plant Cell Reports*, *12*(2), 74–79.
- Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. *SIDA, Botanical Miscellany*.
- Frühling, M., Schröder, G., Hohnjec, N., Pühler, A., Perlick, A. M., & Küster, H. (2000). The promoter of the *Vicia faba* L. gene *VfEnod12* encoding an early nodulin is active in cortical cells and nodule primordia of transgenic hairy roots of *Vicia hirsuta* as well as in the prefixing zone II of mature transgenic *V. hirsuta* root nodules. *Plant Science*, *160*(1), 67-75.
- Fujii, H., & Zhu, J. K. (2009). Arabidopsis mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(20), 8380-8385.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., ... & Kobayashi, M. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *50*(12), 2123-2132.
- Gage, D. J. (2002). Analysis of infection thread development using Gfp-and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, *184*(24), 7042-7046.
- 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.
- Geurts, R., & Bisseling, T. (2002). Rhizobium Nod factor perception and signalling. *The Plant Cell*, *14*(suppl 1), S239-S249.
- Gómez, BM., Aguirre AL., Nanjareddy, K., Blanco L., Lara, M., & Arthikala MK. (2015, Diciembre). Comparative transcriptomics of common bean reveals a conserved genetic program between arbuscular mycorrhizal and rhizobial symbioses. XVI National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology & IX Symposium Mexico/USA, Querétaro, México.

- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., ... others. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186.
- Grant, J. E., Dommissie, E. M., Christey, M. C., & Conner, A. J. (1991). Gene transfer to plants using *Agrobacterium*. *Advanced Methods in Plant Breeding and Biotechnology*, 73.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.-P., Gong, D., Halfter, U., & Zhu, J.-K. (2002). A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 3(2), 233–244.
- Halford, N. G. (2005). Regulation of carbon and amino acid metabolism: Roles of sucrose nonfermenting-1-related protein kinase-1 and general control nonderepressible-2-related protein kinase. *Advances in botanical research*, 43, 93-142.
- Halford, N. G., & Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochemical Journal*, 419(2), 247 LP-259.
- Hayashi, S., Reid, D. E., Lorenc, M. T., Stiller, J., Edwards, D., Gresshoff, P. M., & Ferguson, B. J. (2012). Transient Nod factor-dependent gene expression in the nodulation-competent zone of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) roots. *Plant biotechnology journal*, 10(8), 995-1010.
- Hecker, A., Brand, L. H., Peter, S., Simoncello, N., Kilian, J., Harter, K., ... Wanke, D. (2015). The *Arabidopsis* GAGA-Binding Factor BASIC PENTACYSSTEINE6 Recruits the POLYCOMB-REPRESSIVE COMPLEX1 Component LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 to GAGA DNA Motifs. *Plant Physiology*, 168(3), 1013–1024.
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience*. 13, 2408-2420.
- Hernandez-Garcia, C.M., & Finer, J.J. (2014). Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*. 217-218, 109-119.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A. B., Downie, J. A., & Oldroyd, G. E. (2009). GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 21(2), 545-557.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Phaseolus vulgaris*—Recalcitrant potential. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1205–1215.
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., ... others. (2003). The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132(2), 666–680.

- Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4), 387–405.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., & Li, X. (2013). The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant*, 6(2), 275-286.
- Jiang, R., & Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular and cellular biology*, 17(4), 2099-2106.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1040—D1045.
- Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., ... & Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 59(2), 316-328.
- Kavroulakis, N., Flietakis, E., Aivalakis, G., & Katinakis, P. (2000). Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Molecular plant-microbe interactions*, 13(1), 14-22.
- Kevei, Z., Lounon, G., Mergaert, P., Horváth, G. V., Kereszt, A., Jayaraman, D., ... & Kondorosi, A. (2007). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 19(12), 3974-3989.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y., & Hattori, T. (2004). Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1--related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *The Plant Cell*, 16(5), 1163–1177.
- Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., & Kudla, J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134(1), 43–58.
- Kudla, J., Xu, Q., Harter, K., Grissem, W., & Luan, S. (1999). Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4718–4723.
- Lee, N.-G., Stein, B., Suzuki, H., & Verma, D. P. S. (1993). Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *The Plant Journal*, 3(4), 599–606.

- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., de Peer, Y., ... Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 325–327.
- Li, L.-B., Zhang, Y.-R., Liu, K.-C., Ni, Z.-F., Fang, Z.-J., Sun, Q.-X., & Gao, J.-W. (2010). Identification and bioinformatics analysis of SnRK2 and CIPK family genes in sorghum. *Agricultural Sciences in China*, *9*(1), 19–30.
- Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R. J., Bilgin, D. D., ... & Stacey, G. (2010). Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant physiology*, *152*(2), 541-552.
- Lievens, S., Goormachtig, S., Den Herder, J., Capoen, W., Mathis, R., Hedden, P., & Holsters, M. (2005). Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology*, *139*(3), 1366-1379.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S., & Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3730–3734.
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., & Wang, E. (2018). Hormone modulation of legume–rhizobial symbiosis. *Journal of integrative plant biology*, *60*(8), 632-648.
- Luan, S. (2009). The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, *14*(1), 37–42.
- Lugtenberg, B. J. J. (1989). Root lectin as a determinant of host–plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, *338*, 13.
- Mao, X., Zhang, H., Tian, S., Chang, X., & Jing, R. (2009). TaSnRK2. 4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, *61*(3), 683-696.
- Mariotti, D., Fontana, G. S., & Santini, L. (1989). Genetic transformation of grain legumes: *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. *J Genet Breed*, *43*, 77–82.
- McKibbin, R. S., Muttucumar, N., Paul, M. J., Powers, S. J., Burrell, M. M., Coates, S., ... & Halford, N. G. (2006). Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant biotechnology journal*, *4*(4), 409-418.
- Middleton, A. M., Úbeda-Tomás, S., Griffiths, J., Holman, T., Hedden, P., Thomas, S. G., ... & Owen, M. R. (2012). Mathematical modeling elucidates the role of transcriptional feedback in gibberellin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*, 7571–7576.

- Mitchell, K. I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., ... & Kemp, B. E. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2361-2364.
- Montiel, J., Nava, N., Cárdenas, L., Sánchez-López, R., Arthikala, M. K., Santana, O., ... & Quinto, C. (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by Rhizobia. *Plant and Cell Physiology*, 53(10), 1751-1767.
- Mortier, V., Holsters, M., & Goormachtig, S. (2012). Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 245-258.
- Murray, J. D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(6), 631-639.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Gómez, B. M., Blanco, L., & Lara, M. (2017a). Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PloS one*, 12(8), e0182328.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Aguirre, A. L., Gómez, B. M., & Lara, M. (2017b). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in the common bean. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (130), e56140.
- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M. K., Alvarado-Affantranger, X., Quinto, C., Sánchez, F., & Lara, M. (2016). A legume TOR protein kinase regulates rhizobium symbiosis and is essential for infection and nodule development. *Plant physiology*, 172(3), 2002-2020.
- Narlikar, L., & Ovcharenko, I. (2009). Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 8(4), 215-230.
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519-546.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1983). Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Molecular and General Genetics MGG*, 190(2), 204-214.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A., & Tempé, J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(2), 245-250.

- Petry, N., Boy, E., Wirth, J., & Hurrell, R. (2015). The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, *7*(2), 1144-1173.
- Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., ... & Grima-Pettenati, J. (2016). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant biotechnology journal*, *14*(6), 1381-1393.
- 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.
- Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., dos Santos, R. C., de Albuquerque Melo Filho, P., & de Lima, L. M. (2014). Plant promoters: an approach of structure and function. *Molecular Biotechnology*, *56*(1), 38-49.
- Purcell, P. C., Smith, A. M., & Halford, N. G. (1998). Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *The Plant Journal*, *14*(2), 195-202.
- Quandt, H. J., Pühler, A., & Broer, I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, *6*(6), 699-706.
- Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., Jez, J. M., & Schachtman, D. P. (2007). Phosphoproteomic identification of targets of the Arabidopsis sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2. 8 reveals a connection to metabolic processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(15), 6460-6465.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). *Atlas Agroalimentario 2012-2018*. Obtenido de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018.
- Singh, S. P. (1999). Integrated genetic improvement. *Common bean improvement in the twenty-first century* (pp. 133-165). Dordrecht: Springer.
- Sinharoy, S., Torres-Jerez, I., Bandyopadhyay, K., Kereszt, A., Pislariu, C. I., Nakashima, J., ... Udvardi, M. K. (2013). The C2H2 transcription factor regulator of symbiosome differentiation represses transcription of the secretory pathway gene VAMP721a and promotes symbiosome development in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, *25*(9), 3584-3601.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology*, *13*(3), 273-278.

- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debellé, F., Gough, C., Bisseling, T., & Geurts, R. (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, *308*(5729), 1789-1791.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., ... & Vymyslický, T. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34*(1-3), 43-104.
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, *27*(1), 29–43.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R.-J., Chiurazzi, M., & Gresshoff, P. M. (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, *48*(7), 1357–1365.
- Suzaki, T., Yano, K., Ito, M., Umehara, Y., Suganuma, N., & Kawaguchi, M. (2012). Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in *Lotus japonicus* is accompanied by auxin response. *Development*, *139*(21), 3997-4006.
- Szabados, L., Ratet, P., Grunenber, B., & De Bruijn, F. J. (1990). Functional analysis of the *Sesbania rostrata* leghemoglobin *glb3* gene 5'-upstream region in transgenic *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum* plants. *The Plant Cell*, *2*(10), 973-986.
- Tepfer, D. (1990). Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum*, *79*(1), 140–146.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G., & Geigenberger, P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal*, *35*(4), 490-500..
- Tomé, F., Nägele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Illorca, C., Nukarinen, E., ... & Tomar, M. (2014). The low energy signaling network. *Frontiers in plant science*, *5*, 353.
- ThermoFisher Scientific (2019). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/gateway-cloning/entry-clones.html>.
- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2004). SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17306–17311.

- Van Ness, L. K., Jayaraman, D., Maeda, J., Barrett-Wilt, G. A., Sussman, M. R., & Ané, J. M. (2016). Mass spectrometric-based selected reaction monitoring of protein phosphorylation during symbiotic signaling in the model legume, *Medicago truncatula*. *PLoS one*, *11*(5), e0155460.
- Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *43*(5), 383-403.
- Wang, L., Hu, W., Sun, J., Liang, X., Yang, X., Wei, S., ... & He, G. (2015). Genome-wide analysis of SnRK gene family in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of BdSnRK2. *9. Plant Science*, *237*, 33-45.
- Wang, Z., Cheng, K., Wan, L., Yan, L., Jiang, H., Liu, S., ... Liao, B. (2015a). Genome-wide analysis of the basic leucine zipper (bZIP) transcription factor gene family in six legume genomes. *BMC Genomics*, *16*(1), 1053.
- Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E., & Schell, J. (1982). DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Molecular and General Genetics MGG*, *186*(1), 16-22.
- Yano, K., Aoki, S., Liu, M., Umehara, Y., Suganuma, N., Iwasaki, W., ... & Kawaguchi, M. (2017). Function and evolution of a *Lotus japonicus* AP2/ERF family transcription factor that is required for development of infection threads. *Dna Research*, *24*(2), 193-203.
- Ying, S., Zhang, D. F., Li, H. Y., Liu, Y. H., Shi, Y. S., Song, Y. C., ... & Li, Y. (2011). Cloning and characterization of a maize SnRK2 protein kinase gene confers enhanced salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, *30*(9), 1683-1699.
- Young, E. T., Dombek, K. M., Tachibana, C., & Ideker, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(28), 26146-26158.
- Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J. D., Seddon, A. E., Jin, R., Thomashow, M. F., & Shiu, S. H. (2011). Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(36), 14992-14997.

11. Anexos

11.1 Figuras Anexo

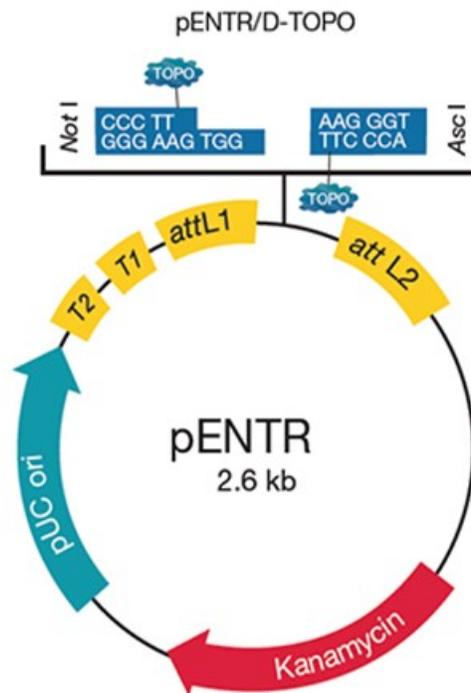


Figura A1. Mapa del vector pENTR para clonación TOPO direccional (ThermoFisher Scientific, 2019).

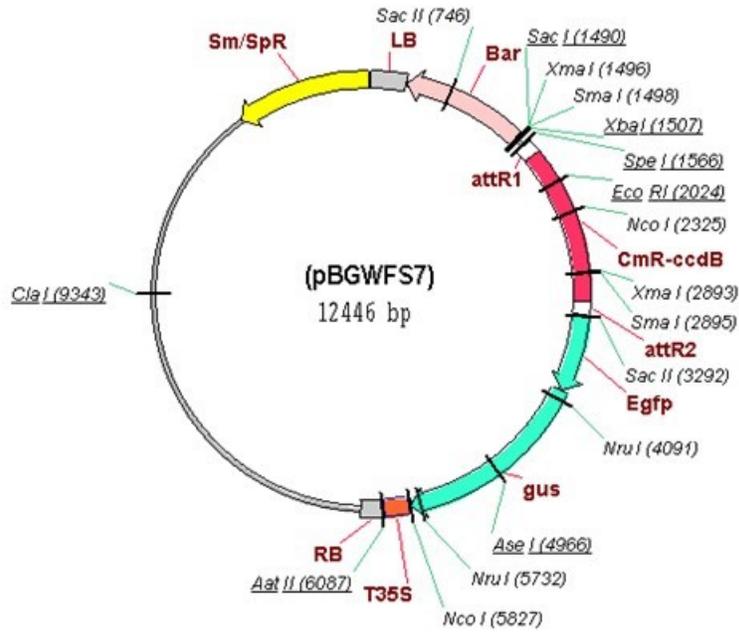


Figura A2. Mapa del vector pBGWFS7.0 para la expresión espacio-temporal del promotor.

>PhvuI.007G279600 | Chr07:39911492..39913103 forward

TTAAACTTAATTAATAAAATTATGAAAATTAATAATTTTAAATAGAAAACAAATATTTTTTAATAAATTGAATAATTAT
 CAGAAAATTGTATTCACTCTCCTAGGTTTTCTTAAATGATATTCATATACCAGTATAACTTTGAGATATTCCTATAA
 ATTTTAGGTTTCTATTTAACTATGATGTTAATTATCACCTTCTCCCAATAATTGATTTATATAAAGTGACTGATTTTGA
 TTTTGAAAACCTTGTGACACATCAGAACTATATCAATTATTGGAATTTGTGGCTCTCTGCATTTACTCATTTCAAATT
 CCAACCATGCTAATAGATGGTTTAGCATGTTCTTCTCTTTAAGCTAAAAATATTACAAACCTCAATGAATGATGCA
 TATGTATATCAAAGTTTTGAAAATGATTGGCAGAATGAAAATAACAAGACAAAAAACTTAACATTAATGAATTATA
 GATGATAGTGAGAAGAAGACGAAAATAAAGAGAAGAGACACTAATACACAACCTGAACACATATATATTAGTATTAA
 TGTGAGGGTAATAAGATTTTCAGAGGATTAATAATAAGATTTTTTTGAATGATGTAATAATGATTTGATGATGATGAA
 AATACAATGATGGCATGAAATGAATTTAATAATTCAATTTTATAAAATTAATCTTTAATTTTATTGATAGTATTATTAA
 AGTGAAGACACATAAATAAAAGTAGGTTACCTAGATTTTTGTAACTGGCATTATGGGAGTATAAGAAAAACAA
 AAAATGAATGGTTTTTTAGGAAATTATAGAACCACTCTCTGAATGAAGGTTGGTGAAGACAATTAACCTACACAC
 AGTGGTGAGGTGGGGTGATGCACATGATGATGTACATGATGATGACCTACAAATTCATGACACCTCATCACATAC
 CATACCATGCATGCTACTCATTTCATTTTCTCCTTCTCTGAAAATACAATTTGTTTTTTTTTAAATTGGAAATATAAT
 ATTCTTGAGTTTGACTGTTGAAAGTAGGAAGAGAAAAGAGAAAGTAAACACTTGGATCTGTTGGTGGAAATTAGATG
 AAAACCAAATTAAGTGCAAGTTCGTATCATTGACTAGGTTTTTTTTTATGACTCCACTTCAATTTTCTAACAACCTC
 ACAAGAGTCATTTATAAATTTGTTTAAAGGCTGATTTAGTAATTTTGTAAAAGTATGGTTTATAGAAATGAATTTA
 ATTTCTTAAAAATTAATAAATTTTATGAATAAAGTAATTGATGAATGAAGTTGTGGATCCCAATGAATTTGAAAAA
 CCAATAGTCACAGGCAACACAAAAGGAAATGAAAATGGAAAATGGAAAATGTGAGAGAAAAGAAATTGTGTGAGATA
 TTTTTGTTAGTTGCCTAAAGAATGATAATGGGTATTGACTTTAGAAGGGGACATGTTATATGTGATGTGATGAAACT

TGTATTCAAATACTTACTCCAACCTCAAATTATATACACTATTCTATATCCTCCTATTCTACTCTTTCTACTCATTAC
 ATAACATAACAAAATCAAATACAATTATACTACTTTATCAATAAAACACTAAACACACATTAACCTTTATTAACACAAT
 ATTATTTTTATATATTTTTTATTTACTAACCTTCTAAAATAGGATAATTTGTCCTATATCTCTTTAGTGTGATTTAATAT
 TGATTTTTTTTATCAACACAAAATCATTTGATACATTTTTCTATATGATTCAATATTTAACTAAAACCTAAAATCTCATC
 AAATCTCTAATTTAATAATCACATTAATAATACCATTCACTCATTAGTATCTTTTTAATTGTTACTAACACAACATAAATA
 TATATATATATACTTTATTCCAAATTACACTTTTTCCATAAATAAATCATTCTCAATATCTTTTTTTTGTATCCCA
 ACAAATAAAGTTTGAGAGAATTAATGTAACTTTAATTAACCTCTTTAATTTGTA **TTTGGTTTTGTTATTTGGATCAA**
AAGGCAAGGGCAGAATGGGAATGAGGAAAAAGAAAAAATTGTATATAAAGAGAAGCACAGTCTGTGACCGTTG
GTTGGCGTGGTGATTCATTCCACAACGATGGAAGCGTCTCCGCCACCACGCACCATCTCGGCAGGTACCAGC
 TCACGCGCTTCCTTGCCGCGGCAACTTCGCCAAAGTGTACCAGGCGCGCTCCCTCGTAGACGGCGCCACGCT
 CGCCGTCAAGGCCATCGACAAGTCCAAGACGGTGCAGCGCCGATGGAGCCCCGCATCGTGCGCGAGATCGAC
 GCCATGCGCCGCTCCAGAACCACCAACATCTCAAATCCACGAGGTCCTCGCCACAAAGACCAAAATCTA
 CCTCGTCTGACTACGCCGGCGGAGGCGAGCTCTTCTCCAAGCTCTCCCTGCGCGGCCGCTCCCGGAGTCC
 CTGGCGGGCGCTACTTCTCCAGCTCGTCTCCGCGCTCCTCTTCTGCCACCGCCACGGCATCGCGCACCGTG
 ACCTCAAGCCGCGAAGCTCTCTAGACGCCGCGGCGACCTAAGTTTCCGACTTCGGCTCTCCGCGCTC
 CCGGAGCACCTCCGCGATGACCTCTCCACACCGCTGCGGCACGCCGCTTCACTGCGCCGAGATCCTAC
 GCCGCGTCCGCTACGACGGCTCCAAGGCCGACGCGTGGTCTGCGGTGTCATTCTTACAACCTTCTTGCCGG
 CCACCTCCCCTTCGACGACTCGAACATTCCGGCCATGTGCCGGCGAATCTCCCGCCGCGACTACCAGTTCCCGG
 AGTGATATCGAAATCTGCGCGCAGCCTCATCTACCAATTGCTGGACCCTAACCTAAATCGCGAATTTCACTGG
 AAAGAGTTTTCGATTGCAGATGGTTGAGGAATAAGAAAGCGGTTGCTGTAACGTGTTGGAGGAGAGTGTATTGG
 AGTCTGATTTGTATAACAAGTGTGCGACGGTTACAAATTGGGGATGAACGCATTTGACATAATATCGATGTCGTC
 GGGGTTGGACTTGCAGGACTGTTTCGAGACGACGTCGGAGAAGGGGAGGCGGAGGGAGAAGAGTTTCAGTTC
 GGAGAAGAGCGTGGGAACGGTGAAGCGAAGGTTAAGGAGGTTGGGAGAGGTTAGGGTTTAGGATTGAAGTT
 GGAAGAACGGTGAATTGGGTTGGGAAAGGGGAAAGTGGGTTTGGTGGTTGAGGTGTTTGGAGATTGTGTCTGA
 CTTGCTCCTTGTCTCAGTTAAAGTTGTTGATGGTGCCGTTGACTTTGACCTTCTTATTGGGATGATTGGAGACTT
 GGCTTCAAGATCTTGTCTCTCATGGCATCACAGTGAATGAATAGAGTAACCTTTTCATTTTCATTTTTCTTACT
TTGTGCATATCATTACCAGCTTTTGTGTTAAGTTATTACTCTTAATAAACTCATTTTTCTTATCAACCACACACT
TCACACCCCTATGCTTTCACATCCTTATGCTTTCCTTACTTTTCTACTGAATTTGAGGGGTTAGTGTGTTTGTATT
AGGTTAAATAGAATGAAAACCTGTAGAG

 Promoter	 Oligos	 5'UTR
 TATA box	 CDS	 3'UTR

Figura A3. Secuencia genómica del gen *PvSnRK3*. La secuencia se aisló del Phytozome v12.1. La secuencia anterior incluye la región promotora, 5'UTR, gen y 3'UTR.

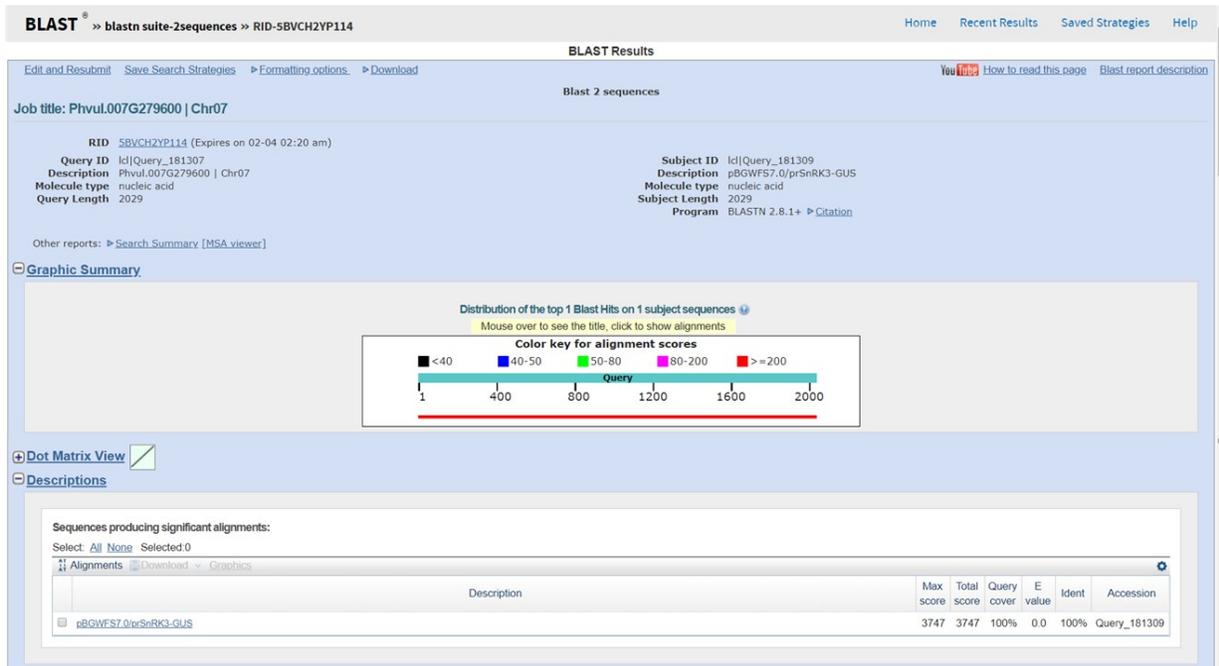


Figura A4. Los resultados de alineación de la secuencia de pBGWFS7.0/prSnRK3::GUS y Phvul.007G279600. El plásmido pBGWFS7.0/prSnRK3::GUS positivo fue secuenciado utilizando la tecnología Sanger y fue alineado con la secuencia promotora original utilizando la herramienta en línea <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. La secuencia se encontró con una identidad del 100%. Secuencia de ADN genómico de SnRK3.

11.2 Tablas Anexo

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

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

Tabla A2. Composición del buffer GUS X-gluc.

Componente	Volumen total (10ml)	Molaridad final
K_2HPO_4	0.615 ml	100 mM
KHPO_4	0.385 ml	100 mM
EDTA	200 μl	10 mM
Triton X	10 μl	0.1%
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	50 μl	0.5 mM
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	50 μl	0.5 mM

X-gluc	100 μ l	1 mM
H ₂ O destilada	8.59 ml	-