



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**COMPRENDER EL PAPEL DE SNRK1 EN LA ASOCIACIÓN
SIMBIÓTICA EN *PHASEOLUS VULGARIS***

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

Carolina Cervera Torres

TUTORA:

Dra. Kalpana Nanjareddy

ASESOR:

Dr. ManojKumar Arthikala





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mis padres por apoyarme siempre, por no dejarme caer en los malos momentos y por impulsarme para seguir adelante. Sé que no ha sido un camino fácil, les ha costado mucho trabajo y esfuerzo, por eso y más les agradezco profundamente. También quiero agradecer a mis hermanos, por apoyarme en los momentos que más lo necesité, tanto en el ámbito académico como en el personal, son mis más grandes amigos y consejeros.

Por otro lado, quiero agradecer a la Dra. Kalpana Nanjareddy y al Dr. Manojkumar Arthikala, por ser mis guías durante este proyecto, por siempre motivarme a superarme y a aprender más a lo largo de la carrera. Gracias por darme la oportunidad de aprender de ustedes, de su experiencia y por permitirme ser parte de este gran equipo. Agradezco también a mi equipo de trabajo a Salma, a Gabriel y a Elsa por apoyarme siempre en el laboratorio. Agradezco a mis compañeros y amigos, así como a mis profesores de la carrera por inspirarme día con día, por ser tan buenas personas y por sus enseñanzas.

De manera muy especial quiero agradecer a Ricardo Cruz por su apoyo incondicional, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por ser siempre tan comprensivo y paciente durante todo el proceso de mi carrera. Gracias por ser el motor de mi vida y acompañarme siempre. Te amo.

Finalmente, agradezco a las becas de investigación PAPIIT por proporcionarme una beca del proyecto IN211218 de la Dra. Kalpana Nanjareddy. Además, agradezco a CONACyT por apoyar mi investigación con el proyecto CF-MI-20191017134234199/316538 del Dr. Manojkumar Arthikala.

Contenido	página
Agradecimientos.....	2
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 <i>Phaseolus vulgaris</i>	7
1.2 Simbiosis en frijol común	8
1.2.1 <i>Rhizobium</i>	8
1.2.2 Micorriza arbuscular.....	10
1.3 La familia SnRK.....	13
1.3.1 Subfamilia SnRK1.....	13
1.3.2 Subfamilia SnRK2.....	14
1.3.3 Subfamilia SnRK3.....	15
1.4 Ácido abscísico (ABA).....	16
1.4.1 SnRK1-ABA.....	17
1.5 Glucosa.....	17
1.5.1 SnRK1-glucosa.....	17
1.6 Tecnología Gateway.....	18
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. Hipótesis.....	19
4. Justificación.....	19
4.1 SnRK1 y la regulación del carbono.....	19
4.2 SnRK1-ABA.....	20
4.3 SnRK1-glucosa.....	20
5. Metodología.....	21
5.1 Análisis bioinformático de la familia de genes SnRK en <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
5.1.1 Identificación y alineamiento de SnRKs.....	21
5.1.2 Árbol filogenético de la familia de genes SnRK1.....	22
5.1.3 Identificación de motivos conservados y análisis de la estructura exón-intron de los genes PvSnRK	22
5.1.4 Análisis <i>In Silico</i> de los perfiles de expresión	

	de los miembros de la familia SnRK en distintos tejidos y los patrones de expresión en raíces noduladas y micorrizadas.....	22
5.2	Clonación del promotor de PvSnRK1.....	22
5.2.1	Amplificación del fragmento del promotor de SnRK1	22
5.2.2	Introducción del fragmento al vector pENTR/D-TOPO	23
5.2.3	Transformación de <i>E.coli</i> top10 con el vector pENTR.....	23
5.2.4	Miniprep y PCR del plásmido pENTR de las colonias de <i>E.coli</i> Top10.....	23
5.2.5	PCR del plásmido pENTR con los oligos M13.....	23
5.2.6	Introducción del fragmento al vector final pBGWSF7.0.....	24
5.2.7	Transformación de <i>E.coli</i> con el vector pBGWSF7.0.....	24
5.2.8	Miniprep y PCR del plasmido pBGWSF7.0 de las colonias de <i>E.coli</i> Top10.....	24
5.2.9	Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	24
5.2.10	Miniprep y PCR del plásmido pBGWSF7.0 de las colonias de <i>A. rhizogenes</i>	24
5.3	Fenotipado de la sobreexpresión de PvSnRK1 en <i>Phaseolus vulgaris</i>	25
5.3.1	Generación de raíces transgénicas en frijol común con la construcción PvSnRK1-OX en <i>A. rhizogenes</i>	25
5.3.2	Inoculación de las plantas transgénicas con <i>Rhizobium tropici</i> y micorriza arbuscular.....	26
5.3.3	Fenotipado de la simbiosis de frijol común y <i>R. tropici</i>	26
5.3.4	Fenotipado de la simbiosis de frijol común con micorriza arbuscular...	26
5.3.5	Extracción de ARN total de raíces transformadas.....	27
5.3.6	RT-PCR del ARN total.....	27
5.3.7	PCR semicuantitativa.....	27
5.4	Análisis de promotor.....	28
5.4.1	Tinción de GUS.....	28
5.4.2	Tratamientos de ABA y glucosa.....	29
6.	Resultados.....	29
6.1	Identificación y análisis bioinformático de la familia de genes del SNF1-related protein kinase (SnRK) en <i>Phaseolus vulgaris</i>	29
6.1.1	Identificación y alineamiento de SnRKs.....	29

6.1.2	Árbol filogenético de la familia de genes SnRK1.....	30
6.1.3	Análisis <i>In Silico</i> de los perfiles de expresión de los miembros de la familia SnRK en distintos tejidos y los patrones de expresión en raíces noduladas y micorrizadas.....	32
6.1.4	Identificación de motivos conservados y análisis de la estructura exón-intron de los genes PvSnRK.....	35
6.2	Clonación del promotor de PvSnRK1.....	38
6.2.1	Amplificación de fragmento del promotor de SnRK1	39
6.2.2	Introducción del fragmento al vector PENTR.....	39
6.2.3	Introducción del fragmento al vector pBGWSF7.0.....	40
6.2.4	PCR del plásmido pBGWSF7.0 de las colonias de <i>A. Rhizogenes</i>	42
6.3	Fenotipado de la sobreexpresión de PvSnRK1 en <i>Phaseolus vulgaris</i>	43
6.3.1	Fenotipo de la raíz.....	43
6.3.2	Fenotipado de la simbiosis de frijol común y <i>R. tropici</i>	44
6.3.3	Fenotipado de la simbiosis de frijol común y micorriza arbuscular.....	47
6.3.4	PCR semicuantitativo de raíces transgénicas de plantas control y de sobreexpresión de PvSnRK1	49
6.4	Análisis de promotor.....	51
6.4.1	simbiosis de <i>Rhizobium</i>	51
6.4.2	Simbiosis con Micorriza arbuscular.....	52
6.4.3	Tratamientos de glucosa y ABA.....	53
6.5	Localización de las proteínas de SnRK1.....	55
7.	Discusión	56
7.1	Análisis bioinformático.....	56
7.2	Fenotipado de la simbiosis <i>R. tropici</i> y plantas de frijol que sobreexpresan el gen PvSnRK1.....	57
7.3	Fenotipado de la simbiosis de frijol común y micorriza arbuscular.....	57
7.4	Análisis del promotor del gen PvSnRK1.....	58
8.	Conclusiones.....	58
9.	Bibliografía.....	60
10.	Anexos.....	72

Resumen

En la presente investigación se ha identificado y clasificado los miembros de la familia de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris*. Se realizó un análisis bioinformático para corroborar que la clasificación de las subfamilias SnRK1, SnRK2 y SnRK3 fue correcta y conocer los perfiles de expresión en diferentes tejidos, así como durante la simbiosis con *Rhizobium* y micorriza. También, se caracterizó la expresión espacio-temporal del gen SnRK1 (Phvul.008G039400) en raíces de *P. vulgaris*, durante la simbiosis con *Rhizobium* y una micorriza arbuscular. Así como, de la presencia de diferentes concentraciones de ABA y glucosa. Esto a base del gen reportero GUS. Finalmente, se caracterizó la sobreexpresión del gen SnRK1 en plantas de *P. vulgaris* durante la simbiosis con *Rhizobium* y micorriza. Al estudiar esta sobreexpresión se pudo confirmar que el gen SnRK1 juega un papel importante para el desarrollo de la simbiosis en frijol común, mejorándola significativamente.

1. Introducción

La población mundial llegará a 9.7 billones de personas en 2050, según el departamento de asuntos económicos y sociales de las Naciones Unidas y se enfrentará a desafíos mundiales, entre los que se encuentran lograr la seguridad alimentaria, reducir el riesgo de cambio climático al reducir la liberación de gases de efecto invernadero a la atmósfera y satisfacer la demanda creciente de energía (Redden et al., 2015 y United Nations, 2015). Las legumbres que se utilizan para la alimentación y los sistemas de producción que incluyen leguminosas desempeñan un papel importante en las medidas diseñadas para contrarrestar esta problemática mundial (Voisin et al., 2014). A nivel alimenticio, tanto para consumo humano como animal, son una fuente importante de proteínas vegetales; también son de gran importancia nivel del sistema de producción, debido a la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, lo que los hace potencialmente muy adecuados para su uso en sistemas de cultivo de bajos insumos, y debido a su papel en la mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero, entre otras cosas (Lemke et al., 2007).

Las legumbres juegan un papel clave en manejo integrado de la fertilidad del suelo debido a su capacidad para fijar el N₂ atmosférico en simbiosis con rizobia; suministran recursos orgánicos y pueden contrarrestar otras limitaciones al mejorar la absorción de fertilizantes, la supresión de malezas, entre otros beneficios (Sanginga et al., 2003). Además, entre las numerosas microfloras útiles del suelo, las micorrizas arbusculares son los organismos más importantes que forman simbiosis con la mayoría de las plantas, incluidas las leguminosas que crecen en suelos deficientes en fósforo e influyen en el desarrollo de la comunidad vegetal, la absorción de nutrientes, las relaciones con el agua y la superficie productiva (Barea & Azcon-Aguilar, 1983 y van der Heijden et al., 2008). Las micorrizas arbusculares también actúan como bioprotectores y protegen a las plantas de patógenos y tensiones tóxicas (van der Heijden et al., 2008).

Siendo tan importante estos dos tipos de simbiosis en las leguminosas, es de gran importancia el análisis de los mecanismos implicados en la regulación de estas simbiosis, principalmente a nivel molecular. Una de las formas de hacerlo es en base a la búsqueda de genes o conjuntos de genes que participen o mejoren esta simbiosis, ya sea desde la planta o desde los microorganismos. La información obtenida de estos análisis puede ser de gran relevancia, pues a base de ella se puede trabajar en el mejoramiento de la simbiosis mutualista.

1.1 *Phaseolus vulgaris*

Dentro del grupo de las leguminosas que poseen semillas comestibles, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa a una de las más importantes. Actualmente, su cultivo se encuentra distribuido en los cinco

continentes y representa la legumbre más importante en la dieta humana, al proporcionar proteínas y carbohidratos; especialmente se distribuye en América Latina, el Caribe y África (Rodiño et al., 2010). Este cultivo presenta muchas limitaciones, como son las deficiencias o toxicidades de los minerales en los suelos. Estas limitaciones en las regiones comunes de producción de frijol se presentan en todo el mundo. Para superar las deficiencias y toxicidades minerales, los productores de frijol común deben usar productos que reviertan los daños al cultivo mediante el uso de productos químicos como los fertilizantes (Eardly et al., 1995).

1.2 Simbiosis en frijol común

La simbiosis de algunas plantas como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y algunos microorganismos como los hongos micorrízicos, y las bacterias del género *Rhizobium* son de gran importancia en la actualidad, para mejorar la productividad, la defensa contra patógenos, así como la resistencia a distintos estreses. Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) forman una simbiosis mutualista con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres. Los MA ayudan a las plantas a adquirir fósforo (P) y otros micronutrientes del suelo. También juegan un papel importante en la adquisición de nitrógeno (N) tanto en forma orgánica como inorgánica. Las legumbres tienen una capacidad única para adquirir N atmosférico al entrar en una endosimbiosis con bacterias fijadoras de N₂ (Nanjareddy et al., 2014). Las plantas en cambio le proporcionan fuentes de carbono a estos hongos y bacterias. El uso de biofertilizantes elaborados con MA o *Rhizobium* proporcionan una alternativa para evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos, de esta manera se puede mejorar la calidad de los cultivos de frijol y reducir el impacto ambiental de los fertilizantes químicos (Koltai & Kapulnik, 2010).

1.2.1 *Rhizobium*

Rhizobium tropici de la cepa CIAT899 es un microsimbionte de frijol común (*P. vulgaris* L) en suelos ácidos tropicales. Las características principales, de la amplia variedad de rango de hospederos incluyen su alta tolerancia al estrés ambiental, como la alta temperatura, la acidez y la salinidad (Martínez-Romero et al., 1991 y Hungria et al., 2000)

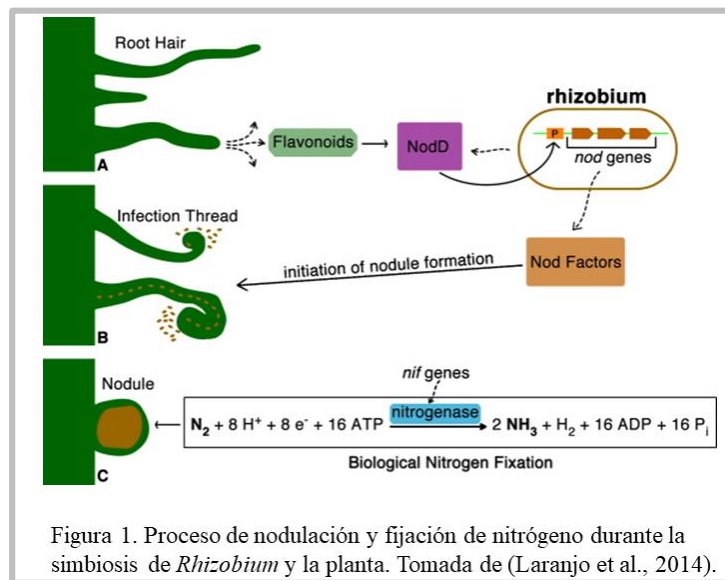
El establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y sus leguminosas huésped específicas involucra eventos altamente complejos que culminan en la formación de nódulos y en el establecimiento del proceso de fijación de nitrógeno. La nodulación requiere un diálogo molecular entre las bacterias y las plantas huésped (del Cerro et al., 2016). Durante la simbiosis con las plantas, los rizobios viven en nódulos radicales especializados compuestos de tejido vegetal, donde fijan el nitrógeno atmosférico (N₂) a cambio de aporte de carbono y aminoácidos de sus plantas hospederas (Fred et al., 2002 y Lodwig et al., 2003).

Existen genes de gran importancia para el desarrollo de la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas. La simbiosis entre los rizobios y sus leguminosas huésped se inicia mediante un diálogo molecular complejo en el que se da la activación de las proteínas o factores de Nodulación (NF) bacterianas por los flavonoides vegetales. Los NF, son oligosacáridos de lipoquitina que funcionan como moléculas de señal y que cuando son reconocidas por los receptores de las plantas, inician el proceso simbiótico, participando activamente en la regulación de la organogénesis de los nódulos (Ferguson & Mathesius, 2003 y del Cerro et al., 2019). Los NF pueden ser reconocidos por los receptores de oligosacáridos de quitina de la planta (Stacey & Shibuya, 1997). Si la combinación es correcta, el rizobio ingresa a la célula del vello de la raíz o a una célula epitelial. Después, si hay infección, se produce el rizado del vello de la raíz o el agrietamiento lateral de la raíz, el rizobio se multiplica dentro del hilo de la infección progresando extracelularmente dentro de la corteza (Crespi & Galvez, 2000; Stougaard, 2001 y Kistner & Parniske, 2002). Cuando el hilo de infección llega a una célula en la corteza en desarrollo, los rizobios son absorbidos por endocitosis en los endosomas. En este momento, la célula pasa por varias rondas de mitosis sin citocinesis, por lo que la célula se vuelve poliploide. Las células de la corteza comienzan a dividirse rápidamente formando un nódulo. Esta organogénesis del nódulo comienza antes como respuesta a los NF y continúa durante la progresión del hilo de infección. Cada nódulo se conecta por el xilema y el floema al sistema vascular de la planta (Fernández-Pascual et al., 2007).

Después, el rizobio puede pasar por un período de multiplicación rápida dentro del nódulo. Los simbiosomas se forman cuando los rizobios se liberan del hilo de infección a las células infectadas de la corteza de la raíz. Esto ocurre por endocitosis de la membrana del hilo de infección y resulta en la encapsulación de la bacteria en la membrana de una célula. Sólo unas pocas bacterias infectan una célula cortical, y después de la endocitosis, el rizobio prolifera, lo que da como resultado que el citoplasma de las células infectadas maduras se llene de simbiosomas (Drevon et al., 2015). En general, los nódulos radicales efectivos son grandes y tienen un color rosado en contraste con los nódulos radicales ineficaces, que permanecen pequeños y con un color blanco (Drevon et al., 2015). La fijación de N_2 comienza entre 10 y 21 días después de la infección y los nódulos se producen a los 9 días después de la siembra (Sattelmacher et al., 1998).

Los genes Nod se encuentran bien caracterizados y son de gran importancia para la simbiosis de con las plantas (Figura 1). Recientemente, se han identificado nuevos genes que participan en el proceso de simbiosis, por ejemplo, el gen *NrcR*, que es un homólogo de la proteína *NolR*. *NolR* es un factor de transcripción represor que determina la expresión del gen *NodD*. Se observó que las mutantes del *Rhizobium* de la cepa CIAT 899 en el gen *NrcR*, mostraron un retraso en la nodulación y una reducción de la competitividad con *P. vulgaris*, además de una reducción en el número y peso seco de los nódulos. También, la mutante exhibió una capacidad reducida para inducir el gen *nodC* en comparación con el CIAT 899 de tipo salvaje (del Cerro et al., 2016).

Por su parte, en plantas también se han identificado genes de gran importancia para la simbiosis con *Rhizobium*. Se ha visto que al utilizar un enfoque de silenciamiento de interferencia de ARN (ARNi) del gen *BYPASS1* (*BPS1*) en *P. vulgaris* durante el desarrollo del primordio del nódulo, la infección con *Rhizobium* en las raíces transgénicas *PvBPS1-RNAi* no logró inducir divisiones de células corticales sin afectar el rizado del pelo de raíz inducido por el rizobio y la formación de hilos de infección. *BPS1* funciona como un regulador negativo, que se requiere para evitar la producción excesiva de la molécula de señalización móvil. (Arthikala et al., 2018). En otro estudio, la supresión de las transcripciones del blanco de la rapamicina (*TOR*, por sus siglas en inglés *Target of rapamycin*), también afectó la progresión del hilo de infección y las divisiones de células corticales asociadas, lo que resultó en una reducción drástica de los números de nódulos. *TOR-RNAi* resultó en una reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y ciclina D1 (*CyclinD1*) y la expresión de ciclina D3 (*CyclinD3*), que son factores cruciales para la progresión del hilo de infección y la organogénesis del nódulo. Sugiriendo que *TOR* juega un papel vital en el establecimiento de la simbiosis del nódulo de raíz en el frijol común (Nanjareddy et al., 2016).



1.2.2 Micorriza arbuscular

Los hongos micorrízicos arbusculares (MA) se asocian con la mayoría de las plantas terrestres (85%) y facilitan la absorción de nutrientes del suelo, y la planta recibe nutrientes minerales del hongo y a cambio proporciona al hongo carbono fijo. Este intercambio de nutrientes tiene lugar a través de estructuras fúngicas altamente ramificadas llamadas arbusculos que se forman en las células corticales de la raíz del huésped (Luginbuehl & Oldroyd, 2017). En esta asociación, los hongos

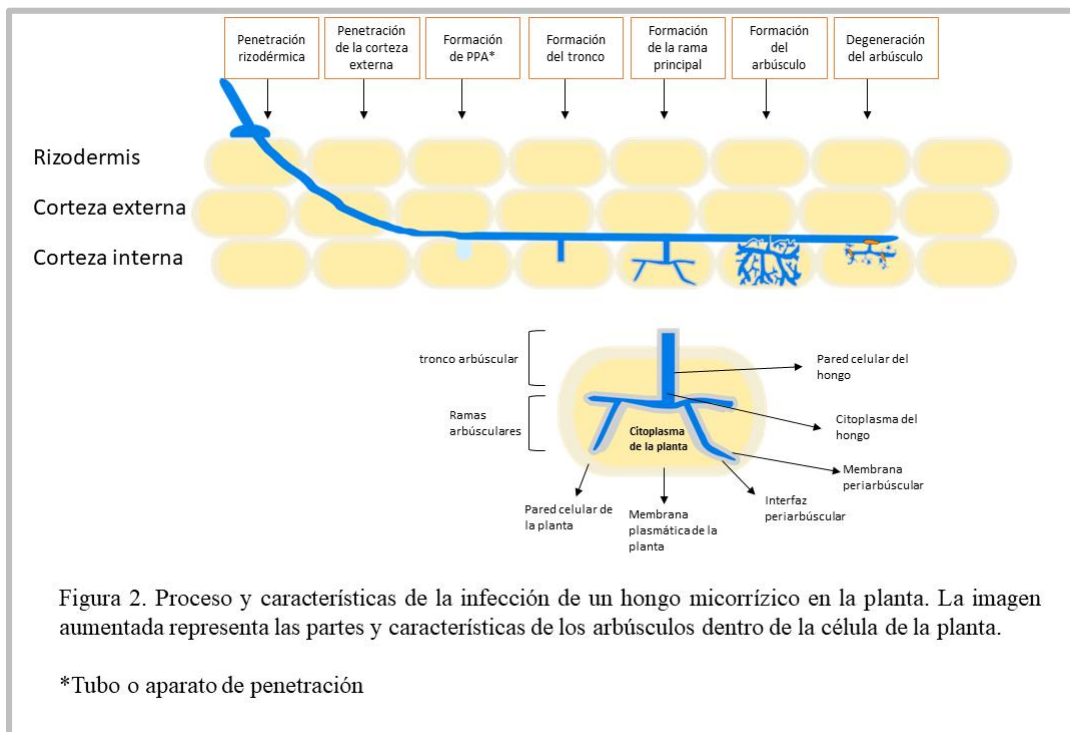
biotróficos obligados reciben carbono fijado por la planta y a cambio proporcionan un mejor acceso a los nutrientes en el suelo, particularmente a los fosfatos (Smith & Smith, 2011).

Los hongos MA existen en el suelo como esporas, y después de la germinación, el tubo germinal de la hifa crece a través del suelo en busca de una raíz huésped. Una vez que se establece el contacto entre los simbiositos, el hongo forma un apresorio en la superficie de la raíz a través del cual ingresa a la raíz. El patrón de crecimiento dentro de la raíz varía según las especies involucradas (Dickson, 2004). Se ha identificado que hay una liberación de exudados tanto de la planta huésped como del organismo simbiote. En el caso del huésped, las estringolactonas son los principales exudados de la raíz, actuando como potentes estimulantes del metabolismo fúngico y ramificación fina hifal otro de los principales exudados de las raíces son las N-acetilglucosamina (GlcNAc, por sus siglas en inglés) (Akiyama et al., 2005). La comunicación química con microbios con frecuencia involucra señales de oligosacáridos. Los hongos MA secretan al menos dos tipos de oligosacáridos, micorrizico-lipochitooligosacáridos (Myc-LCO) y quitooligosacáridos de cadena corta (CO), como, quitotetraosa (CO₄) y quitopentaosa (CO₅) (Genre et al., 2013 y Maillet et al., 2011). La percepción de los oligosacáridos de GlcNAc está mediada en la superficie celular de la planta por quinasas similares a receptores (RLK, por sus siglas en inglés) que contienen motivos de lisina (LysM) en su dominio extracelular que son capaces de unirse a GlcNAc (Zipfel & Oldroyd, 2017). Después del reconocimiento recíproco en la rizósfera, las hifas fúngicas de MA forman estructuras de fijación en forma de pie, llamadas hipopodia, en la superficie de la epidermis de la raíz (Choi et al., 2018). Las plantas hospedadoras participan activamente en la acomodación de MA creando una estructura de infección intracelular en forma de tubo llamada aparato de prepenetración (PPA, por sus siglas en inglés, prepenetration apparatus), que requiere la reorganización celular y la expresión génica específica de la simbiosis (Balestrini et al., 1992; Genre et al., 2008; Genre et al., 2005 y Pumplín & Harrison, 2009). El PPA se forma como una membrana plasmática apoyada por una extensa red de retículo endoplásmico (RE) y material del citoesqueleto. Una vez que se produce el PPA, se ablanda la pared celular de la planta en el sitio de contacto, esto permite que las hifas fúngicas de AM se expandan en el túnel apoplástico (Parniske, 2000).

Después, al llegar a la corteza interna, los hongos MA desarrollan estructuras de alimentación altamente ramificadas, en forma de árbol, los arbusculos. Una sola hifa fúngica progresa hacia el PPA de la célula de la corteza interna antes de extenderse dicotómicamente. Concomitante con el desarrollo de estructuras fúngicas intracelulares, la célula de la planta huésped envuelve al hongo en crecimiento con la membrana periarbuscular (PAM), que es continua con la membrana celular (Choi et al., 2018). Mediante la ramificación dicotómica continua, el arbusculo se diferencia aún más para desarrollar ramas finas de orden superior hasta que finalmente llene la célula cortical. El tamaño de la vacuola de la planta se reduce para acomodar el arbusculo en crecimiento, y el retículo endoplásmico, el peroxisoma, el aparato de Golgi, el núcleo y los plastidios están densamente

compactados dentro del citoplasma (Pumplin & Harrison, 2009). El PAM envuelve toda la estructura fúngica, creando así un área de superficie de membrana grande y una interfaz periarbuscular (PAI) para el intercambio de nutrientes y señales entre los dos organismos. Sorprendentemente, a pesar de los esfuerzos celulares monumentales para producir y acomodar arbusculos, son estructuras efímeras con una vida útil de unos pocos días, caracterizándose por la formación de septos (Figura 2). Tras el establecimiento exitoso de las simbiosis de MA, el hongo produce vesículas de almacenamiento de lípidos, que son lóbulos irregulares de paredes gruesas que se forman intraradicalmente dentro o entre las células huésped por la mayoría de los órdenes de hongos micorrizicos (Choi et al., 2018).

Recientemente se han identificado genes que se encuentran involucrados en la simbiosis de MA con leguminosas. Aunque, no es muy amplia la información de este tipo en *P. vulgaris*, especies modelo de leguminosas como *Medicago truncatula* se han utilizado para identificar genes de gran importancia en esta simbiosis. Tal es el caso del gen MtRbohE que se activa en las células arbusculadas y participa en la colonización de la corteza de la raíz. Este gen corresponde a una oxidasa de NADPH de plantas, conocidas como homólogos de estallidos respiratorios de oxidasa (RBOH) (Belmondo et al., 2016). En otro estudio reciente se reportó que la expresión heteróloga de MtSWEET1b en un mutante de transporte de hexosa de levadura mostró que transporta principalmente glucosa. La sobreexpresión de MtSWEET1b en las raíces de *M. truncatula* promovió el crecimiento de micelio intraradical durante la simbiosis de MA (An et al., 2019).



1.3 La familia SnRK

En los eucariotas, las proteínas quinasas dependientes de calcio (CDPK por sus siglas en inglés, Calcium-dependent protein kinase) y la mayoría de las quinasas relacionadas con sacarosa no fermentadoras (SnRK por sus siglas en inglés, SNF1-related kinase) participan en la regulación y generación de las señales de Ca^{2+} (Assmann & Wang, 2001). Además, las proteínas SnRK se consideran como el interruptor clave en la señalización del azúcar de las plantas, el estrés, la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas (Alderson et al., 1991). Las proteínas SnRK son homólogas a las proteínas de la sacarosa no fermentadora 1 (SNF1 por sus siglas en inglés, sucrose-nonfermenting 1) de levadura y proteína quinasa activada por AMP (AMPK por sus siglas en inglés, AMP-activated protein kinase) de mamíferos, estos tres tipos de familias de proteínas pertenecen a la superfamilia de proteínas quinasas llamada SNF1. La primera familia de proteínas de esta superfamilia se encontró en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, la familia se nombró SNF1, de ahí viene el nombre de toda la superfamilia que engloba también a las familias AMPK y SnRK de mamíferos y humanos respectivamente (Alderson et al., 1991).

Para el grupo de SnRK en plantas se reconocieron tres subgrupos: SnRK1, SnRK2 y SnRK3 (Harmon et al., 2001). El subgrupo SnRK1 es el más conservado de toda la familia y es el grupo homólogo y por lo tanto más parecido a la familia AMPK de mamíferos y SNF1 de levadura. La primera planta en la que se descubrió SnRK1 fue el centeno (*Secale cereale* L.) (Alderson et al., 1991). Después de descubrirse en centeno, algunos miembros de la subfamilia SnRK1 se han encontrado en una gran variedad de plantas modelo y algunos cultivos importantes, como *Arabidopsis thaliana*, cebada (*Hordeum vulgare*), papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), remolacha (*Beta vulgaris*), entre otras. Pero puede existir en todas las especies de plantas (Halford et al., 2003).

1.3.1 subfamilia SnRK1

SnRK1 es el complejo conocido como el sensor de energía de las plantas pues activa la producción de energía (catabolismo) y reprime el consumo de energía (anabolismo) cuando el carbono y la energía son limitados (Ramon et al., 2019). SnRK1 funciona como un complejo heterómero con una subunidad catalítica α y las subunidades reguladoras (β , γ) (Crozet et al., 2014). KIN10 (SNRK1.1) es responsable de la mayor parte de la actividad del complejo SnRK1 (Jossier et al., 2009).

En las plantas, los azúcares son de gran importancia para el crecimiento y desarrollo, así como también para la señalización. Por esta razón, es de gran importancia su producción, distribución y almacenamiento. Sin embargo, la distribución de azúcar se vuelve muy importante en situaciones

de estrés, cuando la producción de ATP a través de la fotosíntesis y/o la respiración puede verse comprometida, limitando gravemente el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos (De Block & Van Lijsebettens, 2011). La asignación adecuada de nutrientes durante el desarrollo normal y ante los desafíos ambientales no se conoce bien pero recientemente ha aumentado la evidencia de que las proteínas SnRK1 están implicadas en la regulación de estos procesos. De manera similar a SNF1 y AMPK, SnRK1 se activa cuando los niveles de energía disminuyen, lo que desencadena grandes cambios metabólicos y transcripcionales que promueven la tolerancia al estrés y la supervivencia (Baena-González et al., 2007 y Baena-Gonzalez & Sheen, 2008). Además de la participación de las SnRK1 en los procesos de balance de energía, resistencia al estrés, metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas también se ha reportado su participación en procesos como la percepción de hormonas (Song et al., 2019).

Se ha reportado que la sobreexpresión de la subunidad SnRK1 α es suficiente para conferir una actividad de SnRK1 alta y específica en células de hoja y de plantas transgénicas (Baena-González et al., 2007). El complejo SnRK1 en lugar de activarse por un déficit energético como AMPK y SNF1, se reprime en condiciones de abundancia de energía. Esto tiene mucho sentido y es probablemente más confiable para organismos sésiles y autótrofos, que necesitan hacer frente a grandes e inesperadas fluctuaciones en el suministro de carbono y energía. Curiosamente, las plantas parecen preferir de forma más general la regulación negativa, como lo ilustran las numerosas vías de señalización hormonal que hacen uso de inactivación y eliminación de proteínas represoras, aparentemente esto permite una respuesta más rápida de las plantas (Muraro et al., 2013).

Varias líneas de evidencia indican también una interacción estrecha entre SnRK1 y SnRK2 y la señalización de ABA. Consistentemente, la sobreexpresión de SnRK1 confiere un fenotipo hipersensible a ABA (Jossier et al., 2009). Se informó que SnRK1 fosforila los TF bZIP del grupo A, que participan en la señalización de ABA y controlan la maduración y germinación de las semillas, *in vitro* (Jossier et al., 2009). Río arriba de SnRK1, las fosfatasas PP2C ABI1 y PP2CA, dos represores de señalización ABA/SnRK2 conocidos, desfosforilan el bucle T SnRK1 (Rodrigues et al., 2013).

1.3.2 Subfamilia SnRK2

Las subfamilias SnRK2 y SnRK3 son exclusivas de las plantas, estas familias son más numerosas y más diversas en comparación con la subfamilia SnRK1 (J. Wang et al., 2019). La literatura actualmente, sugiere que los miembros de las subfamilias SnRK2 y SnRK3 están involucrados en las vías de señalización que regulan las respuestas de las plantas a la limitación de nutrientes, la sequía, el frío, la sal y el estrés osmótico (Coello et al., 2011).

Las proteínas quinasas relacionadas con SNF1-2 (SnRK2) son específicas de plantas involucradas en su respuesta al estrés ambiental, como el estrés hídrico y la salinidad y en el desarrollo dependiente de ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés, abscisic acid) (Hubbard et al., 2010; Fujita et al., 2011; Kulik et al., 2012; Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2013 y Yoshida et al., 2015). La fitohormona ABA es el regulador clave de la resistencia al estrés abiótico en plantas, y coordina una red reguladora compleja que permite a las plantas hacer frente a la disminución de la disponibilidad de agua (Cutler et al., 2010 y Fujii et al., 2011). ABA también es importantes durante el desarrollo de la planta, incluido el desarrollo de embriones y semillas, y la promoción de la latencia de las semillas y el comportamiento osmótico (Finkelstein et al., 2008). Los miembros de la subfamilia SnRK2 actúan como reguladores positivos de la señalización de ABA (Ma et al., 2009). La subfamilia SnRK2 consta de 10 miembros (SnRK2.1 a 2.10) en *Arabidopsis thaliana* y 10 (SAPK1 a 10) en *Oryza sativa* (Hrabak et al., 2003).

Los SnRK2 controlan el crecimiento de las plantas y las respuestas al estrés. Durante las condiciones de estrés, el ABA se induce rápidamente y se une a los miembros de la familia de receptores PYL, que posteriormente reprimen las fosfatasa de proteína del grupo A 2Cs (PP2Cs). Al mismo tiempo, la proteína quinasa 2 relacionada con SNF1 (SnRK2) se libera de los complejos PP2C-SnRK2 y fosforila los efectores posteriores, activando las respuestas al estrés (Zhu, 2016). En contraste, los SnRK2 inhiben las vías de señalización que promueven el crecimiento bajo tensiones abióticas. Es decir, reprime la actividad del complejo TOR 1 (TORC1) en el blanco de la vía de la rapamicina (TOR) (Wang et al., 2018). Recientemente se demostró que el estrés osmótico y el tratamiento con ABA reprimen significativamente la fosforilación de S6K1, un sustrato de TORC1, en *Arabidopsis* (Wang et al., 2018), lo que indica que la señalización de ABA inhibe la vía TOR bajo condiciones de estrés. Evidencia reciente, reveló que los SnRK2 interactúan directamente con la proteína asociada a la regulación de TOR (RAPTOR, por sus siglas en inglés, regulatory-associated protein of TOR) y fosforilan la Ser897, promoviendo la disociación de TORC1 y, por lo tanto, reprimiendo la actividad de la quinasa TORC1, es decir, se activa el proceso de autofagia en las plantas, al suprimir la acción del complejo TOR, en presencia de algún estrés (Wang et al., 2018).

1.3.3 Subfamilia SnRK3

La familia SnRK3/CIPK, en conjunto con la calcineurina B (CBL, por sus siglas en inglés, calcineurin B), está involucrada principalmente en la regulación dependiente de la señalización de calcio de la señalización de estrés abiótico y la homeostasis de nutrientes e iones en plantas (Liu et al., 2000; Xu et al., 2006; Li et al., 2006; Ho et al., 2009; Steinhorst & Kudla, 2013; Edel & Kudla, 2015 y Tang et al., 2015). SnRK3 puede unirse a CBL para participar en la respuesta al estrés mediada por Ca²⁺, y se conocen como las proteínas quinasas que interactúan con la proteína similar a la

calcineurina B (CIPK). El N-terminal de CIPK tiene un dominio de quinasa conservado y el C-terminal tiene dos dominios conservados: NAF y PPI (Albrecht et al., 2001).

La subfamilia SnRK3 también responde al estrés abiótico. Por ejemplo, se observó que OsCIPK31 era sensible a la salinidad y otras condiciones estresantes durante la germinación y el crecimiento de las plántulas en arroz (Piao et al., 2010). La CIPK6 de *A. thaliana* participa en el crecimiento y el desarrollo. Además, atCIPK6 reduce el transporte de auxina y la tolerancia al estrés salino (Zhao et al., 2019). La sobreexpresión de SICIPK24 (SISOS2) mejoró la tolerancia a la sal en el tomate (Huertas et al., 2012). La expresión de AtCIPK3 aumentó la tolerancia de *A.thaliana* a varios estímulos de estrés, incluyendo altas concentraciones de sal, heridas, sequía, etc. (Kim et al., 2003) . Uno de los miembros mejor estudiados de la familia SnRK3 es SOS2, que participa en la fosforilación y activación del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática de SOS1, para regular la homeostasis de los iones en condiciones de estrés salino (Liu et al., 2000; Guo et al., 2002; Qiu et al., 2002 y Hey et al., 2009).

Al ser SnRK1 el complejo conocido como el sensor de energía de las plantas, y SnRK2 y SnRK3 reguladores de las vías de señalización que regulan las respuestas de las plantas a la limitación de nutrientes, la sequía, el frío, la sal y el estrés osmótico, los posiciona como genes potenciales para su estudio en leguminosas, principalmente en frijol. Actualmente, no hay estudios bioinformáticos que caractericen esta superfamilia SnRK en el frijol, por lo que es necesario hacerlo. Además, es muy importante analizar su participación en el proceso de simbiosis de frijol y *Rhizobium* y *Micorriza*, pues podría tener una participación importante en la planta durante la simbiosis, por eso la importancia de su caracterización.

1.4 Ácido abscísico (ABA)

El ABA es importante para distintos procesos de las plantas como la latencia de las semillas, la maduración, la germinación y el crecimiento post germinativo, la inducción floral y el alargamiento celular (Cutler et al., 2010). La función principal del ABA está en las respuestas relacionadas con el estrés, que incluyen frío, sequía, ataque de patógenos y radiación UV (Sharp & LeNoble, 2002). El ABA también afecta el potencial de almacenamiento y algunos atributos de calidad de las frutas. Su aplicación antes de la cosecha en la etapa de cambio de color, aumentó significativamente el desarrollo del color mediante el incremento de antocianinas contenidas en la fruta “Calcutti” litchi (Khan & Ali, 2018). El ABA es necesario para la tolerancia a la sequía, ya que regula el movimiento de los estomas para evitar la pérdida de agua y desencadena la expresión génica, lo que lleva a la adaptación al bajo potencial de agua a nivel celular (Umezawa et al., 2010). El ácido abscísico es un sesquiterpeno, que tiene un papel importante en el desarrollo y maduración de las semillas, en la síntesis de proteínas y osmolitos compatibles, que permiten a las plantas tolerar el estrés debido a factores ambientales o bióticos, y como un inhibidor general del crecimiento y las actividades metabólicas (Srivastava, 2002).

1.4.1 SnRK1-ABA

ABA controla la actividad de SnRK1 después de la transcripción de forma dependiente de la proteína fosfatasa de tipo 2C (PP2C) (Rodrigues et al., 2013). ABA inhibe la acción de PP2C, lo que resulta en la activación no solo de la señalización de ABA sino también de la vía SnRK1. En consecuencia, SnRK1 y ABA inducen respuestas transcripcionales superpuestas (Rodrigues et al., 2013). Ejemplos como, el silenciamiento localizado de SnRK1 en semillas de chicharos a través de su expresión en anti sentido, causa defectos en el almacenamiento, maduración y latencia de las semillas, junto con cambios transcripcionales que recuerdan la insensibilidad al ABA, mostrando la relación entre SnRK1 y ABA (Sreenivasulu et al., 2006 y Sreenivasulu et al., 2010). Por el contrario, la sobreexpresión de SnRK1 α 1 en *Arabidopsis* produce una germinación tardía y una hipersensibilidad al ABA (Jossier et al., 2009 y Tsai & Gazzarrini, 2012).

1.5 Glucosa

La glucosa es la fuente de energía más importante en el metabolismo de las plantas, los animales y muchos microorganismos. Es rica en energía y, por lo tanto, es un buen combustible; “La oxidación completa de la glucosa a dióxido de carbono y agua se produce con un cambio estándar de energía libre de -2,840 kJ/mol. Al almacenar glucosa como un polímero de alto peso molecular como el almidón o el glucógeno, una célula puede almacenar grandes cantidades de unidades de hexosa mientras mantiene una osmolaridad citosólica relativamente baja”. Cuando aumenta la demanda de energía, estos polímeros de almacenamiento intracelular pueden liberar glucosa y utilizarla para producir ATP, ya sea aeróbicamente o anaeróbicamente (Cox & Nelson, 2000).

La glucosa no sólo es un excelente combustible, también es un precursor, capaz de suministrar una gran variedad de intermediarios metabólicos para reacciones biosintéticas. En animales y plantas vasculares, la glucosa tiene cuatro destinos principales: puede ser utilizada en la síntesis de polisacáridos complejos destinados al espacio extracelular; almacenado en células (como un polisacárido o como sacarosa); oxidado a un compuesto de tres carbonos (piruvato) mediante glucólisis para proporcionar ATP e intermedios metabólicos; u oxidado a través de la ruta de las pentosas fosfato (fosfogluconato) para producir ribosa 5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH para procesos biosintéticos reductores (Cox & Nelson, 2000).

1.5.1 SnRK1-glucosa

Las funciones de SnRK1 pueden depender de la disponibilidad de carbohidratos debido a los cambios en la calidad de la luz (en los tejidos de origen) o el suministro de sacarosa (en los tejidos del sumidero) (Jossier et al., 2009). En levadura, SNF1 se activa en respuesta a bajas concentraciones de glucosa y otras tensiones y se inactiva rápidamente mediante la adición de glucosa (Hedbacker &

Carlson, 2008). En las plantas, la trehalosa-6-fosfato (T6P) ha surgido como uno de los principales reguladores de SnRK1. T6P se encuentra en pequeñas cantidades en la mayoría de las plantas, donde se considera que funciona como una molécula de señalización (Schluepmann et al., 2012). La acumulación de T6P está altamente correlacionada con los niveles de sacarosa y, por lo tanto, se ha propuesto que T6P transmite información sobre la disponibilidad de carbohidratos a otras vías de señalización (Lunn et al., 2006). El suministro de glucosa y sacarosa no fosforiladas exógenas (5–50 mM) a plántulas y hojas maduras también inhibe la actividad de SnRK1, así como lo sugieren los análisis de expresión génica (Baena-González et al., 2007).

1.6 Tecnología Gateway

Muchos enfoques experimentales utilizan construcciones con genes reporteros para ayudar a comprender la expresión y función de las proteínas. Típicamente, estas construcciones son vectores plasmídicos diseñados para expresar una proteína indicadora que indica la expresión espacio-temporal y/o la función de una proteína de interés. Una proteína indicadora puede expresarse sola bajo el control exclusivo de una secuencia de ADN reguladora de interés, o puede unirse en una fusión traduccional a una proteína de interés. Una proteína indicadora puede ser una proteína fluorescente que se puede visualizar (por ejemplo, la proteína verde fluorescente, GFP; green fluorescent protein)(Reece-Hoyes & Walhout, 2018).

La tecnología Gateway se basa en las reacciones de recombinación del sitio que media la integración y la escisión del bacteriófago λ . Estos eventos ocurren por recombinación en secuencias de unión específicas en el ADN del fago y en el cromosoma bacteriano llamado attP (del fago) y attB (de la bacteria) (Hartley et al., 2000). El clon de entrada consiste en un plásmido donde el fragmento de interés está flanqueado por secuencias attL. Una vez que se ha obtenido el clon de entrada, el fragmento de interés puede transferirse a un plásmido secundario, el vector de destino, que es el vector específico de la aplicación en el que se subclonará el ADN. Esta reacción se logra mezclando, *in vitro*, el clon de entrada (que generalmente lleva secuencias attL) con el vector de destino elegido (que lleva secuencias attR) en presencia de una combinación de proteínas de recombinación (Int, IHF y Xis), la mezcla de enzimas LR Clonase™. El producto de esta "reacción LR" es el clon de expresión, que lleva el ADN de interés y el vector donante (Katzen, 2007).

El sistema de clonación recombinante Gateway permite clonar múltiples fragmentos de ADN al mismo tiempo, utilizando las mismas enzimas (Hartley et al., 2000; Walhout et al., 2000 y Reboul et al., 2001). Esta tecnología de clonación permite la inserción simultánea de múltiples fragmentos de ADN en un único vector de destino utilizando recombinasa específica del sitio y la enzima integrasa, para producir el clon de expresión (Hartley et al., 2000). El sistema Gateway proporciona una plataforma versátil para el estudio de la expresión multigénica con la disponibilidad de elegir un conjunto de vectores de alto rendimiento y una amplia gama de marcos de lectura abiertos (Chee & Chin, 2015).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Caracterizar la función del gen SnRK1 de *Phaseolus vulgaris*, y su impacto en el establecimiento y desarrollo de la interacción simbiótica de la planta con micorriza y *Rhizobium*. Además de, analizar el nivel de expresión del gen SnRK1 en presencia de distintas concentraciones de ABA y glucosa.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar la familia de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris* mediante análisis bioinformático.
2. Analizar el fenotipo de las raíces transgénicas PvSnRK1-OX.
3. Determinar el fenotipo de la simbiosis de *Rhizobium* y micorriza arbuscular en raíces transgénicas de PvSnRK1-OX.
4. Determinar la localización espacio-temporal de la expresión del gen PvSnRK1 en las raíces de las plantas, en ausencia y en presencia de los simbiontes *Rhizobium* y micorriza.
5. Analizar la expresión del gen PvSnRK1 en raíces con tratamientos de ABA y glucosa.
6. Determinar la localización de las proteínas SnRK1

3. Hipótesis

La sobreexpresión del gen SnRK1 mejora la simbiosis de frijol con *Rhizobium* y la micorriza arbuscular, pues hay una mayor disponibilidad de carbono en la planta, provocando que haya una simbiosis más prolongada y un aumento en el número de nódulos, trayendo consigo mayores beneficios nutrimentales a la planta.

4. Justificación

4.1 SnRK1 y la regulación del carbono

SNRK1 utiliza el contenido de carbohidratos como indicador del estado de energético de la planta (Broeckx et al., 2016). Las altas concentraciones de azúcares fosforilados, incluida la trehalosa-6-fosfato (T6P), pueden indicar disponibilidad de energía e inhibir la actividad de SnRK1 para mantener la homeostasis energética (Zhang et al., 2009). De igual manera, el complejo SnRK1 puede activar factores de transcripción básicos de cremallera de leucina (bZIP) de las familias C y S, como bZIP63, en respuesta a la inanición (Mair et al.,

2015). Estos factores de transcripción se encargan de regular positivamente la expresión de genes de diversas vías catabólicas como la autofagia y la degradación de componentes de la pared celular, almidón, aminoácidos, sacarosa, lípidos y proteínas, proporcionando fuentes alternativas de energía y metabolitos (Baena-Gonzalez et al., 2007). Además de que, en estudios recientes se ha demostrado que KIN10 (SnRK1.1) en *A. thaliana* desencadena la autofagia a partir de vías dependientes o independientes del blanco de rapamicina (TOR). Las vías dependientes de TOR consisten en la fosforilación e inactivación del complejo (Soto-Burgos & Bassham, 2017). TOR es una quinasa relacionada con la fosfatidilinositol 3-quinasa que actúa como un regulador negativo de la autofagia (Noda & Ohsumi, 1998 y Liu & Bassham, 2010). De manera natural, se ha observado que hay una supresión de las proteínas SnRK1 activas cuando hay una gran presencia de carbono y energía y se activa cuando se agotan estos recursos, representando un mecanismo de adaptación de las plantas al estrés (Baena-González et al., 2007; Baena-González & Sheen, 2008 y Ramon et al., 2019).

La reducción biológica de N₂ atmosférico a amonio (fijación de nitrógeno) proporciona aproximadamente el 65% del nitrógeno disponible de la biosfera. La mayor parte de este amonio es aportado por las simbiosis leguminosas rizobianas., que se inicia por la infección de huéspedes de las leguminosas por bacterias (rizobios), lo que resulta en la formación de nódulos de raíz. Dentro de los nódulos, los rizobios se encuentran como bacteroides, que realizan la fijación de nitrógeno: para hacer ésto, obtienen fuentes de carbono y energía de la planta, en forma de ácidos dicarboxílicos (Vance, 2000 y Poole & Allaway, 2000).

De igual manera, a cambio de nutrientes minerales, las plantas transfieren el carbono fijado fotosintéticamente a hongos micorrízicos arbusculares, que son biótrofos obligados y dependen completamente de la planta para una fuente de carbono (Parniske, 2008; Ho & Trappe, 1973 y Shachar-Hill et al., 1995). Se cree que hasta el 20% de los fotosintatos de las plantas se asignan al hongo (Bago et al., 2000). La resistencia de las raíces al sumidero de carbono aumenta considerablemente con la micorrización, lo que resulta en la redirección de los fotoasimilados y una acumulación significativa de azúcares y lípidos en las raíces micorrizadas (Wright et al., 1998).

4.2 SnRK1-ABA

En *Arabidopsis*, SnRK1 fosforila y regula positivamente FUS3 que promueve la síntesis de ABA y está regulado positivamente por ABA (Ghassemian et al., 2000; Gazzarrini et al., 2004 y Tsai, 2012). Se ha visto que la aplicación de ABA a las raíces de trigo provocó una disminución dramática en la proteína SnRK1 (Yang et al., 2012 y Coello et al., 2011). También, se ha demostrado que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan SnRK1 son hipersensibles a ABA y es coherente con este modelo, ya que muestra que una combinación de ABA y "demasiada" actividad de SnRK1 podría tener un efecto nocivo en la planta (Jossier et al., 2009 y Coello et al., 2011).

4.3 SnRK1-glucosa

Estudios anteriores han demostrado que la acumulación de la quinasa SnRK1.1 en plantas 35S: SnRK1.1 conduce a un fenotipo claro de sensibilidad a la glucosa (Baena-González et al., 2007). En otro estudio se informó que la hipersensibilidad depende de la disponibilidad de glucosa, ya que no se observó diferencia en el crecimiento entre las líneas de tipo salvaje y 35S: SnRK1.1 en palatinosa o sorbitol. El aumento de la actividad SnRK1.1 en el tipo salvaje, así como en las líneas 35S:SnRK1.1 dependen de la disponibilidad de glucosa (Jossier et al., 2009).

El estudio de gen SnRK1 durante la simbiosis de *Phaseolus vulgaris* con micorriza y *Rhizobium*, es importante para la búsqueda de mecanismos que ayuden a mejorar la simbiosis y por lo tanto a mejorar el cultivo de frijol. Basándose en los antecedentes, se puede esperar que el gen SnRK1 tenga un papel importante en la simbiosis, al proporcionar el carbono suficiente que necesita el simbiote para colonizar la planta. Por esta razón, el estudio detallado de la actividad de este gen, proporcionara conocimiento importante para desarrollar estrategias de mejoramiento de la simbiosis, que puedan utilizarse en un futuro.

Siendo SnRK1 un gen de gran importancia para las plantas, principalmente en el desarrollo y en la tolerancia a distintos estreses, es de gran relevancia caracterizar su actividad o participación en procesos como la señalización de ABA, una hormona de gran importancia para las plantas. Además, de que el análisis con glucosa, una de las principales fuentes de energía de las plantas, también nos proporciona información importante sobre el comportamiento del gen en presencia o ausencia de la glucosa. Estos análisis deben realizarse en leguminosas, principalmente en frijol, para buscar alternativas de mejora en el desarrollo y respuesta a distintos estreses, y de esta manera se puede contribuir a programas de mejoramiento de esta planta.

5. Metodología

5.1 Análisis bioinformático de la familia de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris*

5.1.1 Identificación y alineamiento de SnRKs

Las secuencias de los genes de *Arabidopsis thaliana*, se usaron como secuencias de consulta para BLASTN y BLASTP en la base de datos de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), Se utilizaron los valores predeterminados por la base de datos. También se realizó lo mismo en la base de datos del Sistema de Información de Leguminosas (Legume Information System, por sus siglas en inglés LIS; <https://legumeinfo.org>). Las secuencias respectivas de ácido nucleico y péptido se descargaron de la herramienta en línea PhytoMine del portal de genómica comparativa de plantas Phytozome v12.1 para su posterior análisis y anotación. Las secuencias de proteínas se alinearon con ClustalW

de la herramienta Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (MEGA). Además, se utilizó la base de datos UniProt para analizar los dominios conservados y evaluar las secuencias de genes encontradas.

5.1.2 Árbol filogenético de la familia de genes SnRK1

El análisis filogenético de las secuencias alineadas se realizó utilizando el Molecular Evolutionary Genetics Analysis X (MEGAX) con el método de neighbor-joining (NJ). Utilizando los parámetros predeterminados.

5.1.3 Identificación de motivos conservados y análisis de la estructura exón-intrón de los genes PvSnRK

La organización exón-intrón de los genes SnRK1 de *Phaseolus vulgaris* se analizó utilizando Gene Structure Display Server (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>), usando los parámetros predeterminados. Los motivos conservados de los miembros de la familia PvSnRK1 se determinaron usando Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) 4.11.4. (<http://meme-suite.org/tools/meme>), con un tamaño mínimo de 6 pb y un máximo de 100 pb, además de un número máximo de 25 motivos.

5.1.4 Análisis *In Silico* de los perfiles de expresión de los miembros de la familia SnRK en distintos tejidos y los patrones de expresión en raíces noduladas y micorrizadas

Se obtuvo y se descargó la información de la expresión de los SnRKs en distintos tejidos de la base de datos de Phaseolus vulgaris Gene Expression Atlas (PvGEA) (<https://plantgrn.noble.org/PvGEA/atlas/>). Mediante el programa Qlucore (<https://www.qlucore.com/>) se construyó un mapa de calor. Representando los datos con una media de 0 y variable 1. Mediante los datos de RNA-seq se utilizó el grado de cambio de la expresión del gen entre el valor final y el original (Fold change), Para construir un mapa de calor de la expresión de los genes PvSnRK durante la simbiosis de *Rhizobium* y micorriza.

5.2 Clonación del promotor de PvSnRK1

5.2.1 Amplificación del fragmento del promotor de SnRK1

Se realizó un PCR usando ADN genómico de raíz para obtener el fragmento del promotor de SnRK1, se usó la Platinum™ superFi™ ADN polimerasa. Los componentes de la reacción de PCR y sus cantidades, así como el programa que se utilizó se encuentran en la Figura S3. Después, se corrió un gel de electroforesis del resultado del PCR de amplificación del fragmento de SnRK1, con agarosa al 1.2%.

5.2.2 Introducción del fragmento al vector pENTR/D-TOPO

Para la introducción del fragmento al vector de entrada pENTR/D-TOPO, se utilizaron 8 µL del producto de PCR, 1 µL de sal y 0.7 µL de PENTR/D-TOPO. La reacción se incubó durante toda la noche.

5.2.3 Transformación de *E.coli* Top10 con el vector pENTR

Se descongeló el tubo de células competentes de *E.coli* Top10 durante 15 minutos en hielo, se agregó la reacción del vector al tubo de células competentes (50 µL) se agitó suavemente con el dedo y se incubó a 4° C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó el golpe de calor a 42° C durante 45 segundos, se pasó a hielo inmediatamente durante 4 minutos y se agregaron 300 µL de medio LB. Se incubó a 37° C durante 1 hora. Se plaquearon 100 y 150 µL de células en cajas de LB con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Se realizó un PCR de colonias para comprobar que funcionó la transformación.

5.2.4 Miniprep y PCR del plásmido pENTR de las colonias de *E.coli* Top10

Se eligió una colonia y se realizó un miniprep a base del GenElute™ Plasmid Miniprep kit de Sigma y se realizó un PCR de plásmidos para corroborar que la clonación del vector pENTR con el fragmento haya sido de buena calidad. En la Figura S5 se muestra los componentes de la reacción de PCR del plásmido y sus cantidades, así como también el programa de corrida del PCR.

5.2.5 PCR del plásmido pENTR con los oligos M13

Para poder obtener el fragmento del promotor de SnRK1 e introducirlo en el vector final pBGWSF7.0 se tuvo que realizar un PCR del plásmido pENTR con los oligos M13. La figura S6 muestra los componentes de la reacción de PCR y sus cantidades, así como también el programa. Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1.2%.

5.2.6 Introducción del fragmento al vector final pBGWSF7.0

Se extrajo el fragmento y se hizo una elución a base del GeneJET Gel Extraction kit de Thermo Scientific. Después, se preparó la reacción para unir el fragmento al vector, se alineó el vector a 65° C durante 5 minutos y se pasó a hielo durante 2 minutos, la reacción estuvo conformada por 8 µL del fragmento con M13, 1 µL de LR-clonasa mix y 3.5 µL del vector. Se incubó a temperatura ambiente durante todo el fin de semana.

5.2.7 Transformación de *E.coli* con el vector pBGWSF7.0

Se realizó la transformación de *E.coli* siguiendo los mismos pasos que en el caso de PENTR. Antes de realizar la transformación se agregaron 1.5 µL de proteinasa K a la reacción del vector y se incubó 10 minutos a 37° C. Después de la transformación, se realizó un PCR de colonias para corroborar que la transformación funcionó.

5.2.8 Miniprep y PCR del plásmido pBGWSF7.0 de las colonias de *E.coli* Top10

Se eligieron 6 colonias y se realizaron minipreps a base del GenElute™ Plasmid Miniprep kit de Sigma. Finalmente, se hizo una PCR del plásmido para corroborar que la transformación fue de buena calidad, la figura S8 muestra los componentes y las cantidades de la reacción de PCR, así como su programa de corrida.

5.2.9 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes*

Se descongelaron las bacterias de la cepa K599 en hielo y se puso la cubeta de electroporación en hielo también. Se pusieron 5 µL del plásmido en las bacterias. Se incubó en hielo durante 30 minutos. Se pasaron las bacterias a la cubeta de electroporación y se pasaron a la máquina de electroporación (a 1.7). Después, se pusieron a crecer las bacterias en 500 µL de LB durante 2 horas. Se plaquearon 100 µL en cajas de LB con espectinomicina (200µg/mL). Se realizó una PCR de colonias para corroborar que sea correcta la transformación.

5.2.10 Miniprep y PCR del plásmido pBGWSF7.0 de las colonias de *A. rhizogenes*

Se realizó miniprep de 2 colonias a base del GenElute™ Plasmid Miniprep kit de Sigma. Finalmente, se hizo una PCR del plásmido para corroborar que la transformación fue de buena

calidad, la figura S8 muestra los componentes y las cantidades de la reacción de PCR, así como su programa de corrida.

5.3 Fenotipado de la sobreexpresión de PvSnRK1 en *Phaseolus vulgaris*

5.3.1 Generación de raíces transgénicas en frijol común con la construcción PvSnRK1-OX en *A. rhizogenes*

Se esterilizaron las semillas de frijol (*P. vulgaris* cv. Negro Jamapa), aproximadamente 100 semillas, en 50 mL de etanol al 96% durante 1 minuto y se desechó el etanol; luego se agregaron 50 mL de cloro al 20% (hipoclorito de sodio) durante 5 minutos, en una campana de flujo laminar. Se retiró el cloro y se lavaron las semillas con agua estéril 3 veces.

Se germinaron las semillas esterilizadas en charolas de aluminio estériles humedecidas con agua durante 3 días en la oscuridad a 28 °C. un día antes de la transformación, se plaquearon 150 µl de cultivo *A. rhizogenes* que alberga el vector binario de PvSnRK1 de sobreexpresión y localización (pEarley Gate 104 N-YFP) en LB kan50 sólido y se creció a 28 ° C durante la noche. Se llenó un tubo de 15 mL con solución nutriente B&D y se reemplazó la tapa con papel de aluminio de doble capa. Se ensambló esto en un tubo de vidrio de 22 cm que contenía 10 mL de agua de garrafón y se esterilizó en autoclave.

Al día siguiente, se usó una espátula para raspar las células de *A. rhizogenes* de la placa en un tubo de microcentrífuga y se re suspendió en 200 µL de agua desionizada estéril. Del mismo modo, se prepararon las células de control de vectores por separado. Se mezcló las células suavemente para resuspender. Se hizo un agujero de 3 mm en la lámina de aluminio de los tubos preparados anteriormente con una punta de pipeta estéril. Se recogieron las células (que contenían la construcción del promotor o el control del vector) con una jeringa y se pincharon ligeramente los hipocotilos de las semillas germinadas con la punta de la aguja. Esto se hizo de 4 a 6 veces, penetrando el tejido vascular y se inyectaron pequeñas gotas de las células en la herida en diferentes posiciones alrededor del hipocotilo. Se insertaron cuidadosamente las raíces de las plántulas inyectadas en el orificio de 3 mm del tubo de 15 mL que contenía la solución nutritiva B&D. Se devolvieron los tubos de 15 mL a los tubos de 22 mL y se sellaron con plástico para mantener la humedad. Se incubaron los tubos en una cámara de crecimiento mantenida a 28° C con 16 h de luz: 8 h de fotoperiodo oscuro. Se inyectaron un total de 40 plantas, 25 de sobreexpresión y 15 de control. A los 3-4 días después de iniciada la incubación, las plantas crecieron hasta el borde de los tubos de vidrio de 22 mL. En esta etapa, se retiraron las tapas y se selló el borde con parafilm o

plástico, alrededor del tallo. Después de 2 semanas, se retiró la raíz primaria cortando el tallo 2 cm por debajo de las raíces peludas, se observaron en el estereoscopio y se eligieron aquellas raíces que no estaban transformadas y que no presentaban la fluorescencia y se arrancaron de la planta, después se trasplantaron en macetas que contenían vermiculita estéril. Las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta el final de los experimentos.

5.3.2 Inoculación de las plantas transgénicas con *Rhizobium tropici* y micorriza arbuscular

Para la inducción de nódulos de las raíces, se inocularon las plantas con *Rhizobium tropici* de la cepa CIAT899. Para esto se creció el *Rhizobium* en 150 mL de medio de PY líquido (0.75 g de peptona, 0.45 g de extracto de levadura), durante 2 días a 28° C. las plantas se inocularon con 4 mL del cultivo de *R. tropici*. Para inducir la infección por micorriza en las raíces transgénicas se inocularon con esporas de *Rhizopus irregularis* con una carga de esporas de 400 por planta 5 días después del trasplante a vermiculita

5.3.3 Fenotipado de la simbiosis de frijol común y *R. tropici*

Después de 18 días de la inoculación de las plantas con *R.tropici*, se evaluó el tamaño y la forma de los nódulos, así como el número. También se midió el tamaño de las raíces y se contó el número de raíces primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias. Las raíces se congelaron para futuros experimentos.

5.3.4 Fenotipado de la simbiosis de frijol común con micorriza arbuscular

Para poder observar la presencia de infección por micorriza en las raíces transgénicas se realizó una tinción con azul tripano a las 3 y 5 semanas después de la inoculación. Para la tinción se seleccionaron las raíces y se lavaron suavemente con agua destilada hasta eliminar los restos del sustrato. Posteriormente se depositó cada muestra de raíces (por planta) en un tubo Falcón (50 mL) con aproximadamente 30 ó 35 mL de etanol. Se dejaron las raíces durante 24 horas. Después, a las 24 h de estar sumergidas en etanol, se realizaron de 3 a 4 lavados con agua destilada. Luego se añadió a cada muestra la solución de KOH 20% hasta cubrir

totalmente la muestra, el tiempo de suspensión de las raíces en KOH fue de 48 h.

Después se lavaron suavemente las raíces con agua destilada. Posteriormente se añadió la solución de HCl 10% hasta cubrir totalmente las muestras (el HCl es para blanquear las raíces), el tiempo de

suspensión de las raíces en HCl fue de máximo 2 horas. Después se retiró el HCl y se suspendieron las raíces en la solución al 0.5% de azul de tripano durante 48 h. Pasado el tiempo de suspensión en la solución de azul de tripano, se lavaron las raíces suavemente con agua destilada. Posteriormente se añadió el lactoglicerol, aproximadamente 30 mL por tubo. Para poder visualizarlas al microscopio se esperaron al menos 24 h.

5.3.5 Extracción de ARN total de raíces transformadas

Se molió 0.1 g de tejido de raíces transformadas con la construcción de sobreexpresión y de control, por separado, se molió el tejido hasta obtener un polvo muy fino, se usó nitrógeno (N₂) líquido para moler. Se colocó 1 mL de TRizol al tejido y se homogenizó por 5 minutos. Se agregaron 200 mL de cloroformo a cada tubo y se mantuvieron en hielo. Después de homogenizar bien las muestras, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se invirtieron los tubos vigorosamente de 10-15 veces, lo homogenizado se centrifugó a 12,000 rpm por 20 minutos a 4° C. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se agregaron 0.5 mL de isopropanol, se invirtieron los tubos varias veces y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4° C, se descartó el sobrenadante. Se agregó etanol al 75% a la pastilla y los tubos se incubaron los tubos a -80° C durante 4 o 5 horas. Pasadas las 4 o 5 horas los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron a 7500 rpm por 10 minutos a 4° C. La pastilla se secó al aire libre hasta que se evaporaron todos los restos de etanol. La pastilla se disolvió en 40 mL de agua de DEPC. Se corrió un gel del ARN con agarosa al 2.5%, en buffer TAE 1X. se cargaron las muestras de la siguiente forma: 2 µL de ARN + 8 µL de agua + 3 µL de buffer de carga.

5.3.6 RT-PCR del ARN total

Se utilizó la enzima retrotranscriptasa Invitrogen™ SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System, para elaborar el ADNc. En un tubo de PCR se colocó 1 µL de oligos dt, 2 µL de ARN y 7 µL de agua. Se mezcló todo muy bien e incubó a 65° C durante 15 minutos, después se pasó a hielo y se incubó 5 minutos. Se agregó 5 µL de First-Strand (FS) buffer, 1 µL de dNTPs, 0.5 µL de la enzima RT y 4.5 µL de agua. Se incubó a 40° C durante 1 hora.

5.3.7 PCR semicuantitativa

Se utilizó el gen de acuaporina para normalizar la concentración de ADNc de las muestras, se realizó una PCR con los oligos de acuaporina, utilizando la Go taq (Figura S9). Para la PCR semicuantitativa

se usaron oligos de SnRK1 específicos para el PCR cuantitativo, para este PCR se realizó una reacción utilizando la GO taq (Figura S10), para la reacción se colocaron 2 μ L de ADNc control y 1.8 μ L de ADNc de las raíces de sobreexpresión de SnRK1, esto se normalizó con la PCR de la aquaporina.

5.4 Análisis de promotor

5.4.1 Tinción de GUS

Se cortaron dos raíces completas de cada planta, se colocaron en una caja Petri pequeña con el buffer GUS (tabla 1). La solución X-gluc se diluyó en dimetilformaldehído (1.92 mL de dimetilformaldehído por cada 100 mg de X-gluc). Las raíces se colocaron en obscuridad a 37° C hasta el día siguiente. Posteriormente, se colocaron en una solución de cloro al 2% para quitar el exceso de tinción y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia y en el estereoscopio.

Tabla 1. Componentes del buffer para la reacción de GUS

Componente	Cantidad
1M K ₂ HPO ₆	1.23 mL
1M KH ₂ PO ₆	0.77 mL
dH ₂ O	17.18 mL
0.5 M EDTA	400 μ L
TRITON X	20 μ L
100 mM K ₃ Fe(CN) ₆	100 μ L
100 mM K ₄ Fe(CN) ₆	100 μ L
100 mM X-gluc	200 μ L
Total	20 mL

5.4.2 Tratamientos con ABA y Glucosa

Se aplicaron tratamientos con ácido abscísico 50 μM y 100 μM , primero se diluyó y luego se agregó a un volumen de 25 mL, con ese volumen se regaron las plantas. En el caso de glucosa se hizo lo mismo, pero con concentraciones de 5 y 3%. Los tratamientos se dejaron por 48 horas. Después de esto, se realizó la reacción de GUS en las raíces.

6. Resultados

6.1 Identificación y análisis bioinformático de la familia de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris*

6.1.1 Identificación y alineamiento de SnRKs

Se identificaron un total de 42 proteínas con dominio de quinasa Ser/Thr candidatas de SnRK en frijol común (*Phaseolus vulgaris*), a base de la búsqueda en la base de datos Phytozome y mediante el uso de la herramienta BLAST. Los parámetros de las características de cada gen incluidas la longitud del gen, la longitud de la secuencia codificante, la longitud del transcripto, la longitud de la proteína, el punto isoeléctrico y el tamaño molecular se encuentran en la Tabla 2. Codifican proteínas que varían entre 310 y 515 aminoácidos (aa), con un tamaño molecular que va de 38.15 a 60.54 kDa. El punto isoeléctrico varió de 4.7 a 9.37, y curiosamente el punto isoeléctrico de la subfamilia SnRK2 varió de 4.7 a 6.65 lo que corresponde a proteínas ácidas (Wang et al., 2019).

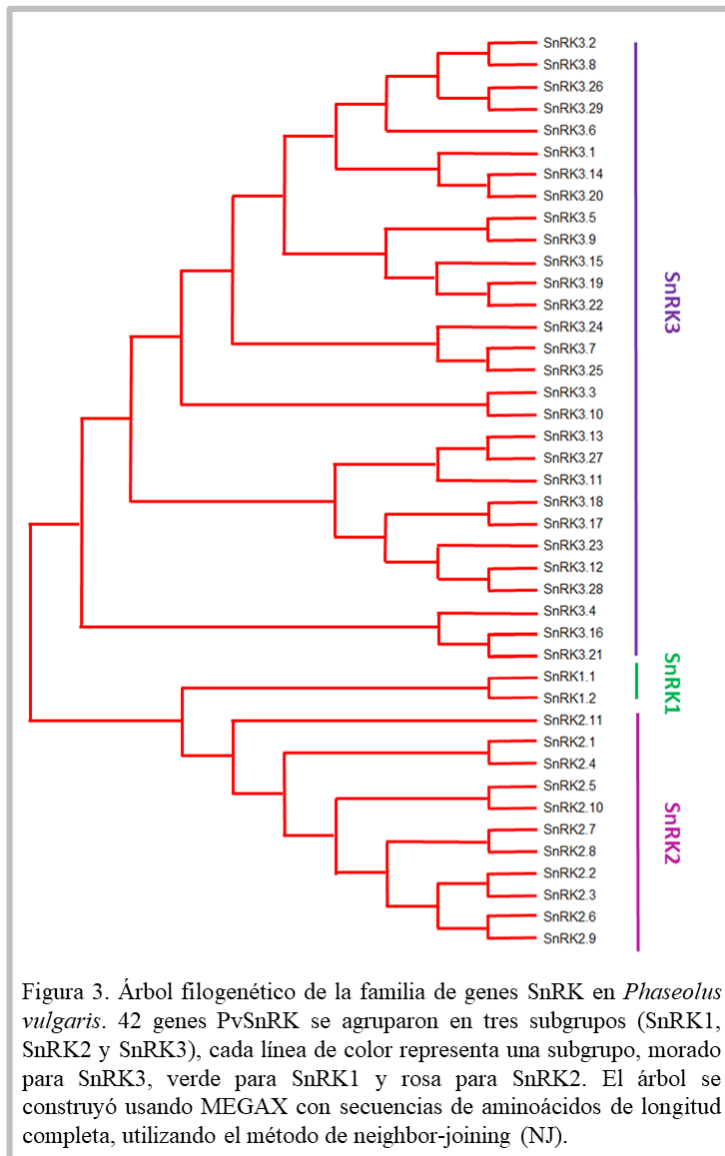
Posteriormente, para comprobar que los genes que se encontraron pertenecen a la familia PvSnRK y evaluar a que subgrupo corresponden, se hizo un alineamiento con ClustalW y se compararon con la familia de genes de *Arabidopsis thaliana*. Los miembros de la subfamilia PvSnRK1 contenían el dominio característico KA1 (PF02149) (Figura S1). Lo mismo paso con los miembros de la subfamilia PvSnRK3 que contiene el dominio NAF/FISL. En el caso de la subfamilia PvSnRK2 cuenta con presencia del dominio OST (Mustilli et al., 2002).

Tabla 2. Lista de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris* y sus características.

Familia	ID del gen	Nombre del gen	Ortólogos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Largo del gen, pb	Largo de la secuencia codificante, pb	Largo del transcrito, pb	Largo de la proteína, aa	PI	Peso molecular, kDa
SnRK1	Phvul.008G039400	SnRK1.1	AT3G01090 (SnRK1.1)	6983	1548	2155	515	8.26	58.7
	Phvul.004G032000	SnRK1.2		8371	1587	2263	528	8.72	60.54
SnRK2	Phvul.006G216400	SnRK2.1		3350	1056	1639	351	6.12	40.25
	Phvul.002G021600	SnRK2.2		5626	1080	1777	359	4.7	40.77
	Phvul.003G247000	SnRK2.3	AT5G66880 (SnRK2.3), AT3G50500 (SnRK2.2)	5271	1083	1853	360	4.79	40.91
	Phvul.009G157800	SnRK2.4	AT1G60940 (SnRK2.10), AT1G10940 (SnRK2.4)	3512	1056	1596	351	5.94	40.46
	Phvul.003G225800	SnRK2.5		4249	1017	1616	338	5.87	38.15
	Phvul.003G293600	SnRK2.6	AT4G33950 (SnRK2.6)	5001	1251	1549	416	5.39	46.85
	Phvul.002G261200	SnRK2.7	AT4G40010 (SnRK2.7)	3355	1026	1712	341	5.32	38.73
	Phvul.008G176300	SnRK2.8	AT1G78290 (SnRK2.8)	3253	1020	1316	339	5.17	38.33
	Phvul.003G012300	SnRK2.9		4259	1095	1884	364	4.96	41.33
	Phvul.002G002200	SnRK2.10		3058	1017	1375	338	6.65	38.65
	Phvul.002G249300	SnRK2.11		4408	933	1262	310	6.4	35.67
SnRK3	Phvul.006G174900	SnRK3.1		1311	1311	1311	436	8.83	49.77
	Phvul.006G076200	SnRK3.2	AT5G58380 (SnRK3.8), AT5G07070 (SNRK3.2)	1389	1389	1389	462	8.92	52.56
	Phvul.003G138278	SnRK3.3	AT4G14580 (SNRK3.3), AT3G23000 (SNRK3.10)	1718	1320	1718	439	9.1	49.24
	Phvul.003G148600	SnRK3.4	AT5G57630 (SNRK3.4)	4095	1410	1817	469	8.98	53.19
	Phvul.006G174800	SnRK3.5	AT4G18700 (SnRK3.9), AT5G45810 (SnRK3.5)	2248	1524	2248	507	6.55	56.8
	Phvul.001G248700	SnRK3.6		2562	1332	2178	443	9.13	50.13
	Phvul.005G181900	SnRK3.7		2029	1377	2029	458	9.1	51.37
	Phvul.008G248900	SnRK3.8	AT5G07070 (SnRK3.2), AT5G58380 (SnRK3.8)	1332	1332	1332	443	9.37	50.07
	Phvul.002G238800	SnRK3.9	AT4G18700 (SnRK3.9), AT5G45810 (SnRK3.5)	1830	1539	1830	512	7.69	57.87
	Phvul.007G279600	SnRK3.10	AT3G23000 (SnRK3.10), AT4G14580 (SnRK3.3)	1612	1269	1612	422	9.05	47.37
	Phvul.003G165700	SnRK3.11	AT5G35410 (SnRK3.11)	13258	1359	2196	452	9.09	51.48
	Phvul.010G118300	SnRK3.12	AT1G01140 (SnRK3.12)	5700	1311	1902	436	8.78	49.6
	Phvul.009G145400	SnRK3.13	AT4G24400 (SnRK3.13)	4661	1341	1790	446	6.81	50.89
	Phvul.003G156900	SnRK3.14	AT4G30960 (SnRK3.14)	2154	1302	2154	433	8.98	48.78
	Phvul.008G085000	SnRK3.15		2382	1158	2382	385	8.34	42.93
	Phvul.003G121600	SnRK3.16	AT3G17510 (SnRK3.16), AT1G48260 (SnRK3.21)	4276	1266	1845	421	7.07	47.32
	Phvul.008G205700	SnRK3.17	AT2G26980 (SnRK3.17)	7189	1326	2122	441	6.49	50.3
	Phvul.006G020900	SnRK3.18		6520	1323	2181	440	8.73	50.11
	Phvul.006G076600	SnRK3.19	AT2G30360 (SnRK3.22)	2703	1314	1899	437	6.54	48.84
	Phvul.009G206900	SnRK3.20	AT4G30960 (SnRK3.14)	2426	1317	2426	448	9.24	49.41
	Phvul.009G220200	SnRK3.21	AT1G48260 (SnRK3.21), AT3G17510 (SNRK3.16)	5245	1377	1913	458	6.15	51.1
	Phvul.008G248800	SnRK3.22	AT2G30360 (SnRK3.22)	2416	1284	2004	427	8.28	47.68
	Phvul.009G213000	SnRK3.23	AT1G30270 (SnRK3.23)	8698	1374	2110	457	8.82	51.31
	Phvul.009G087500	SnRK3.24	AT5G10930 (SnRK3.24), AT5G25110 (SnRK3.25)	2097	1341	2097	446	8.72	49.87
	Phvul.010G160900	SnRK3.25		1875	1332	1875	443	9.05	50.54
	Phvul.008G084600	SnRK3.26		1386	1386	1386	461	8.69	52.2
	Phvul.008G184400	SnRK3.27	AT4G24400 (SnRK3.13)	7422	1341	1885	446	6.4	50.78
	Phvul.009G257000	SnRK3.28		6851	1065	1846	354	6.47	40.15
	Phvul.010G067600	SnRK3.29		3682	1404	2236	467	8.77	52.91

6.1.2 Árbol filogenético de la familia de genes SnRK

Con el fin de analizar las características evolutivas de los SnRK en frijol, se construyó un árbol filogenético en MEGAX con secuencias de aminoácidos, utilizando el método de neighbor-joining (NJ) (Figura 3). El análisis filogenético indicó que los PvSnRK podrían dividirse en tres grupos, los tres grupos contienen los dominios de quinasa (PF00069 de Pfam) característicos de la familia SnRK. En detalle, el grupo de PvSnRK1 contiene dos miembros con el dominio KA1 (IPR001772 de InterPro y PF02149 de Pfam). El grupo de PvSnRK2 contiene 11 grupos con el dominio característico OST. El grupo PvSnRK3 cuenta con 29 miembros y tienen el dominio característico NAF (IPR004041 de InterPro y PF03822 de Pfam) y el dominio NAF/FISL (IPR018451 de InterPro).



6.1.3 Análisis *In Silico* de los perfiles de expresión de los miembros de la familia SnRK en distintos tejidos y los patrones de expresión en raíces noduladas y micorrizadas

Se realizó un análisis de los perfiles de expresión *in Silico* de distintos tejidos en *P. vulgaris*, los datos de expresión se obtuvieron del atlas de expresión de genes de frijol común (PvGEA). Los perfiles de expresión de 42 genes se compararon con 25 muestras de tejidos (Tabla 3) y se encontró un patrón de expresión diferencial. El patrón de expresión de SnRK en diferentes tejidos de *P. vulgaris* muestra que la mayoría de los genes están altamente expresados, en los 25 tejidos analizados (Figura 4). La máxima expresión se observó en raíces y tejido foliar de plantas inoculadas con *Rhizobium* efectivo y no efectivo, en nódulos de fijación eficaz y no eficaz y en vainas. La alta expresión de SnRK durante la simbiosis de *Rhizobium* en distintos tejidos, indica que esta familia de genes juega un importante papel en el proceso de simbiosis.

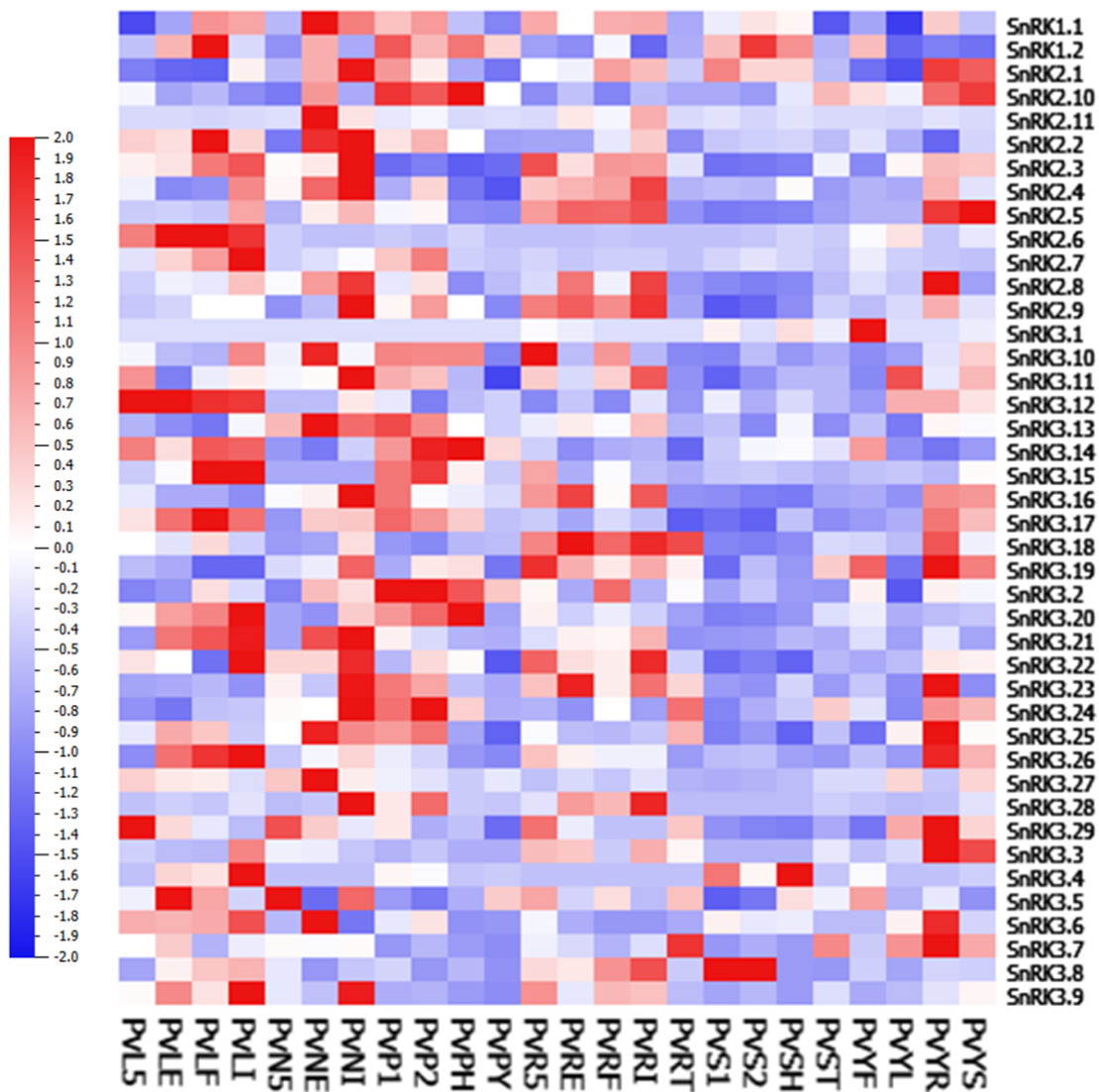


Figura 4. Análisis *In Silico* de perfiles de expresión de los genes SnRK en distintos tejidos. Los datos de expresión de cada gen se descargaron de la base de datos PvGEA. Se utilizó una distribución normal estándar para los datos, con una media de 0 y varianza de 1, va de 0 (azul) a 1300 (rojo).

Tabla 3. Descripción de los tejidos analizados en el mapa de calor de la expresión in silico de los SnRKs en distintos tejidos.

Símbolo	Descripción
PvYL	Segundo tejido foliar trifoliado completamente expandido de plantas provistas de fertilizante
PvL5	Tejido de hojas recolectado 5 días después de que las plantas fueron inoculadas con rizobio efectivo
PvLF	Tejido foliar de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo de LE y LI
PvLE	Tejido foliar recolectado 21 días después de que las plantas fueron inoculadas con rizobio efectivo
PvLI	Tejido foliar recolectado 21 días después de que las plantas fueron inoculadas con rizobio ineficaz.
PvYS	Todos los entrenudos del tallo por encima del cotiledón recolectados en la segunda etapa trifoliada
PvST	Punta del brote, incluido el meristemo apical, recolectado en la segunda etapa trifoliada
PvYF	Flores jóvenes, recolectadas antes de la emergencia floral.
PvPY	Vainas jóvenes, recolectadas de 1 a 4 días después de la senescencia floral. Las muestras contienen embriones en desarrollo en etapa globular
PvPH	Vainas de aproximadamente 9 cm de largo, asociadas con semillas en etapa de corazón (solo vaina)
PvP1	Vainas de entre 10 y 11 cm de largo, asociadas con semillas de la etapa 1 (solo vaina)
PvP2	Vainas de entre 12 y 13 cm de largo asociadas con semillas de la etapa 2 (solo vaina)
PvSH	Semillas en etapa de corazón, entre 3 y 4 mm de ancho y aproximadamente 7 mg
PvS1	Semillas de la etapa 1, entre 6 y 7 mm de ancho y aproximadamente 50 mg
PvS2	Semillas de la etapa 2, entre 8 y 10 mm de ancho y entre 140 y 150 mg
PvRT	Puntas de las raíces, 0.5 cm de tejido, recolectadas de plantas fertilizadas en la segunda etapa trifoliada de desarrollo.
PvYR	Raíces enteras, incluidas las puntas de las raíces, recolectadas en la segunda etapa trifoliada de desarrollo
PvR5	Raíces enteras separadas de nódulos de fijación previa de 5 días
PvRF	Raíces enteras de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo que RE y RI
PvRE	Raíces enteras separadas de los nódulos fijadores recolectados 21 días después de la inoculación
PvRI	Raíces enteras separadas de los nódulos no fijadores recolectados 21 días después de la inoculación
PvN5	Nódulos de fijación previa (efectivos) recogidos 5 días después de la inoculación
PvNE	Fijación eficaz de los nódulos recogidos 21 días después de la inoculación
PvNI	Fijación ineficaz de los nódulos recogidos 21 días después de la inoculación

Se generó un mapa de calor en el programa Qlucore para la expresión diferencial de los genes PvSnRK, durante la simbiosis con *Rhizobium* y micorriza, tomando en cuenta los valores originales (Figura 5). Se encontró que el patrón de expresión de los genes de la subfamilia PvSnRK estaba regulado a la baja tanto en condiciones simbióticas de micorrizas como de rizobios. Entre los miembros de la subfamilia SnRK2, SnRK2.1, SnRK2.10 y SnRK2.3 SnRK2.4 se regularon positivamente cuando se inocularon con micorrizas y rizobio respectivamente. Además, SnRK3.1, SnRK3.27 se expresaron fuertemente cuando se inocularon con micorrizas y SnRK3.17, SnRK3.18, SnRK3.24 y SnRK3.8 se expresaron específicamente en condiciones de inoculación con rizobio. SnRK3.28 y SnRK3.3 se expresaron altamente en ambas condiciones simbióticas. SnRK3.10, SnRK3.15, SnRK3.16, SnRK3.25, SnRK3.7 y SnRK3.9 estaban fuertemente regulados a la baja en ambas condiciones simbióticas.

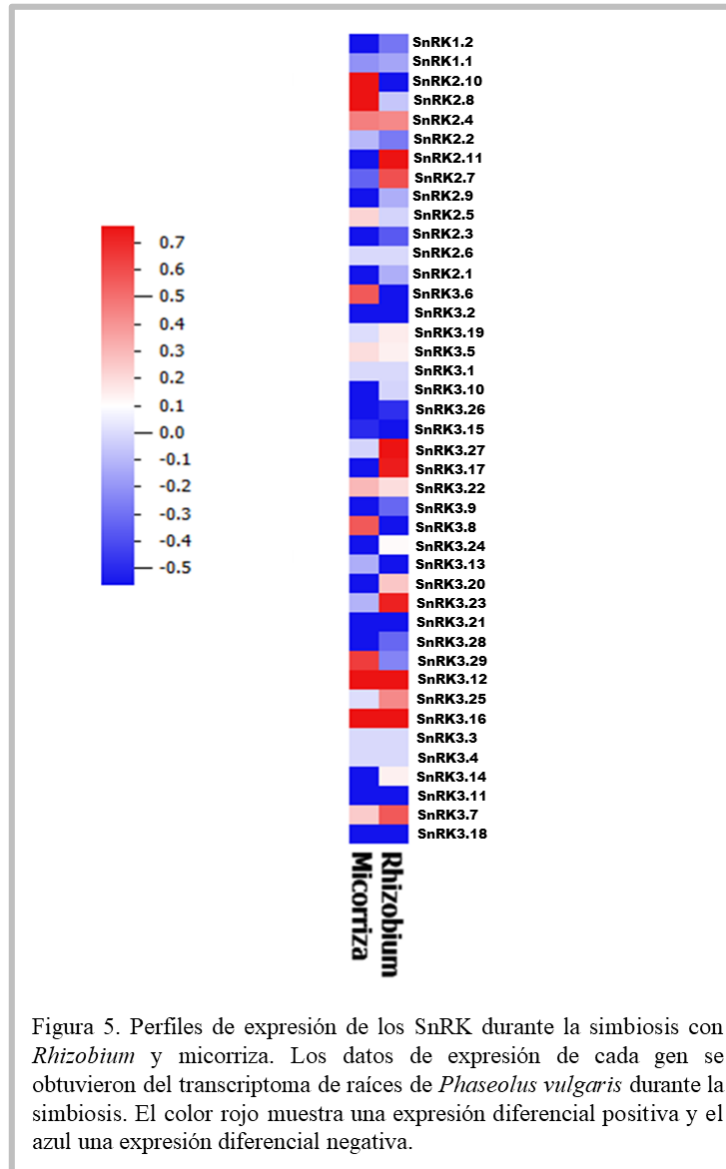


Figura 5. Perfiles de expresión de los SnRK durante la simbiosis con *Rhizobium* y micorriza. Los datos de expresión de cada gen se obtuvieron del transcriptoma de raíces de *Phaseolus vulgaris* durante la simbiosis. El color rojo muestra una expresión diferencial positiva y el azul una expresión diferencial negativa.

6.1.4 Identificación de motivos conservados y análisis de la estructura exón-intrón de los genes PvSnRK

Las secuencias de proteínas de los genes PvSnRK se analizaron utilizando el programa MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (Figura 6). La secuencia e información de los 25 motivos conservados se encuentran en la Tabla 4. Cada uno de los motivos putativos obtenidos de MEME se anotó buscando en Pfam e InterPro. En este estudio, se encontró que todos los genes PvSnRK cuentan con el dominio quinasa conservado que contiene el motivo 1, 2, 3 y 4. Se observó que los genes PvSnRK comparten similitud en los motivos conservados dentro de la misma subfamilia, pero difieren en algunos motivos entre subfamilias. La subfamilia PvSnRK1 contiene los motivos 1, 2, 3,

4, 5, 7, 9, 13, 17, 19 y 22. La subfamilia PvSnRK2 contiene los motivos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14, 23, 24 y 25. La subfamilia PvSnRK3 tiene los motivos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20 y 21.

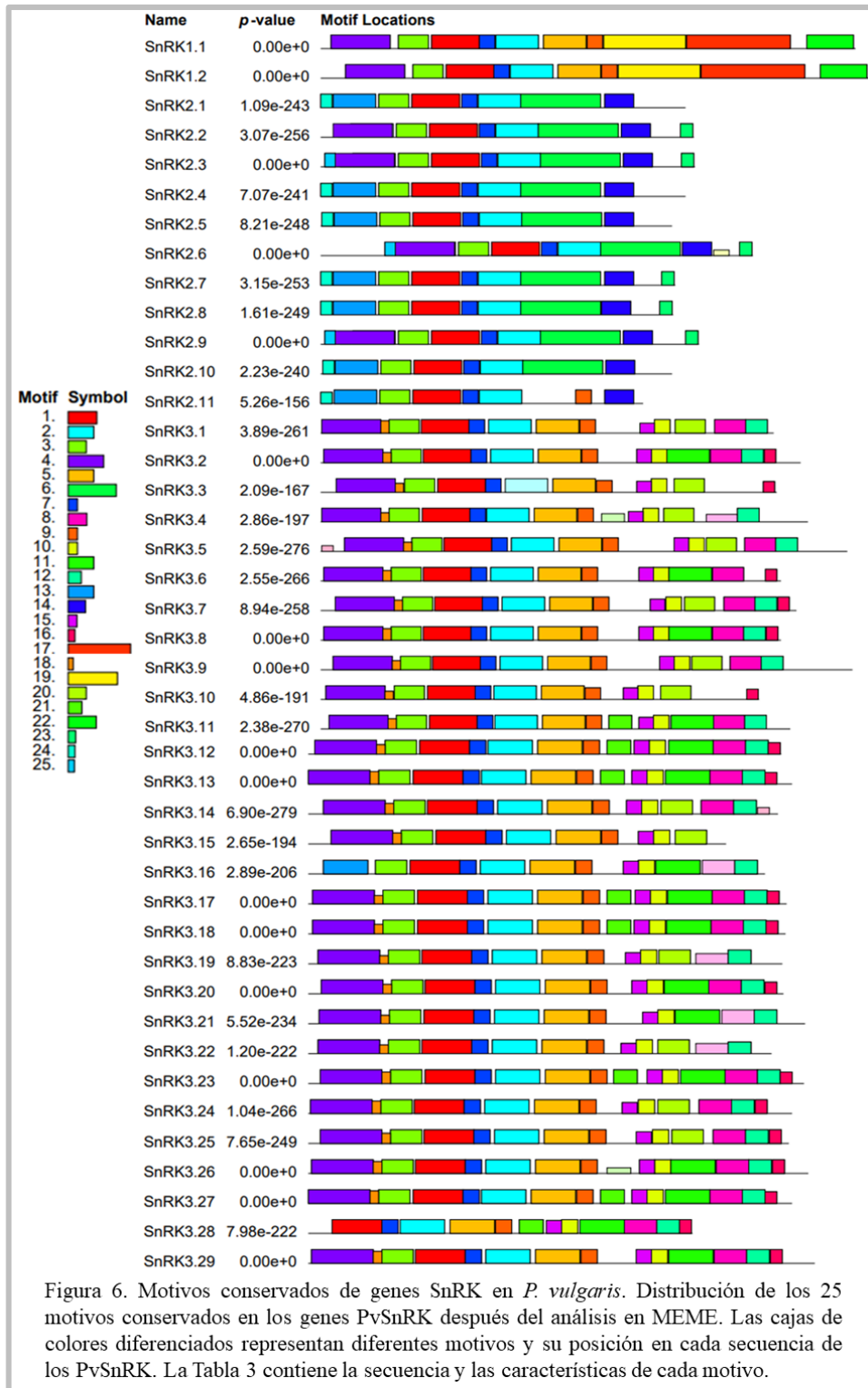
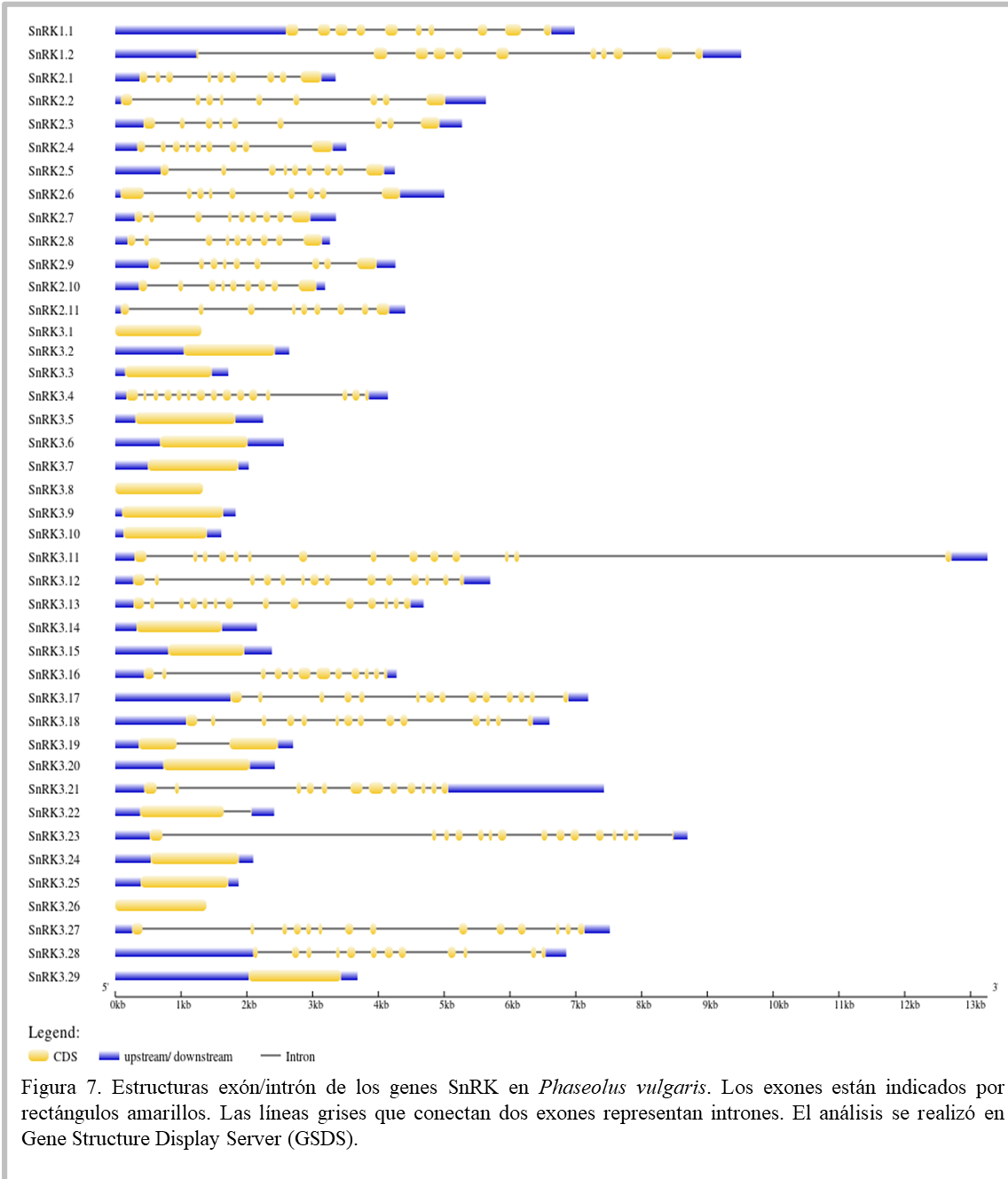


Tabla 4. Secuencia y descripción de los motivos conservados de las proteínas PvSnRK

Motivo	Anotación/homólogo	Identificador Pfam	Identificador IntePro	Secuencia	Subfamilia en la que se encuentra
1	Dominio de proteína quinasa	PF00069	IPR000719	IVSKGRLSEDEARKYFQQQLISAVDYCHSRGVCHRDLKPENLLDEN	Todas
2	Dominio de proteína quinasa	PF00069	IPR000719	DGLLHTTCGTPAYVAPEVLSRKGYDGAKADVWSCGVILYVL	Todas
3	Dominio de proteína quinasa	PF00069	IPR000719	HPNIVRLKEVMATKTKIYIVMEYVKGGEL	Todas
4	Dominio de proteína quinasa	PF00069	IPR000719	KSNVLLGKVELGRJLJGZGTFKVVYHARNLETGZSVAVKVDKEKIJKHG MVEQIKRE	Todas
5	Dominio de proteína quinasa como superfamilia	No	IPR011009	PFDDPNLMALYKKIYKAEFTCPPWFSPARRLSRJLDPNP	SnRK1, SnRK3
6	Dominio de proteína quinasa	PF00069	IPR000719	LVGAYPFDEDPKFNFRKTIQRILSVQYSIPDYVRISQECRHLJSRIFVAB PAKRITPEIKSHPWFLKNLPRELME	SnRK2
7	no	no	no	GNLKISDFGLSALSE	Todas
8	Dominio asociado a quinasa 1, KA1	no	no	LZGSKEGRKGKLSVAEEFVAPSLHVVEV	SnRK3
9	no	no	no	TRITIAEIMZDPWFK	SnRK1, SnRK3
10	Dominio NAF/FISL	no	IPR018451	ISLSSGLBLSGLFEE	SnRK3
11	Dominio NAF	PF03822	IPR004041	DVVKRETRFTSQKPAEIIKJEEIAKPLGFKVKKKNYKIK	SnRK3
12	no	no	no	RKSAGDTLEYHKFKCNLLRPL	SnRK3
13	Dominio de proteína quinasa como superfamilia	no	IPR011009	GNFGVAKLARBKTKELVAVKYIERGKKIDENVQREIINHR	SnRK1, SnRK3
14	no	no	no	MSYZFEEDPQLQSVVEEIMQIIQEARVP	SnRK2
15	no	no	no	ESEKPLSLNAFDJ	SnRK3
16	no	no	no	KDIVWKWZGDQ	SnRK3
17	Dominio KA1/Ssp2, C-terminal	no	IPR028375	FNRMHSEVAPPVVGQRFPYMDYPPGVGLRPQFPVERKVALGLQS RAQPREIMTEVLKALQELNVCWKKIGHYNMKCRWVAAIPG NHEGMINNNVHSNHV	SnRK1
18	no	no	no	ISIMKLV	SnRK3
19	Dominio asociado a ubiquitina	PF00627	IPR015940	RLPRYLAVPPDTLQQAKKIDEEIQEVVKMGFDRNQLVSLRNRIQN EGTVAYYLLFDNRFRVFSGLGAEFQESMDS	SnRK1, SnRK3
20	Dominio NAF	PF03822	IPR004041	EEERFVSKASPVKVIAKVEEVAKKLSFTV	SnRK3
21	no	no	no	FLEYEDVNLDDVNAAFDDSEEQ	SnRK3
22	Dominio asociado a quinasa 1 (KA1)	PF02149	IPR001772	SNVVKFEVQLYKAREEKYLLDLQRVQGPQFLFLDCAAFLAQLRV	SnRK1
23	no	no	no	DIDSSGEIVYAJ	SnRK2
24	no	no	no	MERYEIVKEJG	SnRK2
25	no	no	no	AJTVGPGMDM	SnRK2

Para detallar la estructura exón/intrón en los genes PvSnRK se utilizó el servidor web Gene Structure Display Server (GSDS). La Figura 7 muestra que los genes PvSnRK contienen de 1 a 15 exones. Los miembros de la subfamilia SnRK1 contenían 10 exones, en la subfamilia SnRK2 los 11 miembros tenían 9 exones. En la subfamilia de SnRK3, en los 29 miembros, el número de exones variaba entre 1 y 15 exones, fue la subfamilia que más variación tuvo en el número de exones. Se

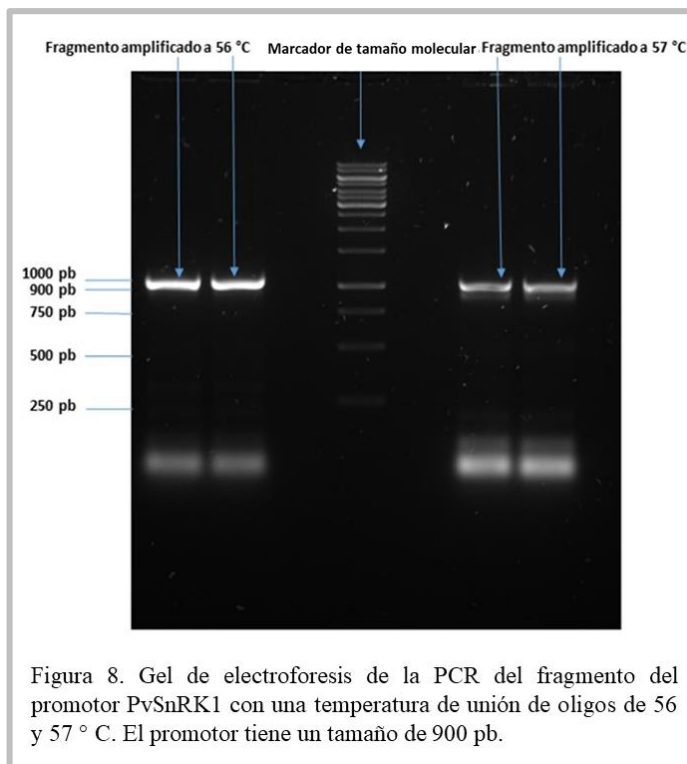
puede decir que, las composiciones de motivos conservados y estructuras génicas similares de los genes SnRK dentro de la misma subfamilia, apoyan fuertemente la confiabilidad de las clasificaciones de subfamilias por análisis filogenético.



6.2 Clonación del promotor PvSnRK1

6.2.1 Amplificación de fragmento del promotor PvSnRK1

Para evaluar la expresión espacio-temporal del gen PvSnRK1 durante la infección con *Rhizobium* y micorriza arbuscular se realizó un análisis de promotor. Para esto se seleccionó una región de 900 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de la ge PvSnRK1 y se diseñaron los oligos para su amplificación. Los oligos para la amplificación del promotor se diseñaron por la doctora Kalpana Nanjareddy (Figura S2). Se realizó una PCR para amplificar el promotor PvSnRK1, la reacción se corrió bajo dos temperaturas de unión de oligos, a 56 y 57° C para analizar la más óptima para la amplificación, la Figura S3 se detalla el programa y los componentes de la reacción de PCR. Se realizó electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.2%. El gel de electroforesis de la PCR del fragmento del promotor PvSnRK1 mostró que la temperatura de unión de los oligos óptima para amplificar el promotor fue 56° C (Figura 8). Por esta razón, se extrajeron las dos bandas correspondientes a esa temperatura y se realizó una elución del fragmento a base del GeneJET Gel Extraction kit de Thermo Scientific.



6.2.2 Introducción del fragmento aislado al vector de entrada pENTR/D-TOPO

Para realizar la clonación del promotor PvSnRK se utilizó la tecnología Gateway que consta de un vector de entrada y un vector de salida. Primero se introdujo el fragmento del promotor PvSnRK1 anteriormente amplificado, en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Figura S4). Luego se transformaron las bacterias *E. coli* TOP10, se seleccionaron las colonias para verificar que fueran positivas y se extrajo el vector pENTR. Se realizó PCR del vector para verificar que si contiene el fragmento del promotor. El programa y las condiciones del PCR se detallan en la Figura S5. Se corrió un gel de electroforesis para corroborar que el vector contiene el fragmento del promotor PvSnRK1. El gel mostró claramente que, sí se encontraba el fragmento del promotor, además de que la banda en el gel se veía bastante marcada y gruesa (Figura 9).

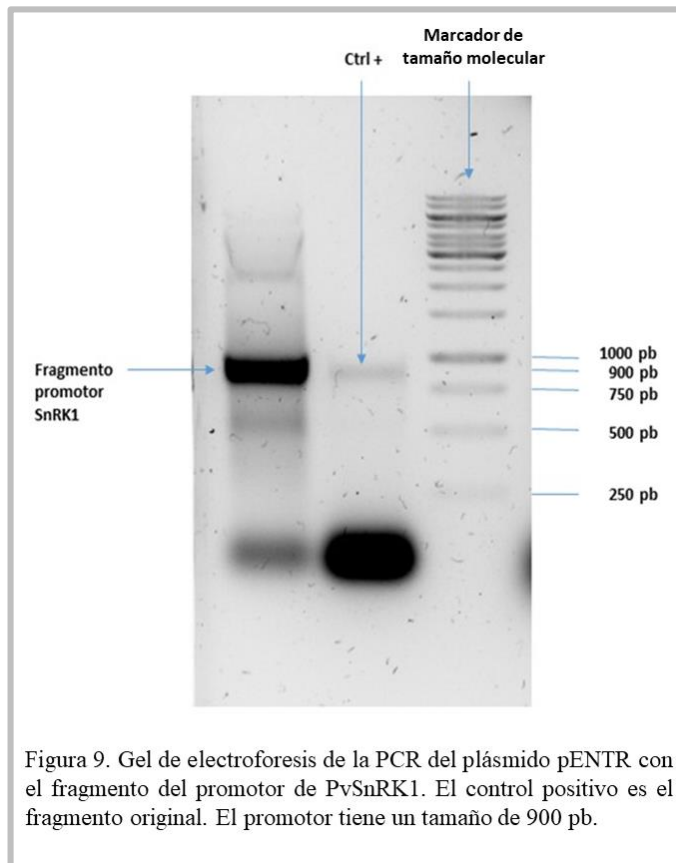
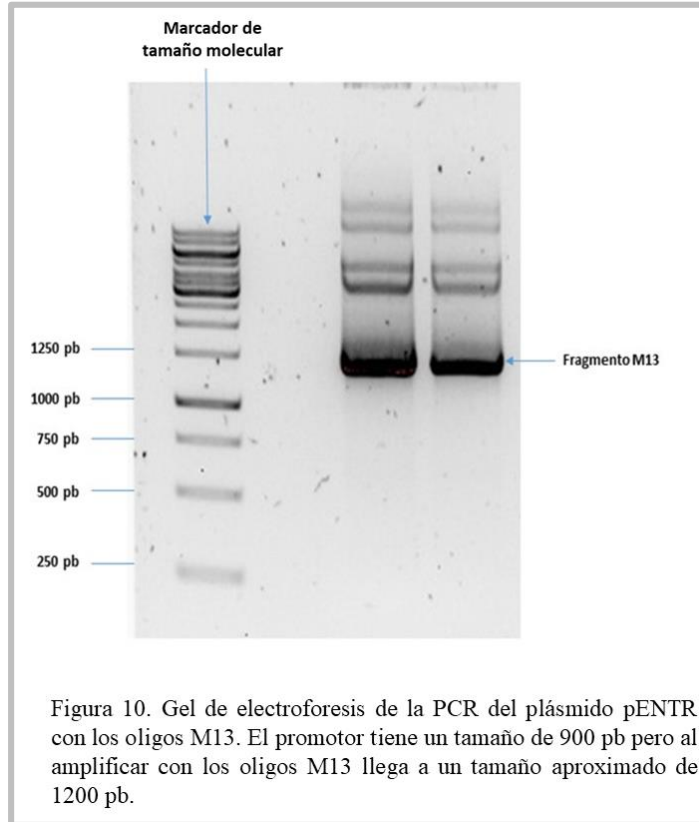


Figura 9. Gel de electroforesis de la PCR del plásmido pENTR con el fragmento del promotor de PvSnRK1. El control positivo es el fragmento original. El promotor tiene un tamaño de 900 pb.

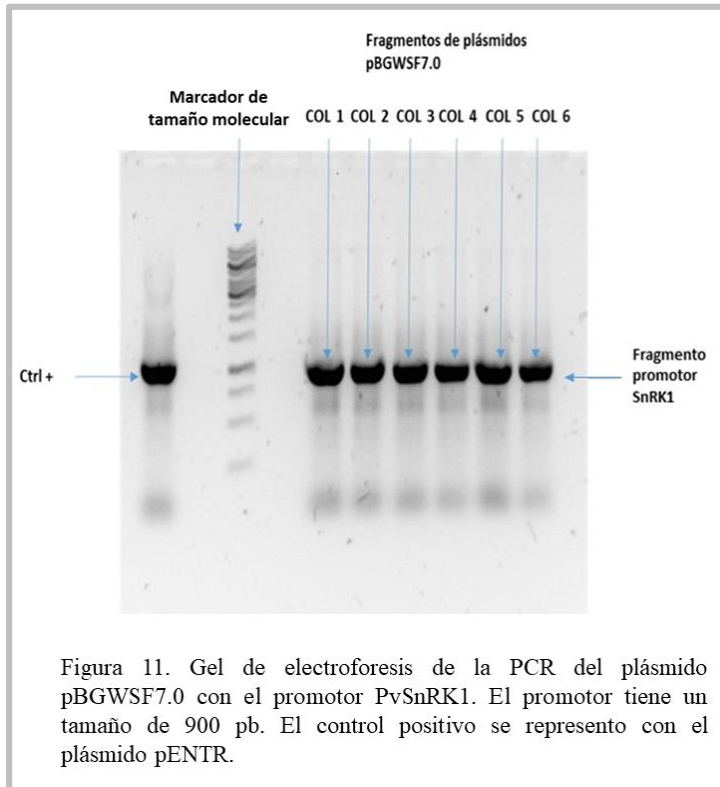
6.2.3 Introducción del fragmento del promotor PvSnRK1 al vector pBGWSF7.0

Después de verificar que el fragmento del promotor PvSnRK1 se encontraba en el plásmido, se realizó un PCR para amplificarlo. En este caso se utilizaron los oligos M13 del kit de pENTR/D-TOPO, estos oligos amplifican a partir de una región específica de vector pENTR. El fragmento amplificado a partir de estos oligos contenía al promotor PvSnRK1 y una región extra que permitió unirlos al vector final. Los detalles de los componentes y el programa de la PCR se detallan en la

Figura S6. Se realizó electroforesis del producto de la PCR con los oligos M13, se observaron bandas grandes y muy marcadas (Figura 10), esto permitió utilizar este fragmento para introducirlo en el siguiente vector. Se extrajo el fragmento y se hizo una elución con el GeneJET Gel Extraction kit de Thermo Scientific.

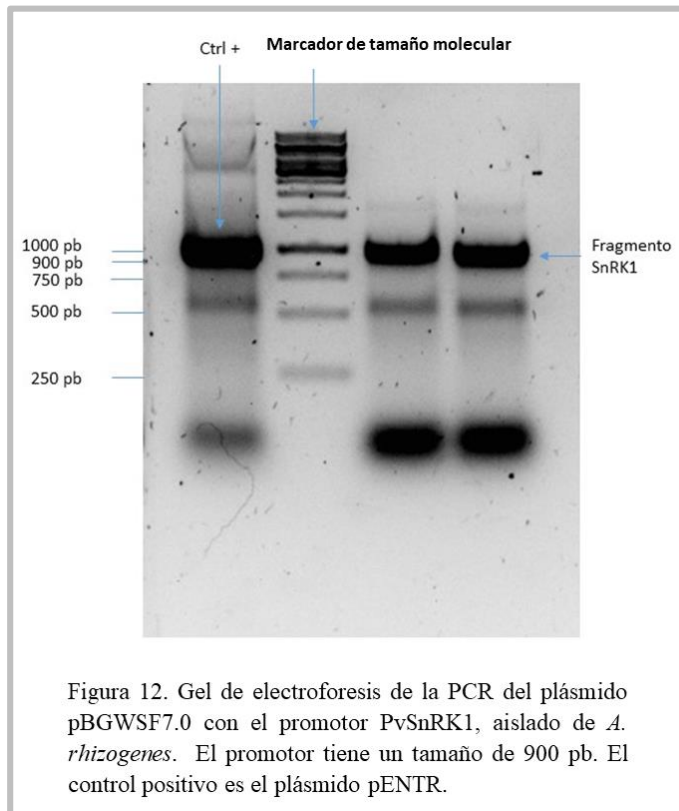


Se realizó la introducción del fragmento obtenido de la PCR con los oligos M13, al vector final pBGWSF7.0 (figura S7). Se transformaron bacterias *E.coli* TOP10 con el vector final que contenía el fragmento M13. Se crecieron las colonias de *E.coli*, después se eligieron 6 colonias y se realizó PCR para corroborar que se encontraba el vector final con el fragmento del promotor PvSnRK1 de nuestro interés, los componentes y el programa se detallan en la figura S8. Se hizo una electroforesis de la PCR y se pudo corroborar que en todas las colonias se encontraba el vector final con el promotor PvSnRK1 (Figura 11). Nuestro vector inicial pENTR se usó como control positivo y efectivamente corroboró que las colonias contenían el vector final con el promotor PvSnRK1.



6.2.4 PCR del plásmido pBGWSF7.0 de las colonias de *A. rhizogenes*

Después de aislar el vector pBGWSF7.0 que contiene el promotor PvSnRK1 de las bacterias *E. coli* se transformaron las bacterias *Agrobacterium rhizogenes*, para poder generar las raíces transgénicas en las plantas. Se realizó una PCR de 2 colonias de *A. rhizogenes* para corroborar que si se encontraba el plásmido pBGWSF7.0 con el fragmento del promotor PvSnRK1. Los componentes y el programa de la PCR se detallan en la figura S8. Se realizó una electroforesis de la PCR y se pudieron observar bandas muy gruesas y oscuras, parecido al control positivo, que es el vector pENTR (figura 12). Esto demuestra que la transformación de *A. rhizogenes* fue exitosa. Finalmente, se crecieron las dos colonias en medio líquido y se guardaron en glicerol a -80° C para poder hacer transformación de plantas.



6.3 Fenotipado de la sobreexpresión de PvSnRK1 en *Phaseolus vulgaris*

6.3.1 Fenotipo de la raíz

Según el protocolo previamente estandarizado (AU - Nanjareddy et al., 2017), cuando las células K599 que contienen el vector de SnRK1-OX (Figura S9) se inyectaron en las regiones de hipocótilo de las plántulas de *Phaseolus*, se notó la aparición de raíces peludas en un lapso de 4-5 días en lugar de 7- 12 días en controles. Para cuando emergieron las raíces peludas visibles en los controles, las raíces que expresan SnRK1 alcanzaron una longitud de 1,5-2 cm. El crecimiento fijo de las raíces continuó durante todo el período de crecimiento de las raíces. Antes de pasar las plantas a tierra se verificó que las raíces estuvieran transformadas, verificando que las raíces control tuvieran fluorescencia verde y las PvSnRK1-OX fluorescencia amarilla (Figura 13a). La longitud de las raíces PvSnRK1-OX fue mayor que la de los controles como se muestra en la Figura 13b. También se encontró que la densidad de raíces laterales aumentó en las raíces de sobreexpresión. Hubo un

aumento drástico en el número de raíces primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias en las raíces que sobreexpresan SnRK1 en comparación con los controles del vector vacío.

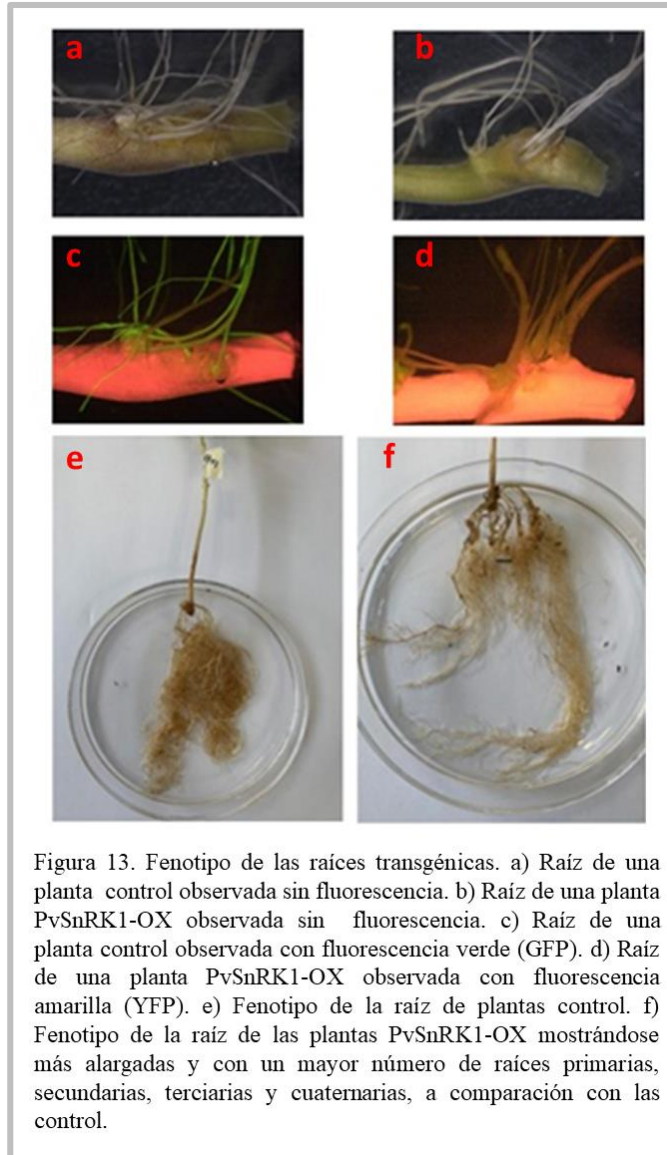


Figura 13. Fenotipo de las raíces transgénicas. a) Raíz de una planta control observada sin fluorescencia. b) Raíz de una planta PvSnRK1-OX observada sin fluorescencia. c) Raíz de una planta control observada con fluorescencia verde (GFP). d) Raíz de una planta PvSnRK1-OX observada con fluorescencia amarilla (YFP). e) Fenotipo de la raíz de plantas control. f) Fenotipo de la raíz de las plantas PvSnRK1-OX mostrándose más alargadas y con un mayor número de raíces primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, a comparación con las control.

6.3.2 Fenotipado de la simbiosis de frijol común y *R. tropici*

Las raíces peludas que expresan el vector de sobreexpresión PvSnRK1-OX y los controles del vector vacío, se inocularon con el cultivo de *R. tropici* 5 días después del trasplante a vermiculita. Se estudió el fenotipo del hilo de infección 5-7 días después de la inoculación. Se observó que los hilos de infección crecían en grandes grupos con cada pelo de raíz infectado asociado con más de un hilo de infección, a diferencia de los controles, donde sólo se encontró un hilo de infección. El número de

eventos de infección por raíz se incrementó considerablemente mostrando 20-22 eventos de infección en PvSnRK1-OX en comparación con 2-5 eventos en los controles.

A los 14 días posteriores a la inoculación, el número de nódulos en PvSnRK1-OX osciló entre 620 y 200, mientras que los controles mostraron entre 20 y 35 nódulos por planta (Figura 14). La morfología de los nódulos de PvSnRK1-OX fue normal, pero hubo una variación en el tamaño de los nódulos (Figura 15). Las imágenes confocales de la sección del nódulo muestran una colonización muy densa del nódulo. El número de células infectadas fue superior al observado en los controles (Figura 16).

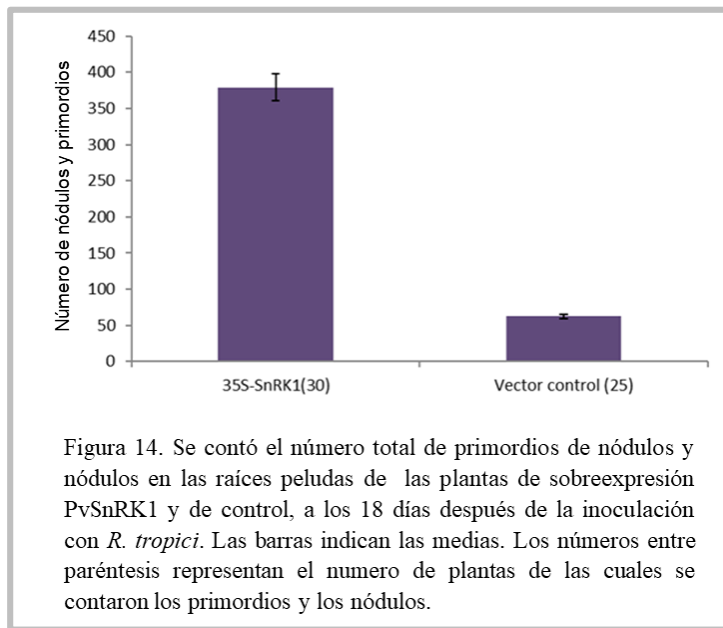
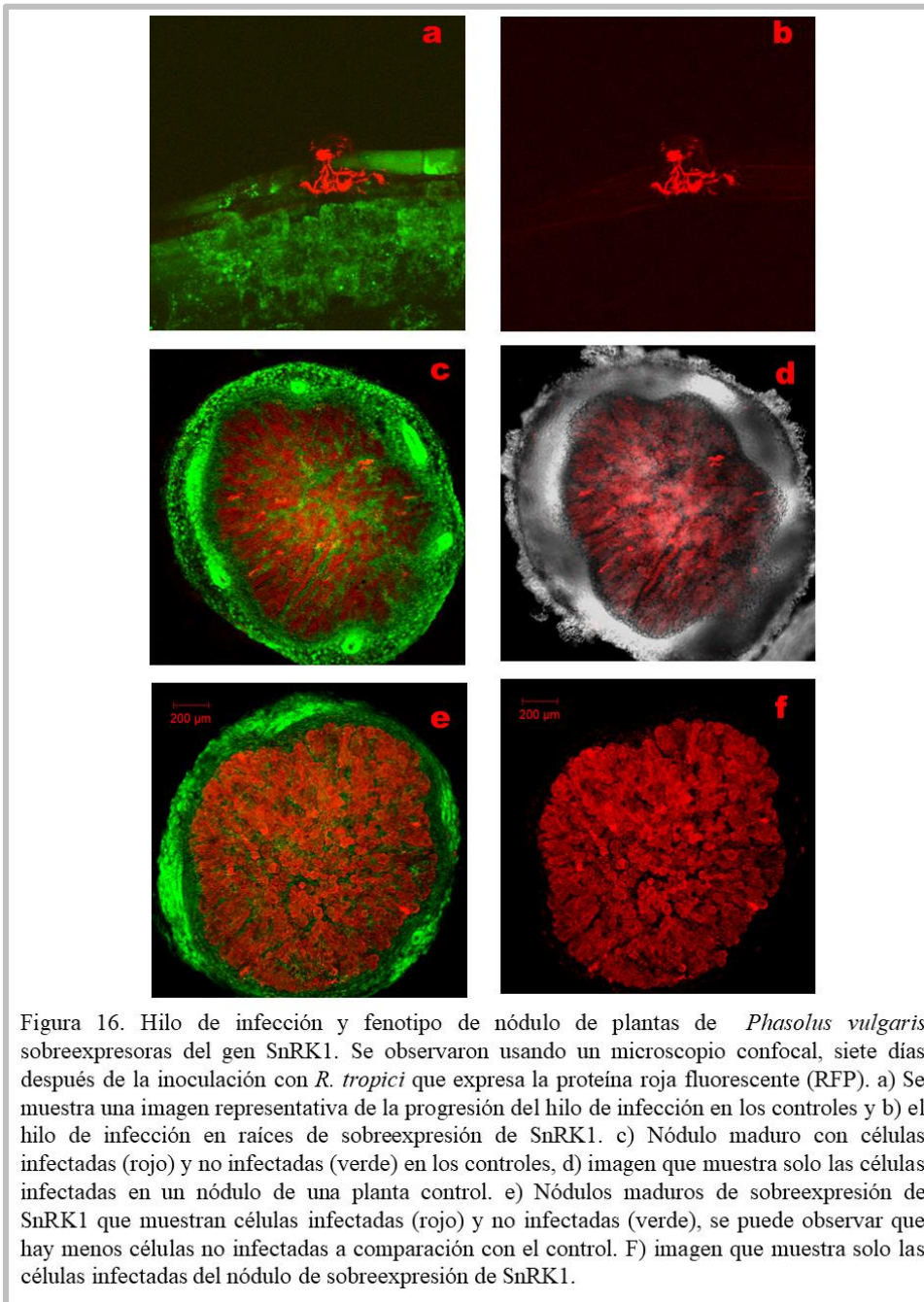




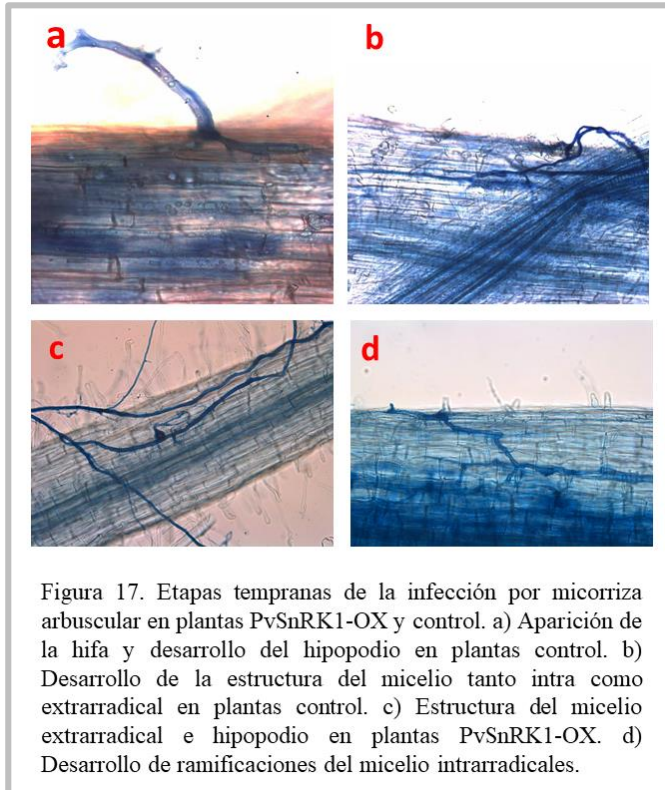
Figura 15. Fenotipo de los nódulos de las plantas de sobreexpresión de PvSnRK1. a) Nódulos de raíces de plantas control de *P. vulgaris*, a los 18 días después de la inoculación con *R. tropici*. b) Un aumento de 10 veces en el número de nódulos en plantas de sobreexpresión de PvSnRK1 a los 18 días después de la inoculación con *R. tropici*. c) Plantas de sobreexpresión de PvSnRK1 que muestran nódulos de diferentes tamaños.

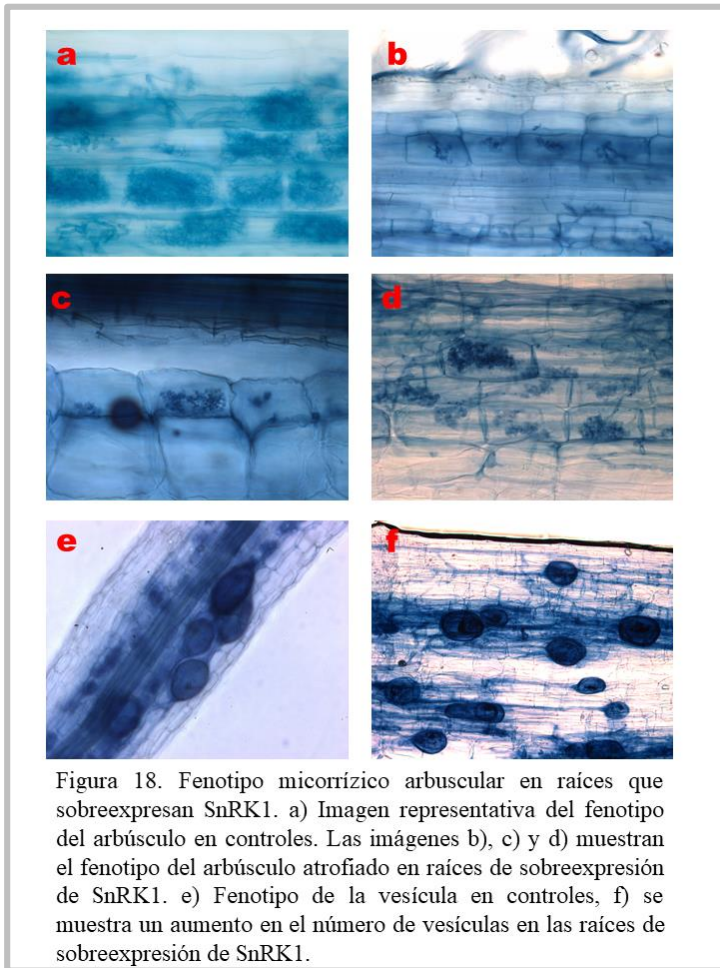


6.3.3 Fenotipado de la simbiosis de frijol común y micorriza arbuscular

Las raíces peludas sobreexpresan PvSnRK1-OX y los controles se inocularon con esporas de *Rhizopus irregularis* con una carga de esporas de 400 por planta 5 días después del trasplante a vermiculita. El fenotipo micorrízico se observó 3 y 5 semanas después de la inoculación. Las raíces se tiñeron con azul tripano usado comúnmente para la tinción de los hongos micorrízicos, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las raíces de PvSNRK1-OX mostraron hipopodios normales y

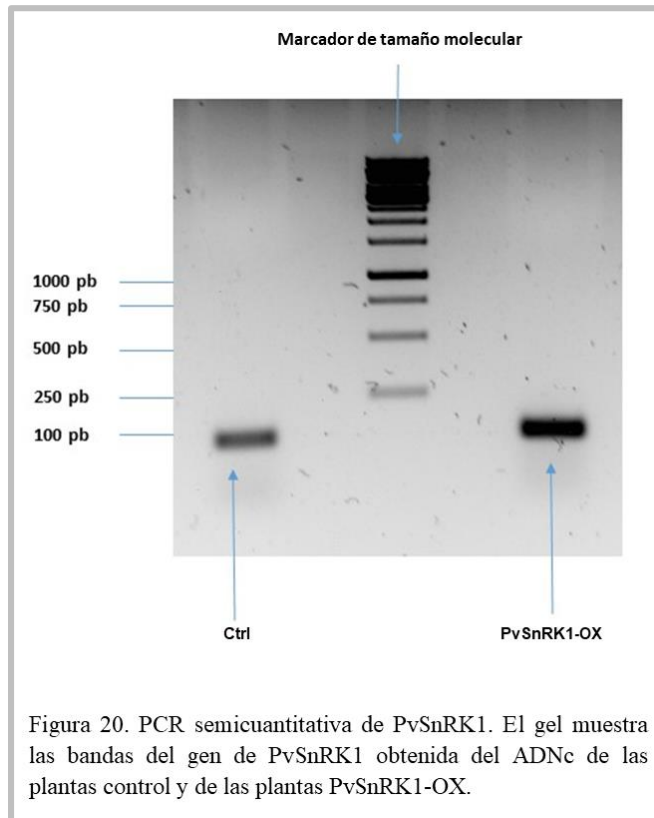
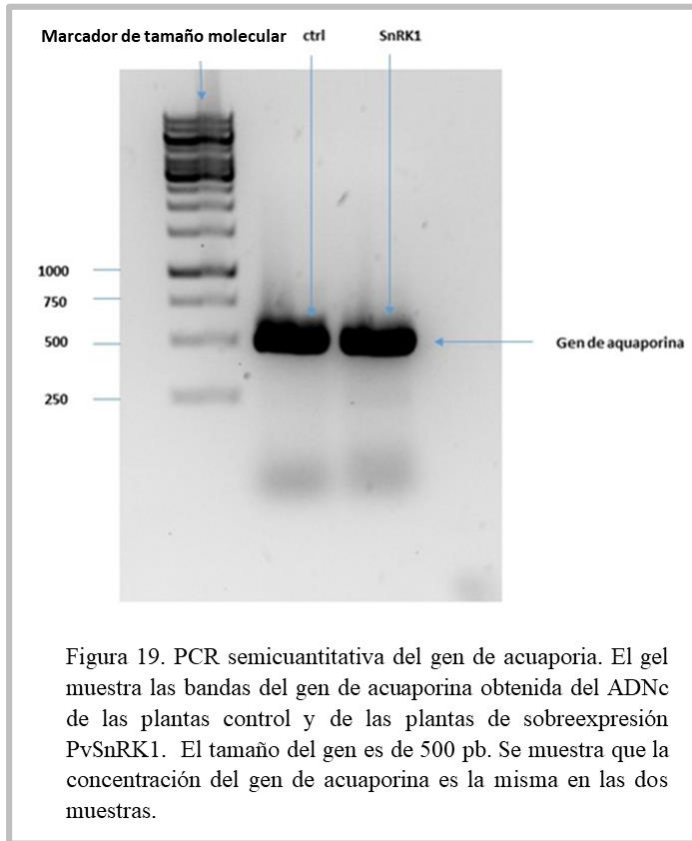
ramificación de micelios tanto intra como extrarradicales de manera normal (Figura 17a y b), igual que las plantas control (Figura 17c y d). Se encontró que los arbusculos eran inmaduros tanto a las 3 como a las 5 semanas después de la inoculación en las raíces de PvSNRK1-OX. Las raíces de control mostraron un desarrollo normal de todas las estructuras fúngicas, incluidos los arbusculos. Se encontró que el número de vesículas en PvSNRK1-OX era mayor que en los controles (Figura 18).





6.3.4 PCR semicuantitativa de raíces transgénicas de plantas control y de sobreexpresión de PvSnRK1

Para estimar el nivel de transcripción del gen PvSnRK1 en las raíces transgénicas de PvSnRK1-OX y el control se utilizaron reacciones de transcripción reversa acopladas a la PCR semicuantitativa. Para ello, se aisló el ARN total de las plantas transgénicas y se utilizó para la transcripción inversa. Primero se realizó una PCR con los oligos específicos para el gen de acuaporina. Los detalles de la PCR se encuentran en la Figura S10. Ésta PCR sirvió para encontrar la cantidad exacta de cada muestra que se utilizaría para la PCR semicuantitativa de PvSnRK1, la Figura 19 muestra que la concentración del gen de acuaporina en las dos muestras es la misma. La reacción RT-PCR semicuantitativa mostró que, si hay una sobreexpresión del gen PvSNRK1 en las plantas transgénicas PvSnRK1-OX, pues la amplificación de este gen fue mayor en comparación con la muestra de plantas control (Figura 20).

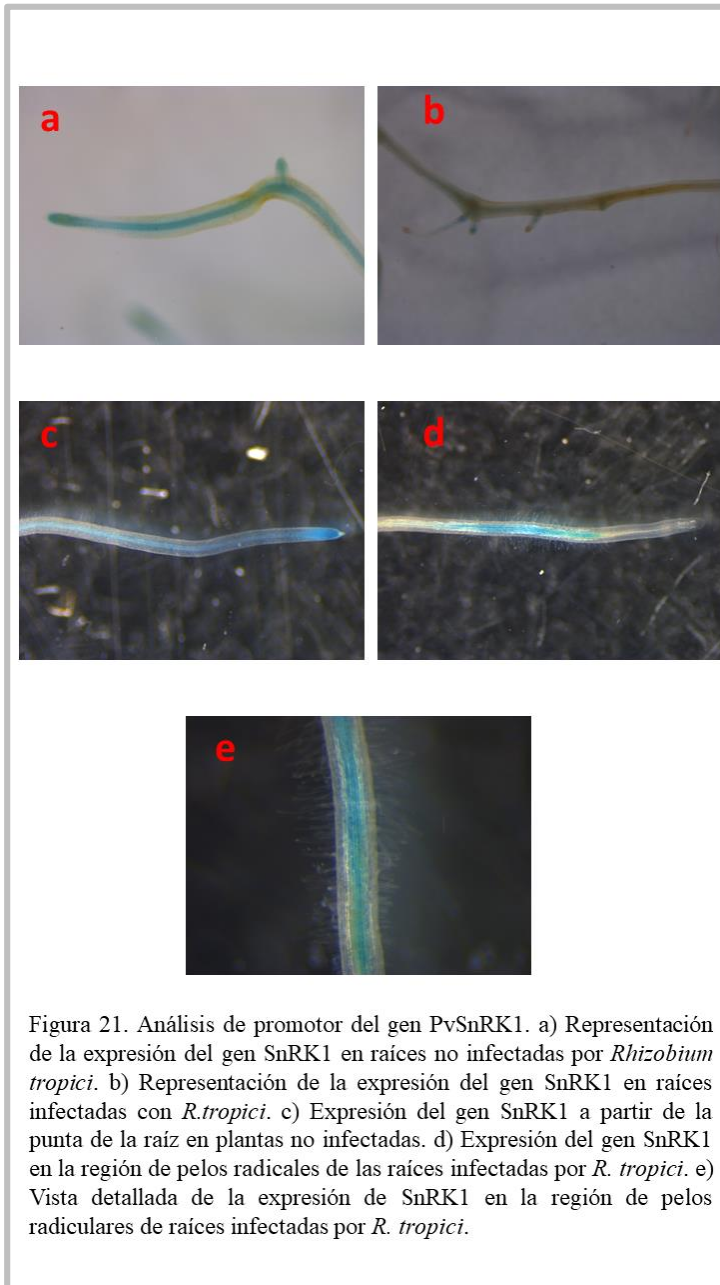


6.4 Análisis de promotor

El análisis de la expresión espacio-temporal del promotor PvSnRK1 se llevó a cabo en condiciones simbióticas (*Rhizobium* y micorrizas) y bajo la influencia del ABA y glucosa a diferentes concentraciones. La expresión del promotor se estudió mediante tinción histoquímica para el gen reportero GUS.

6.4.1 Simbiosis con *Rhizobium*

Para comprender el patrón de expresión del promotor en la etapa de infección temprana de *R. tropici*, la construcción del promotor PvSnRK1 se expresó en el sistema de raíces peludas. Con base en la tinción GUS, se pudo observar la expresión del gen SnRK1 en las raíces de las plantas no infectadas con *R. tropici* y las infectadas. Curiosamente, las plantas no infectadas cuentan con una expresión del gen en las zonas meristemáticas de la raíz (figura 21 a y c). Sin embargo, al llevarse a cabo la infección con *R. tropici* se puede observar que la expresión del gen se da en la zona de pelos radicales de la raíz y no en las zonas de desarrollo (figura 21 b, d y e). Dado que la zona del pelo de la raíz es también la zona más susceptible a la infección por el rizobio, el aumento en la expresión del promotor muestra una respuesta positiva a la presencia del simbionte, lo que sugiere un papel probable de PvSnRK1 en la simbiosis del nódulo de la raíz.



6.4.2 Simbiosis con micorriza arbuscular

Para comprender el patrón de expresión del promotor en la etapa de infección temprana de la micorriza arbuscular, la construcción del promotor PvSnRK1 se expresó en el sistema de raíces peludas. A base de la tinción GUS, se pudo observar la expresión del gen PvSnRK1 en las raíces de las plantas no infectadas con micorriza y las infectadas (Figura 22). Encontramos que la expresión del promotor en las primeras etapas de la infección (5-7 días) se incrementó notablemente en toda la raíz. En comparación con las raíces no inoculadas (Figura 22a), las raíces infectadas mostraron una fuerte expresión del promotor en el

meristemo, la zona de elongación de la raíz y las zonas maduras de manera uniforme (Figura 22b). Dado que la micorriza coloniza todas las zonas de la raíz, el aumento de la expresión sugiere un posible papel del gen PvSnRK1 en la asociación exitosa entre los socios simbióticos.

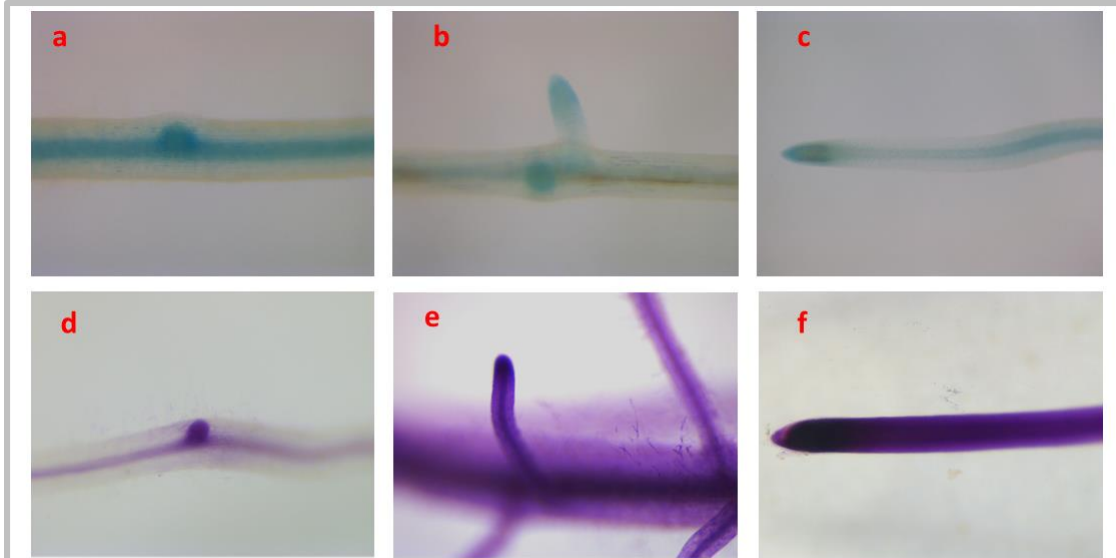


Figura 22. Análisis de la expresión de PvSnRK1 durante la infección con micorriza arbuscular. a) Representación de la expresión de gen PvSnRK1 en raíces en etapa temprana, sin infección. b) Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en raíces en desarrollo, sin infección. c) Expresión del gen PvSnRK1 en la punta de una raíz, sin infección. d) Expresión del gen PvSnRK en raíces en etapa temprana, con infección. e) Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en raíces en desarrollo, con infección. f) Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en la punta de una raíz con infección.

6.4.3 Tratamientos de glucosa y ABA

Para analizar el patrón de expresión del promotor como respuesta a la fitohormona ABA, las raíces peludas que expresan el promotor PvSnRK1 se trataron con 50 y 100 μM de ABA. Se encontró que el promotor se expresaba en los meristemos de las raíces y en algunas partes de los tejidos vasculares (Figura 23). A una concentración de 50 μM (Figura 23b), la expresión fue más fuerte que a 100 μM (Figura 23c). Estas observaciones implican el efecto inhibitorio de ABA sobre la funcionalidad del gen SnRK1.

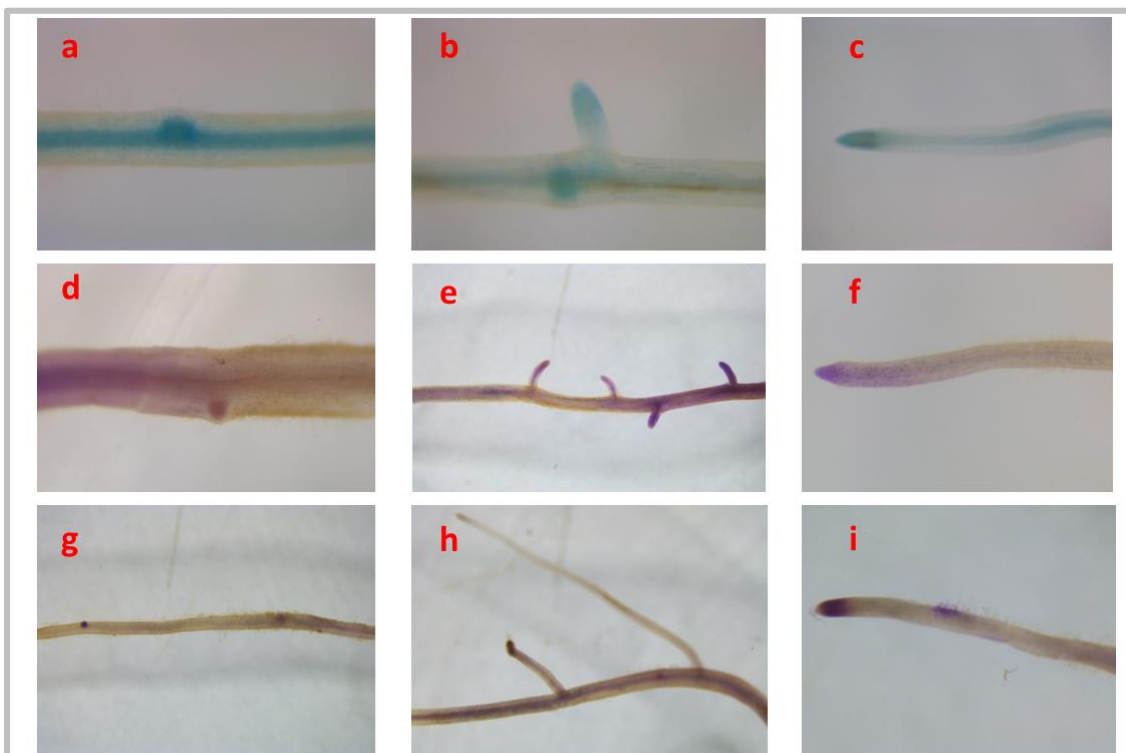
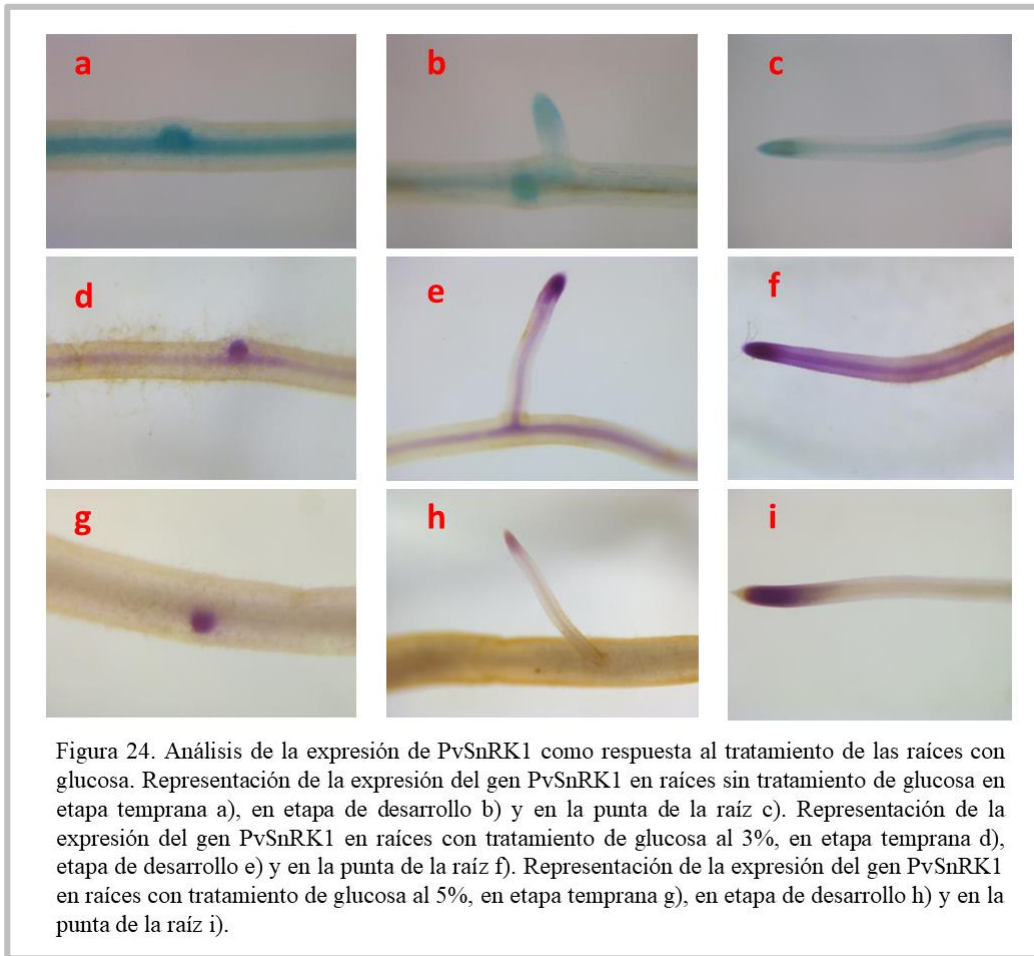


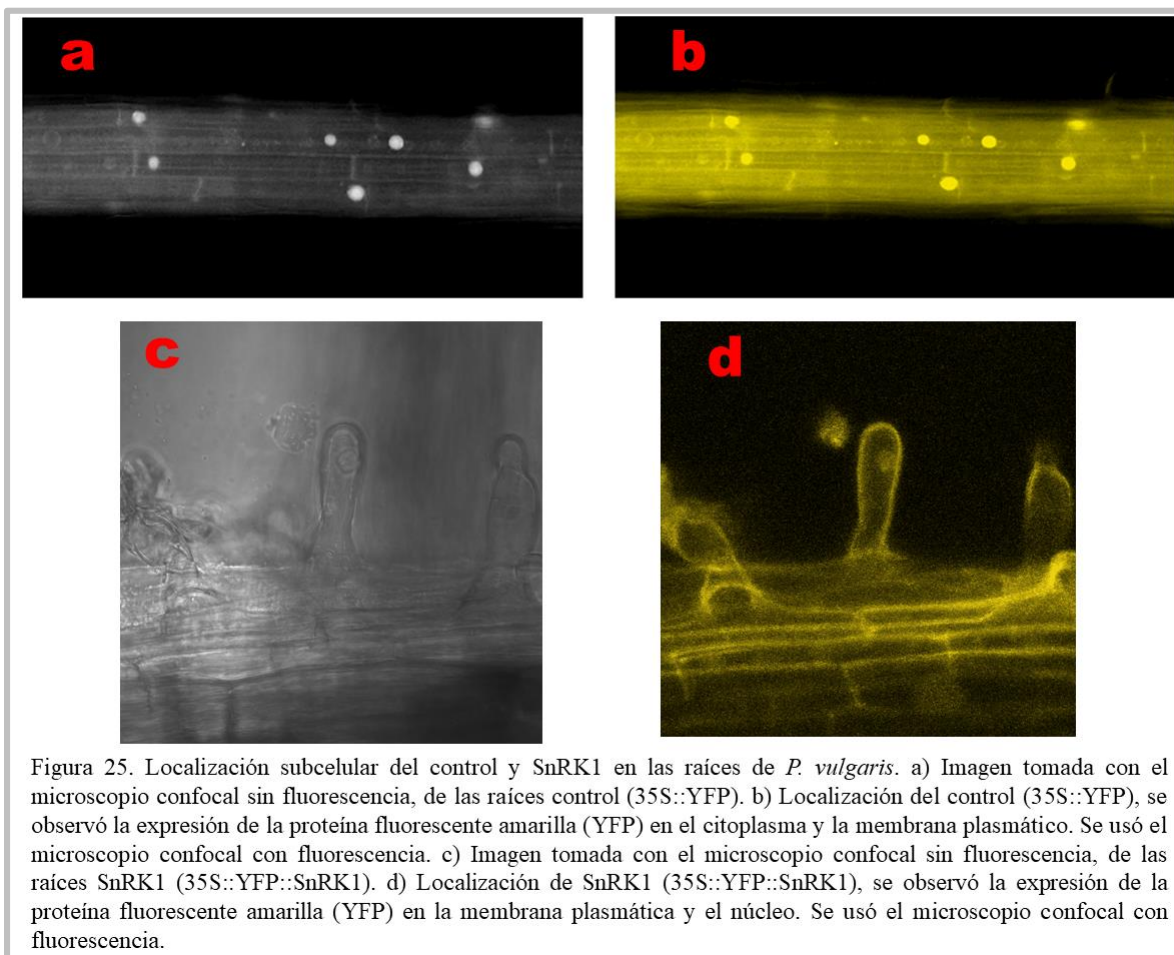
Figura 23. Análisis de la expresión de PvSnRK1 como respuesta al tratamiento de las raíces con ácido abscísico (ABA). Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en raíces sin tratamiento de ABA, en etapa temprana a), en etapa de desarrollo b) y en la punta de la raíz c). Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en raíces con tratamiento de ABA al 50 μ M, en etapa temprana d), etapa de desarrollo e) y en la punta de la raíz f). Representación de la expresión del gen PvSnRK1 en raíces con tratamiento de ABA al 100 μ M, en etapa temprana g), en etapa de desarrollo h) y en la punta de la raíz i).

Además, las raíces que expresan el promotor PvSnRK1 se trataron con glucosa a concentraciones de 3 y 5%. En la Figura 24b se muestra el resultado del tratamiento con glucosa al 3%, se encontró que el promotor se expresaba en los meristemos de la raíz y los tejidos vasculares. La expresión fue más fuerte en raíces tratadas con glucosa al 3% en comparación con los controles y con glucosa al 5% (Figura 24b y c). La expresión del gen PvSnRK1 en los dos tratamientos con glucosa fue menor en comparación con las raíces control (figura 24a). Esto muestra la respuesta de hipersensibilidad de SnRK1 a la glucosa.



6.5 Localización de proteínas SnRK1

El gen completo PvSnRK1 fusionado al gen reportero de fluorescencia amarilla (YFP) se expresó en el sistema de raíces peludas para estudiar la localización subcelular de la proteína. Se encontró que la proteína PvSnRK1 estaba localizada en el núcleo y la membrana plasmática.



7. Discusión

7.1 Análisis bioinformático

En el análisis bioinformático se identificaron 42 miembros de la familia SnRK en *Phaseolus vulgaris*, a diferencia de *Arabidopsis* que sólo contiene 38 (Hrabak et al., 2003). La familia SnRK2 contiene los dominios y motivos catalíticos N-terminal muy conservados, éstos son característico de todas las SNRK, pero en la parte C-terminal no están muy bien conservados. El análisis de motivos conservados y el número y estructura de intrones y exones reveló que la subfamilia SnRK1 está altamente conservada, la subfamilia SnRK2 está muy poco conservada y la subfamilia SnRK3 se puede dividir en dos grupos de genes de acuerdo a su estructura, siendo cada grupo de genes diferente entre sí, pero dentro de cada grupo los genes son muy similares. Esta información nos indica que los genes que se encuentran bien conservados han sufrido menos inserciones y deleciones durante la evolución. El análisis filogenético sirvió para comprobar que la clasificación de los miembros de la familia SnRK fue correcta.

SnRK1, el homólogo funcional de AMPK/SNF1, conserva la estructura heterotrimérica típica con la subunidad α quinasa y las subunidades reguladoras β y γ (Baena-González et al., 2007; Emanuelle et al., 2015 y Broeckx et al., 2016). Las SnRK2 y las 3 quinastas se originaron presumiblemente de un evento de duplicación de genes en el que una copia de la subunidad SnRK α perdió posteriormente la región del dominio regulador (RD) que alberga los dominios UBA y α CTD (Halford & Grahame Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003 y Broeckx et al., 2016). Por lo tanto, SnRK2 suele ser más pequeño que SnRK1 y de naturaleza monomérica. Ellos poseen muy conservadas características catalíticas de dominio (CD) de las quinastas SnRK (Jamsheer et al., 2019). Esto se puede observar en la familia SnRK2 de frijol, pues cuenta con la parte N-terminal bien conservada en la que se incluyen los dominios catalíticos de la familia SnRK. La clase SnRK3/CIPK de las quinastas se caracteriza por la ganancia de un dominio de NAF en el C-terminal del dominio quinasa (Halford & Grahame Hardie, 1998 y Hrabak et al., 2003). A través de este dominio NAF, las quinastas SnRK3 / CIPK se asocian con proteínas similares a la calcineurina B (CBL) de una manera dependiente de Ca^{2+} (Shi et al., 1999; Halfter et al., 2000 y Albrecht et al., 2001).

[Los genes SnRK muestran patrones de expresión diferencial en distintos tejidos vegetativos y reproductivos. La mayor variabilidad de expresión se presenta en las etapas relacionadas con simbiosis. Lo que indica que la familia SnRK juega un papel importante en la simbiosis. Además, se pudo comprobar que la expresión diferencial de los genes se dio a la baja en la mayoría de los miembros de la familia SnRK tanto en simbiosis con micorriza como con *Rhizobium*.

7.2 Fenotipado de la simbiosis de *R. tropici* y plantas de frijol que sobreexpresan el gen PvSnRK1

La subunidad SnRK1 α tiene actividad quinasa independientemente de las subunidades reguladoras. Pues se ha visto que puede fosforilarse y activarse de forma independiente del complejo o dentro del complejo (Maya-Bernal et al., 2017 y Ramon et al., 2019). Se ha observado que sólo una proporción pequeña del SnRK1 α está fosforilada y está asociada con fracciones con alta actividad de quinasa (Zúñiga-Sánchez et al., 2019). La sobreexpresión de SnRK1.1, que representa la subunidad α de *Phaseolus vulgaris*, logró activar la regulación de procesos productores de energía. Esto se vio reflejado en el tamaño y número de nódulos de las plantas, pues a mayor disponibilidad de carbono en la planta mejor es la simbiosis con *Rhizobium*.

7.3 Fenotipado de la simbiosis de la Micorriza arbuscular y plantas de frijol que sobreexpresan el gen PvSnRK1

El fenotipo del arbusculo atrofiado en las raíces que sobreexpresan SnRK1 es una observación importante. La sobreexpresión de SnRK1 da como resultado una mayor disponibilidad de carbono en el huésped, lo que debería promover las estructuras micorrízicas, pero nuestros estudios muestran problemas en el éxito de la simbiosis. Los arbusculos atrofiados/abortados sugieren posibles problemas en la expresión de los genes CSSP como RAM1, RAM2, Vapyrin, VAMP y STR, que son los genes marcadores para el desarrollo del arbusculo (Pumplin et al., 2010; Ivanov

et al., 2012; Gobbato et al., 2013 y Pimprikar et al., 2016). Dado que no está al alcance del presente trabajo, un análisis adicional debería revelar las razones detrás del fenotipo micorrízico en la condición de sobreexpresión de SnRK1 en *P. vulgaris*.

7.4 Análisis del promotor del gen PvSnRK1

Las proteínas quinasas SnRK1 se consideran reguladores centrales del metabolismo (Baena-González et al., 2007 y Polge & Thomas, 2007). Aquí hemos observado que, al aumentar los niveles de glucosa en las raíces de las plantas, la expresión de SnRk1 disminuye. Se ha demostrado que el sensor dirigido por KIN10 o SnRK1.1 en *Arabidopsis* percibe el estrés por el alto contenido de glucosa, modulando la señal del sistema de autofagia constitutiva en las raíces, posiblemente a través de la acción directa o indirecta de TOR. Al percibirse el exceso de glucosa, el sensor de SnRK1.1 se inactiva, activándose de esta manera el complejo TOR y a partir de esto se reprime la autofagia, que es uno de los principales mecanismos de obtención de nutrientes dentro de la planta (Huang et al., 2019).

Se ha señalado que SnRK1 es necesario para activar la autofagia como respuesta a la limitación de nutrientes, el estrés salino, el estrés oxidativo, resistencia a patógenos, entre otros tipos de estreses. Se presume que, tras la privación de nutrientes, SnRK1 se activa con poca energía y, a su vez, activa la autofagia para compensar la deficiencia de nutrientes, lo que contribuye a la tolerancia al estrés (Soto-Burgos & Bassham, 2017). Por ejemplo, durante el estrés salino, los niveles de ácido abscísico (ABA) aumentan (Nambara & Marion-Poll, 2005). Lo que potencialmente puede conducir a la activación del complejo SnRK1, promoviendo así la autofagia (Rodrigues et al., 2013).

Por otro lado, el proceso de infección de *Rhizobium* se da a partir de los pelos radicales. Ocurre una reorientación del crecimiento de la pared celular que puede conducir a la deformación del pelo de la raíz, el rizado y el atrapamiento de las bacterias infectantes. Esto debido a los factores NOD de las bacterias (Gage, 2020). En nuestro análisis de promotor, durante la infección con *Rhizobium* logramos encontrar que la expresión del gen PvSnRK1 cambia de las zonas de la punta de la raíz a las zonas de los pelos radicales. Esto nos muestra que al llevarse a cabo la infección por la bacteria se promueve la expresión de SnRK1, para proporcionarle carbono a la bacteria y de esta manera mejorar la su simbiosis con la planta. En el caso de la micorriza, la infección se puede dar en cualquier parte de la raíz, por lo tanto, la expresión de SnRK1 se vio aumentada en toda la raíz durante la infección con la micorriza.

8. Conclusiones

- SnRK1 ejerce un papel muy importante en la regulación del metabolismo del carbono en la planta, pues se activa o se apaga dependiendo de la disponibilidad de carbono.
- Los miembros de la familia SnRK, SnRK1, SnRK2 y SnRK3 están altamente conservados en sus dominios de quinasa y los dominios específicos de cada familia.

- Los genes SnRK se expresan diferencialmente en tejidos de *P. vulgaris* y también durante la simbiosis con *Rhizobium* y micorriza.
- La sobreexpresión del gen SnRK1 resultó en un aumento en el volumen y la longitud de la raíz.
- Hubo un aumento en el número de nódulos en raíces que sobreexpresan SnRK1.
- La asociación simbiótica con micorrizas se vio afectada durante la maduración de los arbúsculos.
- Se encontró que el promotor SnRK1 se expresa espacial y temporalmente en las puntas de las raíces en crecimiento y las estructuras simbióticas.
- SnRK1 juega un papel indispensable durante la simbiosis con *Rhizobium* y la micorriza, pues ayuda a que el carbono esté disponible en la planta para satisfacer las necesidades de los simbioses.

9. Bibliografía

- Akiyama, K., Matsuzaki, K., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., & Kudla, J. (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. *The EMBO Journal*, 20(5), 1051–1063. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1051>
- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P. R., & 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 LP – 8605. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8602>
- An, J., Zeng, T., Ji, C., de Graaf, S., Zheng, Z., Xiao, T. T., Deng, X., Xiao, S., Bisseling, T., Limpens, E., & Pan, Z. (2019). A *Medicago truncatula* SWEET transporter implicated in arbuscule maintenance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 224(1), 396–408. <https://doi.org/10.1111/nph.15975>
- Arthikala, M.-K., Nanjareddy, K., & Lara, M. (2018). In BPS1 Downregulated Roots, the BYPASS1 Signal Disrupts the Induction of Cortical Cell Divisions in Bean-Rhizobium Symbiosis. In *Genes* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/genes9010011>
- Assmann, S. M., & Wang, X.-Q. (2001). From milliseconds to millions of years: guard cells and environmental responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 421–428.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
- Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 13(9), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.006>
- Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124(3), 949–958.
- Balestrini, R., Berta, G., & Bonfante, P. (1992). The plant nucleus in mycorrhizal roots: positional and structural modifications. *Biology of the Cell*, 75(3), 235–243. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(92\)90145-Q](https://doi.org/10.1016/0248-4900(92)90145-Q)
- Barea, J. M., & Azcon-Aguilar, C. (1983). Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. In *Advances in agronomy* (Vol. 36, pp. 1–54). Elsevier.
- Belmondo, S., Calcagno, C., Genre, A., Puppo, A., Pauly, N., & Lanfranco, L. (2016). The *Medicago truncatula*

MtRbohE gene is activated in arbusculated cells and is involved in root cortex colonization. *Planta*, 243(1), 251–262. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2407-0>

Broeckx, T., Hulsmans, S., & Rolland, F. (2016). The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6215–6252.

Chee, J. Y., & Chin, C. F. (2015). Gateway cloning technology: Advantages and drawbacks. *Cloning Transgenes*, 4, 138.

Choi, J., Summers, W., & Paszkowski, U. (2018). Mechanisms Underlying Establishment of Arbuscular Mycorrhizal Symbioses. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 135–160. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521>

Coello, P., Hirano, E., Hey, S. J., Muttucumaru, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M. A. J., & Halford, N. G. (2011). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 913–924.

Cox, M., & Nelson, D. (2000). Lehninger Principles of Biochemistry. In *Wh Freeman* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08289-8>

Crespi, & Galvez. (2000). Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s003440000023>

Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C. A., & Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*, 5, 190.

Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>

De Block, M., & Van Lijsebettens, M. (2011). Energy efficiency and energy homeostasis as genetic and epigenetic components of plant performance and crop productivity. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 275–282.

del Cerro, P., Ayala-García, P., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Vinardell, J. M., Megías, M., Hungria, M., Gil-Serrano, A. M., Pérez-Montaño, F., & Ollero, F. J. (2019). The non-flavonoid inducible nodA3 and the flavonoid regulated nodA1 genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899 guarantee nod factor production and nodulation of different host legumes. *Plant and Soil*, 440(1), 185–200. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04073-2>

del Cerro, P., Rolla-Santos, A. A. P., Valderrama-Fernández, R., Gil-Serrano, A., Bellogín, R. A., Gomes, D. F., Pérez-Montaño, F., Megías, M., Hungría, M., & Ollero, F. J. (2016). NrcR, a New Transcriptional Regulator of

- Rhizobium tropici CIAT 899 Involved in the Legume Root-Nodule Symbiosis. *PLOS ONE*, *11*(4), e0154029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154029>
- Dickson, S. (2004). The Arum–Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, *163*(1), 187–200. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01095.x>
- Drevon, J.-J., Alkama, N., Bargaz, A., Rodiño, A. P., Sungthongwises, K., & Zaman-Allah, M. (2015). *The Legume–Rhizobia Symbiosis BT - Grain Legumes* (A. M. De Ron (ed.); pp. 267–290). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_9
- Eardly, B. D., Wang, F.-S., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1995). Species limits in Rhizobium populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.*, *61*(2), 507–512.
- Edel, K. H., & Kudla, J. (2015). Increasing complexity and versatility: how the calcium signaling toolkit was shaped during plant land colonization. *Cell Calcium*, *57*(3), 231–246.
- Emanuelle, S., Hossain, M. I., Moller, I. E., Pedersen, H. L., van de Meene, A. M. L., Doblin, M. S., Koay, A., Oakhill, J. S., Scott, J. W., & Willats, W. G. T. (2015). SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *The Plant Journal*, *82*(2), 183–192.
- Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2003). Signaling Interactions During Nodule Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, *22*(1), 47–72. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0032-9>
- Fernández-Pascual, M., Pueyo, J. J., Felipe, M., Golvano, M. P., & Lucas, M. M. (2007). *Singular features of the Bradyrhizobium-Lupinus symbiosis*.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *59*, 387–415.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L., & McCoy, E. (2002). *Root nodule bacteria and leguminous plants* (Issue 5). UW-Madison Libraries Parallel Press.
- Fujii, H., Verslues, P. E., & Zhu, J.-K. (2011). *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1717–1722.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, *124*(4), 509–525.
- Gage, D. J. (2020). Infection thread development in model legumes. In *The Model Legume Medicago truncatula* (pp. 579–588). <https://doi.org/doi:10.1002/9781119409144.ch72>

- Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M., & McCourt, P. (2004). The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell*, 7(3), 373–385.
- Genre, A., Chabaud, M., Balzergue, C., Puech-Pagès, V., Novero, M., Rey, T., Fournier, J., Rochange, S., Bécard, G., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist*, 198(1), 190–202. <https://doi.org/10.1111/nph.12146>
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D. G., & Bonfante, P. (2008). Prepenetration Apparatus Assembly Precedes and Predicts the Colonization Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi within the Root Cortex of Both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *The Plant Cell*, 20(5), 1407 LP – 1420. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059014>
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., & Barker, D. G. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell*, 17(12), 3489 LP – 3499. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035410>
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., & McCourt, P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(7), 1117–1126.
- Gobbato, E., Wang, E., Higgins, G., Bano, S. A., Henry, C., Schultze, M., & Oldroyd, G. E. D. (2013). RAM1 and RAM2 function and expression during arbuscular mycorrhizal symbiosis and *Aphanomyces euteiches* colonization. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10), e26049.
- 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., & Grahame Hardie, D. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology*, 37(5), 735–748. <https://doi.org/10.1023/A:1006024231305>
- Halford, N. G., Hey, S., Jhurrea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M., & Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 467–475.
- Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J.-K. (2000). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3735–3740.
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New*

Phytologist, 151(1), 175–183.

- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788–1795. <https://doi.org/10.1101/gr.143000>
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 2408.
- Hey, S. J., Byrne, E., & Halford, N. G. (2009). The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany*, 105(2), 197–203.
- Ho, C.-H., Lin, S.-H., Hu, H.-C., & Tsay, Y.-F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 138(6), 1184–1194.
- Ho, I., & Trappe, J. M. (1973). Translocation of ¹⁴C from Festuca plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature New Biology*, 244(131), 30.
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., & Sussman, M. R. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology*, 132(2), 666–680.
- Huang, L., Yu, L.-J., Zhang, X., Fan, B., Wang, F.-Z., Dai, Y.-S., Qi, H., Zhou, Y., Xie, L.-J., & Xiao, S. (2019). Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in Arabidopsis. *Autophagy*, 15(3), 407–422. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1520547>
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development*, 24(16), 1695–1708.
- Huertas, R., Olias, R., Eljakaoui, Z., GÁLVEZ, F. J., Li, J. U. N., DE MORALES, P. A. Z. A., Belver, A., & RODRÍGUEZ-ROSALES, M. P. (2012). Overexpression of SISOS2 (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato. *Plant, Cell & Environment*, 35(8), 1467–1482.
- Hungria, M., de S Andrade, D., de O Chueire, L. M., Probanza, A., Gutierrez-Mañero, F. J., & Megías, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11–12), 1515–1528.
- Ivanov, S., Fedorova, E. E., Limpens, E., De Mita, S., Genre, A., Bonfante, P., & Bisseling, T. (2012). *Rhizobium*–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8316 LP – 8321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200407109>

- Jamsheer K, M., Singh, D., Sharma, M., Sharma, M., Jindal, S., Mannully, C. T., Shukla, B. N., & Laxmi, A. (2019). The FCS-LIKE ZINC FINGER 6 and 10 are involved in regulating osmotic stress responses in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, 14(6), 1592535. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1592535>
- Jossier, M., Bouly, J., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., & Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 59(2), 316–328.
- Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 571–589. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>
- Khan, A. S., & Ali, S. (2018). *Chapter 9 - Preharvest Sprays Affecting Shelf Life and Storage Potential of Fruits* (M. W. B. T.-P. M. of P. F. and V. Q. Siddiqui (ed.); pp. 209–255). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809807-3.00009-3>
- Kim, K.-N., Cheong, Y. H., Grant, J. J., Pandey, G. K., & Luan, S. (2003). CIPK3, a calcium sensor–associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(2), 411–423.
- Kistner, C., & Parniske, M. (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science*, 7(11), 511–518. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02356-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02356-7)
- Koltai, H., & Kapulnik, Y. (2010). *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Springer Science & Business Media.
- Kulik, A., Anielska-Mazur, A., Bucholc, M., Koen, E., Szymańska, K., Żmieńko, A., Krzywińska, E., Wawer, I., McLoughlin, F., & Ruszkowski, D. (2012). SNF1-related protein kinases type 2 are involved in plant responses to cadmium stress. *Plant Physiology*, 160(2), 868–883.
- Lemke, R. L., Zhong, Z., Campbell, C. A., & Zentner, R. (2007). Can pulse crops play a role in mitigating greenhouse gases from North American agriculture? *Agronomy Journal*, 99(6), 1719–1725.
- Li, L., Kim, B.-G., Cheong, Y. H., Pandey, G. K., & Luan, S. (2006). A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12625 LP – 12630. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605129103>
- 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, Y., & Bassham, D. C. (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 5(7), e11883.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A., & Poole, P. S. (2003). Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, 422(6933), 722–726.
- Luginbuehl, L. H., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Understanding the Arbuscule at the Heart of Endomycorrhizal Symbioses in Plants. *Current Biology*, 27(17), R952–R963.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.042>
- Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H. M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.-R., Carillo, P., Hajirezaei, M.-R., & Stitt, M. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 397(1), 139–148.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064–1068.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E. A., Driguez, H., Bécard, G., & Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature09622>
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchler, T., & Nägele, T. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *Elife*, 4, e05828.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3), 417–426.
- Maya-Bernal, J. L., Ávila, A., Ruiz-Gayosso, A., Trejo-Fregoso, R., Pulido, N., Sosa-Peinado, A., Zúñiga-Sánchez, E., Martínez-Barajas, E., Rodríguez-Sotres, R., & Coello, P. (2017). Expression of recombinant SnRK1 in *E. coli*. Characterization of adenine nucleotide binding to the SnRK1. 1/AKIN β γ - β 3 complex. *Plant Science*, 263, 116–125.
- Muraro, D., Byrne, H., King, J., & Bennett, M. (2013). The role of auxin and cytokinin signalling in specifying the root architecture of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Theoretical Biology*, 317, 71–86.
- Mustilli, A.-C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., & Giraudat, J. (2002). *Arabidopsis* OST1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen

Species Production. *The Plant Cell*, 14(12), 3089 LP – 3099. <https://doi.org/10.1105/tpc.007906>

Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32(7), 959–970.

Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165–185. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>

Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Aguirre, A.-L., Gómez, B.-M., & Lara, M. (2017). Plant Promoter Analysis: Identification and Characterization of Root Nodule Specific Promoter in the Common Bean. *JoVE*, 130, e56140. <https://doi.org/doi:10.3791/56140>

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 LP – 2020. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>

Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M., Affantrange, X. A., Sánchez, F., & Lara, M. (2014). Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 281–298.

Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 3963–3966.

Parniske, M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 320–328. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00088-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00088-1)

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763.

Piao, H., Xuan, Y., Park, S. H., Je, B. Il, Park, S. J., Park, S. H., Kim, C. M., Huang, J., Wang, G. K., & Kim, M. J. (2010). OsCIPK31, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants. *Molecules and Cells*, 30(1), 19–27.

Pimprakar, P., Carbonnel, S., Paries, M., Katzer, K., Klingl, V., Bohmer, M. J., Karl, L., Floss, D. S., Harrison, M. J., Parniske, M., & Gutjahr, C. (2016). A CCaMK-CYCLOPS-DELLA Complex Activates Transcription of RAM1 to Regulate Arbuscule Branching. *Current Biology*, 26(8), 987–998. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.01.069>

Polge, C., & Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?

Trends in Plant Science, 12(1), 20–28.

- Poole, P., & Allaway, D. (2000). *Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium*.
- Pumplin, N., & Harrison, M. J. (2009). Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in *Medicago truncatula* Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Plant Physiology*, 151(2), 809 LP – 819. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141879>
- Pumplin, N., Mondo, S. J., Topp, S., Starker, C. G., Gantt, J. S., & Harrison, M. J. (2010). *Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*, 61(3), 482–494.
- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8436–8441.
- Ramon, M., Dang, T. V. T., Broeckx, T., Hulsmans, S., Crepin, N., Sheen, J., & Rolland, F. A. (2019). Default activation and nuclear translocation of the plant cellular energy sensor SnRK1 regulate metabolic stress responses and development. *The Plant Cell*, tpc.00500.2018. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00500>
- Reboul, J., Vaglio, P., Tzellas, N., Thierry-Mieg, N., Moore, T., Jackson, C., Shin-i, T., Kohara, Y., Thierry-Mieg, D., & Thierry-Mieg, J. (2001). Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nature Genetics*, 27(3), 332–336.
- Redden, R. J., Yadav, S. S., Maxted, N., Dooloo, M. E., Guarino, L., & Smith, P. (2015). *Crop wild relatives and climate change*. John Wiley & Sons.
- Reece-Hoyes, J. S., & Walhout, A. J. M. (2018). Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), pdb.top094912-pdb.top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>
- Rodiño, P. A., Santalla, M., De Ron, A. M., & Drevon, J.-J. (2010). *Co-evolution and Migration of Bean and Rhizobia in Europe BT - Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science* (E. Lichtfouse (ed.); pp. 171–188). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8_7
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumbreras, V., & González-Guzmán, M. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 3871–3884.
- Sanginga, N., Dashiell, K. E., Diels, J., Vanlauwe, B., Lysasse, O., Carsky, R. J., Tarawali, S., Asafo-Adjei, B., Menkir, A., & Schulz, S. (2003). Sustainable resource management coupled to resilient germplasm to provide new intensive cereal–grain–legume–livestock systems in the dry savanna. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 100(2–3), 305–314.

- Sattelmacher, B., Mühling, K., & Penneweiß, K. (1998). The apoplast—its significance for the nutrition of higher plants. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, *161*(5), 485–498.
- Schluepmann, H., Berke, L., & Sanchez-Perez, G. F. (2012). Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3379–3390.
- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P. E., Douds, D., Osman, S. F., Doner, L. W., & Ratcliffe, R. G. (1995). Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology*, *108*(1), 7–15.
- Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, *53*(366), 33–37.
- Shi, J., Kim, K.-N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S., & Kudla, J. (1999). Novel protein kinases associated with calcineurin B–like calcium sensors in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *11*(12), 2393–2405.
- Smith, S. E., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 227–250.
- Song, Y., Zhang, H., You, H., Liu, Y., Chen, C., Feng, X., Yu, X., Wu, S., Wang, L., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Y., & Ding, X. (2019). Identification of novel interactors and potential phosphorylation substrates of GsSnRK1 from wild soybean (*Glycine soja*). *Plant, Cell & Environment*, *42*(1), 145–157. <https://doi.org/10.1111/pce.13217>
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, *12*(8), e0182591.
- Sreenivasulu, N., Radchuk, V., Alawady, A., Borisjuk, L., Weier, D., Staroske, N., Fuchs, J., Miersch, O., Strickert, M., & Usadel, B. (2010). De-regulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant *seg8*. *The Plant Journal*, *64*(4), 589–603.
- Sreenivasulu, N., Radchuk, V., Strickert, M., Miersch, O., Weschke, W., & Wobus, U. (2006). Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *The Plant Journal*, *47*(2), 310–327.
- Srivastava, L. M. (2002). *CHAPTER 10 - Abscisic Acid* (L. M. B. T.-P. G. and D. Srivastava (ed.); pp. 217–232). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50151-9>
- Stacey, G., & Shibuya, N. (1997). Chitin recognition in rice and legumes. *Plant and Soil*, *194*(1), 161–169. <https://doi.org/10.1023/A:1004244104972>
- Steinhorst, L., & Kudla, J. (2013). Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiology*, *163*(2), 471–485.

- Stougaard, J. (2001). Genetics and genomics of root symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 328–335. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00181-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00181-3)
- Tang, R.-J., Zhao, F.-G., Garcia, V. J., Kleist, T. J., Yang, L., Zhang, H.-X., & Luan, S. (2015). Tonoplast CBL–CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(10), 3134–3139.
- Tsai, A. Y.-L., & Gazzarrini, S. (2012). Overlapping and distinct roles of AKIN10 and FUSCA3 in ABA and sugar signaling during seed germination. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1238–1242.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant & Cell Physiology*, 51(11), 1821–1839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq156>
- van der Heijden, M., Rinaudo, V., Verbruggen, E., Scherrer, C., Bärberi, P., & Giovannetti, M. (2008). *The significance of mycorrhizal fungi for crop productivity and ecosystem sustainability in organic farming systems*.
- Vance, C. P. (2000). In Prokaryotic Nitrogen Fixation (ed. Triplett, E.) 589–607 (Horizon Scientific. Wymondham, UK).
- Voisin, A.-S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M.-H., Magrini, M.-B., Meynard, J.-M., Mougel, C., Pellerin, S., & Pelzer, E. (2014). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 361–380.
- Walhout, A. J. M., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S., & Vidal, M. (2000). [34] GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods in Enzymology*, 328, 575-IN7.
- Wang, F., Ren, G., Li, F., Wang, B., Yang, Y., Ma, X., Niu, Y., Ye, Y., Chen, X., Fan, S., Wang, T., & Zhou, Q. (2018). Overexpression of GmSnRK1, a soybean sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 1 gene, results in directional alteration of carbohydrate metabolism in transgenic Arabidopsis. *BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT*, 32(4), 835–845. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1469431>
- Wang, J., Guan, H., Dong, R., Liu, C., Liu, Q., Liu, T., Wang, L., & He, C. (2019). Overexpression of maize sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 1 genes, ZmSnRK1s, causes alteration in carbon metabolism and leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Gene*, 691, 34–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.12.039>
- Wang, Y., Yan, H., Qiu, Z., Hu, B., Zeng, B., Zhong, C., & Fan, C. (2019). Comprehensive Analysis of SnRK Gene Family and their Responses to Salt Stress in Eucalyptus grandis. In *International Journal of Molecular*

- Wright, D. P., Read, D. J., & Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, *21*(9), 881–891.
- Xu, J., Li, H.-D., Chen, L.-Q., Wang, Y., Liu, L.-L., He, L., & Wu, W.-H. (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell*, *125*(7), 1347–1360.
- Yang, L., Ji, W., Gao, P., Li, Y., Cai, H., Bai, X., Chen, Q., & Zhu, Y. (2012). GsAPK, an ABA-activated and calcium-independent SnRK2-type kinase from *G. soja*, mediates the regulation of plant tolerance to salinity and ABA stress. *PLoS One*, *7*(3), e33838.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four A rhabdopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*, *38*(1), 35–49.
- Zhang, Y., Primavesi, L. F., Jhurreea, D., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Powers, S. J., Schluempmann, H., Delatte, T., Winkler, A., & Paul, M. J. (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiology*, *149*(4), 1860–1871.
- Zhao, J., Yu, A., Du, Y., Wang, G., Li, Y., Zhao, G., Wang, X., Zhang, W., Cheng, K., & Liu, X. (2019). Foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv) CIPKs are responsive to ABA and abiotic stresses. *PLoS One*, *14*(11).
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, *167*(2), 313–324.
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, *543*(7645), 328–336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>
- Zúñiga-Sánchez, E., Rodríguez-Sotres, R., Coello, P., & Martínez-Barajas, E. (2019). Effect of catalytic subunit phosphorylation on the properties of SnRK1 from *Phaseolus vulgaris* embryos. *Physiologia Plantarum*, *165*(3), 632–643.

10. Anexos

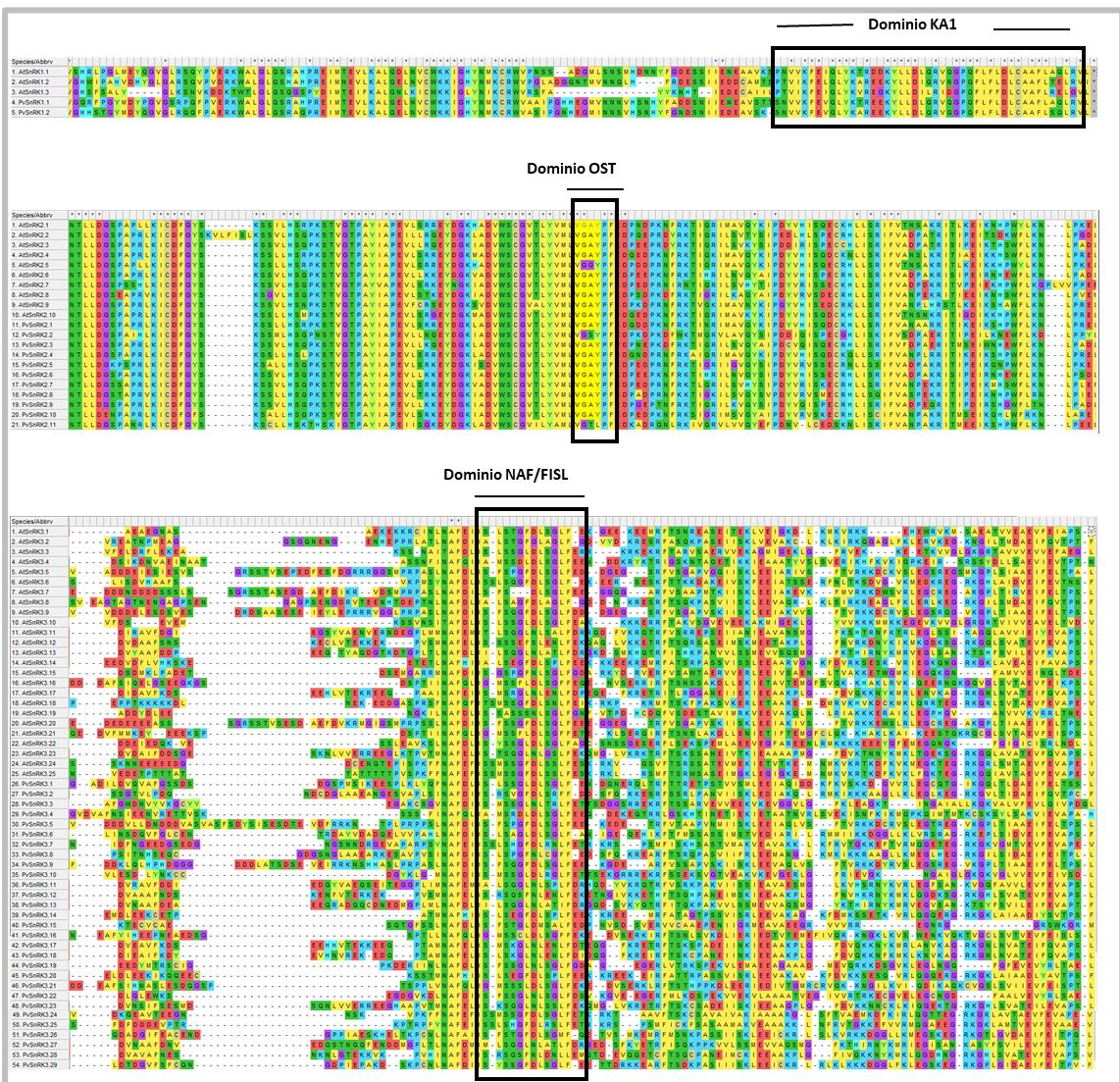


Figura S1. Alineación de secuencias múltiple de genes SnRK en *Phaseolus vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*. Las secuencias se alinearon utilizando ClustalW. Se puede ver marcado con un recuadro negro el dominio conservado KA1 (PF02149) característico de la subfamilia SnRK1, el dominio OST característico de la subfamilia SnRK2 y el dominio NAF/FISL (IPR018451) característico de la subfamilia SnRK3.

PrSnRK1 For: CAC CCA ACT GTA CAT ACC CTC TTT GTC C
PrSnRK1 Rev: GCA TTT CGG AGT GTT GTT GGA GTG AAC

Figura S2. Secuencia de los oligos de amplificación del promotor PvSnRK1. Se añadieron las bases CACC marcadas con azul en el oligo Forward para que la secuencia del promotor pueda unirse al vector de entrada pENTR/D-TOPO.

PARA 50 µL			
5x superFi buffer			10 µL
10mM dNTPs mix			1 µL
10mM primers mix			5 µL
Template DNA			4 µL
Platinum superFi taq			0.5 µL
Agua			29.5 µL
PROGRAMA			
98°C	98°C	56 y 57°C	72°C
2 min	20 s	45s	1 min
			10 min
		34 ciclos	

Figura S3. Programa y componentes de la reacción de PCR de amplificación del promotor PvSnRK1.

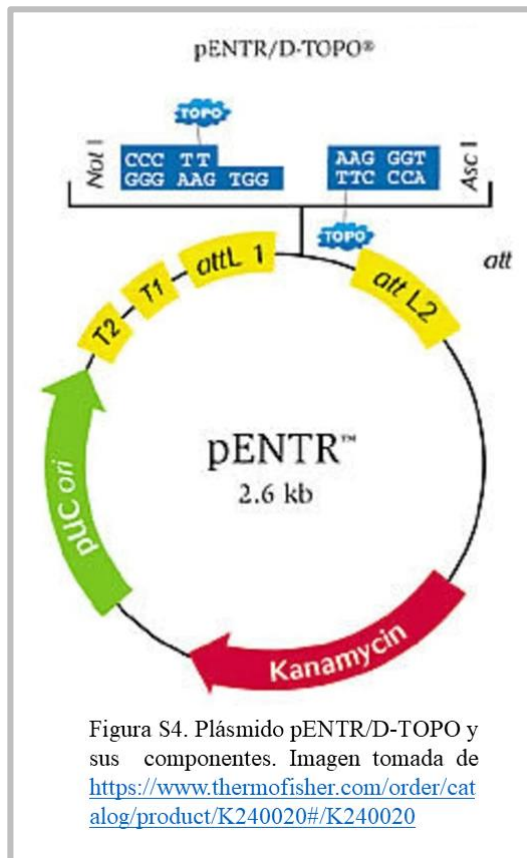


Figura S4. Plásmido pENTR/D-TOPO y sus componentes. Imagen tomada de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K240020#K240020>

