



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *ATG9b* Y CLONACIÓN DE GEN
INTERACTUANTE EN LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *R.*
TROPICI Y *P. VULGARIS*.**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

PAULA SOFÍA ARTOLA ROCHA

TUTOR:

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

Quiero comenzar agradeciendo de manera muy especial a la Dra. Kalpana Nanjareddy por aceptarme en su equipo de laboratorio, por todo el apoyo brindado a lo largo de este proyecto, por ser una tutora, maestra y persona extraordinaria, gracias por la paciencia y por compartir conmigo sus conocimientos que me permitieron alcanzar metas que veía muy lejanas. También agradezco profundamente al Dr. Manoj Kumar por ser un excelente asesor y maestro, gracias por su paciencia y amabilidad, por compartir conmigo consejos que me fueron muy útiles a lo largo de este trayecto. A ambos les agradezco profundamente el haberme transmitido su pasión por la ciencia.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio por todo el apoyo brindado, especialmente a Brenda, Tona, Caro, Dany y Cass. Volvieron muy agradable el tiempo trabajando juntos en el laboratorio, fue un honor tener tantos logros juntos, muchas gracias.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a DGAPA/PAPIIT-UNAM por financiar parcialmente esta investigación No. IN216321 a K.N. y No. IN213221 a M-K. A., así como a CONACYT MI-20191017134234199/316538 a M-K. A y a la ENES UNAM Campus León por abrirme las puertas de esta Universidad.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis papás, por ser mi fuerza y mi motor, por luchar hasta el último día de mis estudios para poder apoyarme en todo lo que necesité, por amarme, cuidarme y levantarme cuando sentía que ya no podía, por apoyar y respetar las decisiones que tomé día con día y que me trajeron hasta donde estoy el día de hoy, gracias por confiar en mí y por enseñarme a luchar por mis sueños, por impulsarme a esforzarme por aquello que realmente vale la pena y por alentarme a ser valiente, su confianza en mí y su lección de perseverancia son fundamentales para mi logro.

A mis hermanas, Ana y Gaby, por ser mis ejemplos, por enseñarme y guiarme con tanta paciencia y tanto amor a pesar de la distancia, gracias por estar conmigo siempre, por cuidarme y orientarme a tomar las mejores decisiones, por enseñarme a confiar en mí, las amo profundamente. A mi prima Fer, por tu apoyo incondicional y por ir juntas a lo largo de todo este proceso, aunque estemos a muchos km de distancia.

A Diego por estar tantos años a mi lado apoyándome y aconsejándome como solo tú sabes hacerlo, por la paciencia y el amor infinito, por ser mi mejor amigo y por nunca soltar mi mano.

Resumen

Este trabajo de investigación se enfoca en analizar el gen *ATG9b*, el cual desempeña un papel crucial en el proceso de autofagia que tiene lugar durante la relación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*. Es relevante destacar que el frijol común constituye uno de los cultivos de mayor relevancia económica a nivel global. (Chávez-Mendoza, 2017). *Phaseolus vulgaris* es una especie importante en la agricultura por su alto valor económico y por su alta productividad en la agricultura, debido a la habilidad que posee de fijar nitrógeno. La fijación simbiótica de nitrógeno (SNF) es un proceso compuesto por una serie de interacciones químicas y físicas entre *P. vulgaris* y *R. tropici*. Este tipo de interacciones comienza principalmente en suelos que carecen de este compuesto (Roy et al., 2020). Las interacciones de dos híbridos de levadura de ATG9 como cebo con la biblioteca de ADNc de *Phaseolus* en condiciones simbióticas de nódulos radiculares demostraron que la Cisteína dioxigenasa (CDO) y Leghemoglobina (Lb) interactúan con las proteínas ATG9. La proteína CDO está involucrada en el proceso de hipoxia mientras que la leghemoglobina funciona como eliminador de oxígeno para facilitar que las enzimas nitrogenasas funcionen correctamente durante la fijación de nitrógeno en la simbiosis de los nódulos radiculares. Debido a estas interesantes observaciones decidimos realizar un análisis funcional del gen *ATG9b* sobreexpresándolo durante la simbiosis con *R. tropici* y *P. vulgaris*, así como la clonación del gen interactuante CDO para estudiar el desarrollo de *P. vulgaris* durante su silenciamiento.

Índice

1. Introducción	8
2. Planteamiento del problema	14
3. Justificación	15
4. Antecedentes	16
4.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	
4.2. <i>R. tropici</i> y su relación simbiótica con <i>P. vulgaris</i>	
4.3. Autofagia	
4.4. Genes ATG	
4.5. Gen cisteína Dioxigenasa (CDO)	
4.6. Hipoxia	
4.7. Leghemoglobina (Lb)	
4.8. Técnica de clonación Gateway	
4.9. Ensayos de infección GUS y fluorescencia GFP	
5. Objetivos	27
5.1. General	
5.2. Específicos	
6. Hipótesis	28
7. Metodología	29
7.1. <i>Fenotipado de la sobreexpresión del gen ATG9b en Phaseolus vulgaris</i>	

- 7.1.1. Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión ATG9b-OX /pBGWFS7.0 en *A. rhizogenes*.
- 7.1.2. Inoculación de las plantas con el vector ATG9b-OX /pBGWFS7.0 con *R. tropici*
- 7.1.3. Fenotipado de *P. vulgaris* durante la simbiosis con *R. tropici*
- 7.2. *Identificación y clonación de CDO en vector RNAi*
 - 7.2.1. Identificación de la secuencia del RNAi del gen CDO
 - 7.2.2. Análisis de la secuencia de PvCDO-RNAi
 - 7.2.3. Diseño de oligos específicos para CDO-RNAi
- 7.3. *Clonación del RNAi de CDO*
 - 7.3.1. Amplificación del fragmento de RNAi de CDO
 - 7.3.2. Introducción del fragmento CDO-RNAi al vector pENTR/D-TOPO
 - 7.3.3. Transformación de *E. coli* top10 con el vector CDO-RNAi/ pENTR
 - 7.3.4. PCR de colonias con el plásmido pENTR *E. coli* Top 10
 - 7.3.5. PCR con oligos M13 del plásmido de CDO-RNAi/ pENTR
 - 7.3.6. Inserción del fragmento CDO-RNAi al vector final pK7GWIWG2D(II) - RNAi::PvCDO
 - 7.3.7. Transformación de *E. coli* top 10 con el vector final pK7GWIWG2D(II) - RNAi::PvCDO
 - 7.3.8. PCR de colonias con el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO *E. coli* Top 10
 - 7.3.9. Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599)
 - 7.3.10. PCR de colonias con el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO de *A. rhizogenes*
- 7.4. *Fenotipado del silenciamiento del gen CDO en P. vulgaris*

- 7.4.1. Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de silenciamiento CDO-Ri/ pK7WIWG2(II) en *A. rhizogenes*.
- 7.4.2. Inoculación de las plantas con el vector CDO-Ri/ pK7WIWG2(II) en *R. tropici*.

8. Resultados 34

8.1. Fenotipado de la sobreexpresión del gen *ATG9b* en *P. vulgaris*.

- 8.1.1. Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión *ATG9b* /pBGWFS7.0 en *A. rhizogenes*
- 8.1.2. Inoculación de las plantas con el vector *ATG9b-OX* /pBGWFS7.0 con *R. tropici*
- 8.1.3. Fenotipado de *P. vulgaris* durante la simbiosis con *R. tropici*

8.2. Identificación y análisis del RNAi de *CDO*

- 8.2.1. Identificación de la secuencia del RNAi del gen *CDO*

8.3. Clonación del RNAi de *CDO*

- 8.3.1. Amplificación del fragmento de RNAi de *CDO*
- 8.3.2. Introducción del fragmento *CDO*-RNAi al vector pENTR/D-TOPO
- 8.3.3. Transformación de *E. coli* TOP10 con el vector *CDO*-RNAi/ Pentr
- 8.3.4. PCR de colonias con el plásmido pENTR *E. coli* Top 10
- 8.3.5. PCR con oligos M13 del plásmido de *CDO*-RNAi/ pENTR
- 8.3.6. Transformación de *E. coli* top 10 con el vector final pK7GWIWG2D(II) -RNAi::PvCDO
- 8.3.7. PCR de plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO *E. coli* Top 10
- 8.3.8. Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599)
- 8.3.9. PCR de colonias con el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO de *A. rhizogenes*

8.4. Fenotipado del silenciamiento del gen *CDO* en *P. vulgaris*

- 8.4.1. *Generación de raíces transgénicas en P. vulgaris con el vector de silenciamiento CDO-Ri / pK7WIWG2(II) en A. rhizogenes*
- 8.4.2. *Inoculación de las plantas con el vector CDO-Ri / pK7WIWG2(II) en A. rhizogenes*

9.	Discusión de resultados	51
9.1.	Fenotipado y análisis de la sobreexpresión del gen ATG9b en <i>P. vulgaris</i>	
9.2.	Identificación y análisis del RNAi de CDO	
9.3.	Clonación de RNAi de CDO	
9.4.	Fenotipado del silenciamiento del gen CDO en <i>P. vulgaris</i>	
10.	Conclusiones	54
11.	Referencias bibliográficas	55
12.	Productos Generados	59
12.1.	Congresos	
13.	Glosario	60
14.	Anexos	62

1 Introducción

El cultivo del frijol común es de gran relevancia económica a nivel global. Esta especie tiene sus orígenes en Mesoamérica, siendo México su principal ubicación geográfica. (Martín-Rodríguez et al., 2022), con gran valor nutricional en la dieta humana debido a su alto contenido de fibra, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Chávez-Mendoza, 2017), así como un alto valor económico ya que en México se exporta alrededor de 109,000 millones de USD (Ferguson et al., 2019).

La familia de las leguminosas, conocida como Leguminosae, abarca aproximadamente 700 géneros. Dentro del género *Phaseolus* se encuentran cinco especies que han sido domesticadas: *P. lunatus* (habas), *P. acutifolius* (frijol tépari), *P. coccineus* (ayocote), *P. dumosus* (frijol gordo) y *P. vulgaris* (frijol común) (Martín-Rodríguez et al., 2021).

Hoy en día nos enfrentamos a un sin fin de cambios climáticos, por lo que el uso de herramientas genéticas, genómicas y biotecnológicas son esenciales para un óptimo desarrollo en el futuro de la agricultura (Martín-Rodríguez et al., 2021).

Las leguminosas presentan la notable capacidad de capturar nitrógeno atmosférico y enriquecer el suelo mediante una relación simbiótica establecida con bacterias especializadas en la fijación de nitrógeno. (Estrada-Navarrete et al., 2007).

Esta simbiosis es beneficiosa tanto para las plantas y las bacterias, como para nosotros, los seres humanos, al dar una conversión anual estimada de 60 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico, lo cual resulta sumamente importante, ya que se estima que por año se aplican alrededor de 108 millones de toneladas de fertilizantes con un costo aproximado de \$28 mil millones de USD (Ferguson et al., 2019). *Phaseolus vulgaris* resalta entre otras especies por su gran habilidad para establecer una relación simbiótica con estas bacterias gram negativas llamadas “Rizobios” (Roy et al., 2020).

El nitrógeno desempeña un papel fundamental como macronutriente esencial para el crecimiento y la evolución de las plantas. Sin embargo, en la actualidad, la agricultura se enfrenta a desafíos significativos debido al cambio climático y a la contaminación del suelo. Estos factores han llevado a una disminución en la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, lo que a su vez ha impulsado la necesidad de aplicar fertilizantes de manera extensa en los suelos utilizados para la agricultura. (Ayala-García, et al., 2022).

La fijación simbiótica de nitrógeno (SNF) se basa en establecer una interacción simbiótica entre la leguminosa y la bacteria para convertir el nitrógeno atmosférico en amonio de tal manera que la planta pueda absorberlo y utilizarlo para su óptimo desarrollo, mientras que le ofrece a la bacteria un ambiente favorable para vivir (Ayala-García, et al., 2022).

La SNF es un proceso compuesto por una serie de interacciones químicas y físicas entre *P. vulgaris* y *R. tropici*. Este tipo de interacciones comienza principalmente en suelos que carecen de nitrógeno en donde las plantas leguminosas comienzan a secretar metabolitos secundarios llamados flavonoides, estos compuestos son reconocidos por los rizobios y activan la síntesis de los factores de nodulación NOD, estos factores permiten que la planta reconozca al simbiote dejándolo entrar y desencadenando una serie de reacciones transcripcionales y postraduccionales que darán paso a la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos en donde se realizará la fijación de nitrógeno (Roy *et al.*, 2020).

Rhizobium tropici CIAT899 es una cepa con la capacidad de reconocer diferentes flavonoides permitiéndole establecer relaciones con un amplio rango de hospederos como lo son *P. vulgaris*, *L. japonicus* y *L. burttii* (Ayala-García *et al.*, 2022).

La penetración de las bacterias en las células vegetales ocurre mediante estructuras tubulares comúnmente denominadas hilos de infección (HI). Estos HI desencadenan una liberación transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual se acompaña de la degradación de la pared celular, alteraciones en la membrana y reorganización del citoesqueleto. El infectosoma, un complejo funcional, guía la formación del HI. Simultáneamente, se generan cambios en la expresión de genes a nivel transcripcional y ajustes postraduccionales. Además, se activa la vía de autofagia. Estos procesos en conjunto facilitan la creación de un entorno propicio para la supervivencia del simbiote, asegurando condiciones óptimas en el espacio ocupado. (Roy *et al.*, 2020).

Simultáneamente, en las raíces, ocurre el desarrollo de estructuras conocidas como nódulos en respuesta a la simbiosis. Este proceso comienza con la división de las células corticales, lo que da lugar a la formación de nódulos primordiales. Estos nódulos se convierten en el punto de entrada del hilo de infección, que es dirigido por el complejo infectosoma (HI). La penetración del hilo de infección origina las bolsas de infección, conocidas como "infection pockets". A través de estas bolsas, las bacterias son liberadas en el citoplasma de la célula hospedera y quedan envueltas por una membrana peribacteroide llamada simbiosoma. (Serova *et al.*, 2017).

Existen dos tipos de desarrollo de nódulos: nódulos determinados en donde la actividad meristemática es transitoria y las células del tejido central se encuentran en etapas de desarrollo similares; y nódulos indeterminados en donde la actividad meristemática es persistente y los hilos de infección colonizan continuamente las células que abandonan el meristema. La última etapa del desarrollo de los nódulos se denomina senescencia, es en donde las células tanto del huésped como del hospedero se descomponen, tornando la coloración del nódulo maduro de rosa-rojo a verde (Serova *et al.*, 2017).

Según un análisis transcriptómico de nódulos de *M. truncatula*, pueden dividirse en tres etapas posteriores al envejecimiento: etapa temprana, etapa I y etapa II. La etapa temprana corresponde a la ausencia de signos visibles de senescencia, la etapa I a la destrucción de bacteroides y finalmente, la etapa II a la degradación de bacteroides y células huésped (Serova et al., 2017).

La autofagia es un proceso catabólico mediante el cual se busca mantener la homeostasis en las células eucariotas. Es un proceso relacionado a gran variedad de respuestas fisiológicas o patológicas (Quezada-Rodríguez et al., 2021). Su función se ha visto involucrada en las respuestas inmunitarias innatas a la infección por patógenos, en donde la regulación da inicio al proceso autofágico en donde el simbiote reconoce al patógeno y suprime a quinasa blanco de rapamicina (target of rapamycin, TOR), un regulador negativo de la autofagia (Nanjareddy et al., 2016).

Este procedimiento implica la captura de elementos celulares en vesículas de doble membrana conocidas como "autofagosomas". Estos autofagosomas luego se fusionan con los lisosomas o vacuolas, donde ocurre su descomposición. Este proceso es mediado por genes ATG (Autophagy-related genes), cuya expresión se ha encontrado durante la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* con *R. tropici* en diversos estudios (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

La autofagia es un proceso mediado por genes altamente conservados llamados genes ATGs (por su nombre en inglés AuTophagy), fueron descubiertos en *S. cerevisiae*. Estos genes se clasifican en grupos funcionales: complejo ATG1 quinasa, complejo de reciclaje ATG9, complejo fosfatidilinositol 3-quinada (PI3K), sistema de conjugación ATG8 y ATG12. Cuando se inhibe mTOR, ATG13 se desfosforila asociándose con el complejo ATG1 y las proteínas ATG11 y ATG10, esto estimula el proceso de la autofagia (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

Después, el complejo de reciclaje ATG9 junto con los factores de ciclo ATG2 y ATG18, impulsa la formación del fagóforo. Posteriormente se lleva a cabo el ensamblaje del fagóforo con fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P) mediante el complejo PI3K. El fagóforo se expande hasta alcanzar la maduración mediado por ATG8 que se divide por la cisteína ATG4 exponiendo el residuo glicina C-terminal. Esta glicina se conjuga con el lípido de membrana fosfatidiletanolamina (PE) a través de una reacción que es catalizada por ATG7, ATG3 y el complejo ATG12-ATG5. Finalmente, ATG8 es reciclado para futuros eventos de conjugación (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

El hilo de infección estimula la proliferación de las células corticales, generando nuevos órganos en las raíces conocidos como nódulos. Dentro de estos nódulos, se originan estructuras especializadas llamadas simbiosomas, que poseen una estructura similar a

sacos. En el interior de estos simbiosomas se encuentran las bacterias encargadas de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno. (Ferguson et al., 2019).

Existe una gran familia de enzimas especializadas que se encargan de catalizar la incorporación de dos átomos de oxígeno en un sustrato orgánico o cosustrato llamadas “dioxigenasas”. Estas dioxigenasas tienen como fin realizar una gran variedad de modificaciones como dioxigenación, epoxidación, hidroxilación y escisión oxidativa de los enlaces C-C, que impactan directamente al metabolismo, la fisiología y el desarrollo de las plantas (Iacopino & Licausi, 2020).

La actividad de las dioxigenasas se encuentra estrechamente relacionada con el requerimiento del oxígeno molecular en las plantas, esta actividad se vincula con la respuesta de la planta a la hipoxia que suele ser causada por las bajas concentraciones de oxígeno ambiental (Iacopino & Licausi, 2020).

Las dioxigenasas pueden ser clasificadas según el tipo de cofactor de hierro y su coordinación, junto con el requerimiento de cosustratos adicionales. La mayoría de ellas usan un cofactor de hierro no hemo que generalmente se encuentra ubicado en el sitio catalítico de la enzima (Iacopino & Licausi, 2020).

Actualmente existen seis subfamilias de dioxigenasas: Catecol dioxigenasa, Lipoxigenasas (LOP), Dioxigenasas de Rieske, Dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD), Tiol dioxigenasas y Dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2OG) (2-ODD)(Iacopino & Licausi, 2020).

El gen Cisteína Dioxigenasa (CDO) sintetiza una proteína esencial para la biosíntesis de hipotaurina. Se colocó inicialmente en la superfamilia de las cupinas. Las funciones de las proteínas de esta superfamilia incluyen actividades enzimáticas como descarboxilasas, dioxigenasas, hidrolasas, isomerasas y epimerasas, así como funciones no enzimáticas como la unión a auxinas, factores de transcripción y almacenamiento de semillas (Stipanuk *et al.*, 2011).

En animales y plantas se han explorado diversos mecanismos para detectar la concentración de oxígeno y regular la expresión génicas en respuesta al estrés por falta de oxígeno llamado hipoxia, uno de los genes relacionados con esta respuesta es el CDO (Chen *et al.*, 2021).

Las plantas son organismos aerobios que requieren altas concentraciones de oxígeno para su respiración. La hipoxia es un mecanismo que se activa dentro de las plantas cuando estas se encuentran en un ambiente con oxígeno insuficiente, eso les permite adaptarse para seguir creciendo y desarrollándose (Loreti & Perata, 2020).

Cuando el suministro de oxígeno en las plantas es insuficiente, la mayoría de las funciones celulares se ven comprometidas, incluso pueden llegar a morir. Con el fin de mantener bajo control los niveles de oxígeno, las células inician el proceso de hipoxia a través de diferentes mecanismos como lo es la regulación de genes que a su vez le otorga a la planta una respuesta adaptativa al estrés al que se enfrenta (Loreti & Perata, 2020).

La hipoxia inicia cuando comienza a haber una limitación en la respiración aeróbica de la planta, la cual usualmente se encuentra entre el 1 % y el 5 %, mientras que la anoxia inicia cuando hay ausencia de oxígeno en el ambiente. El mecanismo mediante el cual la planta media el oxígeno comienza con un grupo de proteínas llamadas Factores de Respuesta al Etileno grupo VII (ERF-VII por sus siglas en inglés Ethylene Response Factors), estas proteínas son desestabilizadas por el oxígeno y se estabilizan con la hipoxia (Loreti & Perata, 2020).

Los ERF-VII son factores de transcripción cuya característica principal es un residuo Cys en su N-terminal. Cuando la planta induce a la normoxia, este residuo Cys es oxidado por una enzima llamada Oxidasa de Cisteína Vegetal (PCO por sus siglas en inglés Plant Cysteine Oxidase), estas se dirigen a las proteínas para degradarlas a través de la proteasoma, siguiendo la rama Cys. Por otro lado, cuando la planta se encuentra en un estado de hipoxia, los ERF-VII son estables debido a la ausencia de oxígeno, esto evita la oxidación de dichas proteínas y les permite trasladarse al núcleo en donde posteriormente activarán la transcripción de genes anaeróbicos al unirse al elemento promotor sensible a la hipoxia (HRPE por sus siglas en inglés Hypoxia-Resposive Promotor Elements) (Loreti & Perata, 2020).

Se ha descubierto que los organismos aeróbicos han logrado desarrollar diversas respuestas adaptativas a la hipoxia tanto a nivel celular como en la fisiología de la planta. Las mitocondrias producen suficiente ATP para que la planta pueda crecer y desarrollarse óptimamente cuando el suministro de oxígeno es adecuado, sin embargo, cuando el organismo se encuentra bajo el estado de hipoxia, la fermentación alcohólica toma el lugar de la respiración mitocondrial con el fin de permitir la producción de ATP a través de la vía de glucólisis, mediante la cual se recicla el NAD^+ por la acción de las enzimas PDC (Piruvato Descarboxilasa) y ADH (Alcoholdehidrogenasa). Estas dos enzimas son el producto de la transcripción de HRG (Genes de Respuesta a la Hipoxia) producida por la acción de las proteínas ERF-VII mencionadas anteriormente, que se encargan de codificar a los Polipéptidos Anaeróbicos (ANP) (Loreti & Perata, 2020).

Por otro lado, la hipoxia puede ser causada por condiciones ambientales específicas, es decir, en las plantas puede originarse debido a la saturación de agua en el suelo que evita que las raíces puedan llevar a cabo su respiración, esto conlleva a la planta a

responder de diferentes maneras según sean sus condiciones ambientales, puede ser con la elongación de su tallo, peciolos u hojas, sin embargo, si el problema continúa le será muy difícil mantenerse con vida (Loreti & Perata, 2020).

En los humanos se ha comprobado que la hipoxia puede surgir como consecuencia de un mal flujo sanguíneo, así como también se ha encontrado que puede regular el crecimiento de tumores y la metástasis. En las plantas también puede ocurrir en tejidos u órganos específicos, aunque estas se encuentren en condiciones normales de oxígeno (Loreti & Perata, 2020).

Las plantas leguminosas pueden establecer una relación simbiótica con rizobios fijadores de nitrógeno provocándole a la planta la necesidad de establecer condiciones hipóxicas en tejidos específicos dado que la enzima nitrogenasa se encargará de fijar N_2 , sin embargo, esta puede ser inactivada por el O_2 libre. En las raíces comienza la formación de nódulos capaces de mantener un entorno interno con bajas concentraciones de O_2 mediante la expresión de hemoglobinas de plantas simbióticas que se encargan de transportarlo, la más común se denomina Leghemoglobina (Lb) (Loreti & Perata, 2020).

La leghemoglobina (Lb) es una proteína hemoglobínica estrechamente ligada al proceso de fijación de nitrógeno (N_2) y se localiza en los nódulos radiculares de las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas (Larrainzar *et al.*, 2020). Su función principal consiste en llevar el oxígeno (O_2) a los simbiosomas en concentraciones moderadas, lo cual permite que los bacteroides realicen una respiración eficiente. Sin embargo, esta entrega de oxígeno es cuidadosamente regulada para prevenir la inactivación de la enzima nitrogenasa. (Becana *et al.*, 2015).

La leghemoglobina desempeña un papel crucial al facilitar la fijación de nitrógeno de manera indirecta en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Esto se debe a que los bacteroides, responsables de la fijación de nitrógeno, son microaerobios, lo que significa que necesitan oxígeno para llevar a cabo la respiración y la fijación de nitrógeno. Sin embargo, existe el riesgo de que los bacteroides pierdan rápidamente su actividad de nitrogenasa si se les suministra demasiado oxígeno. La leghemoglobina actúa como intermediaria al proporcionar el oxígeno necesario a los bacteroides en niveles adecuados para mantener una respiración eficiente y la fijación de nitrógeno, al mismo tiempo que evita la inactivación de la enzima nitrogenasa. (Becana & Klucas, 1992).

Cuando el O_2 atraviesa la barrera de difusión de O_2 ubicada en la corteza interna del nódulo, la Lb facilita su difusión desde la plasmalema de las células infectadas hacia la membrana peribacteroide que carece de Lb, para finalmente alcanzar las oxidasas terminales de los bacteroides, esto evita los cambios repentinos de O_2 dentro de la planta y previene la inactivación de la nitrogenasa (Becana & Klucas, 1992).

Diversos estudios en nuestro grupo de laboratorio mostraron una estrecha relación entre el gen ATG9, el CDO y la Lb durante el proceso de infección al establecerse una relación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*.

Para esto se realizó la técnica de clonación Gateway, utilizando el vector de entrada pENTR-D/TOPO y como vector final pK7GWIWG2D(II). La técnica de clonación Gateway es una de las más utilizadas en la biología molecular debido a su adaptabilidad, eficiencia y compatibilidad con la clonación tradicional, además es un sistema que resuelve muchos de los desafíos del área debido a que permite la clonación de productos PCR en un plásmido central, seguido de la transferencia de segmentos de ADN entre este clon y otros vectores específicos, en un orden predefinido (Katzen, 2007).

Es por esto, que utilizando la técnica de clonación Gateway tuvimos como objetivo de hacer la clonación del gen CDO, que es un gen interactuante durante la expresión de ATG9b. También se realizaron análisis fenotípicos y ensayos histológicos de GUS : GFP (glucoronidase : Green fluorescent protein) para identificar y analizar su función durante la simbiosis de *P. vulgaris* con *R. tropici*. GUS puede ser utilizado para identificar genes que se expresan en un tejido particular de la planta, o bien, en una etapa en particular (Mudunkothge & Krizek, 2014).

Cuando se practican ensayos histoquímicos, se utiliza el sustrato 5-bromo-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc), el producto de la hidrólisis sufre una dimerización oxidativa que da como resultado un precipitado de color azul (Mudunkothge & Krizek, 2014).

2. Planteamiento del problema

El análisis previo de la transcriptómica de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici* reveló que *ATG9b* es uno de los genes de autofagia altamente expresados durante la simbiosis de nódulos de raíz (Quezada-Rodríguez et al., 2022). Diversos estudios anteriores encontraron a *ATG9b* como el gen relacionado con la formación del autofagosoma durante el proceso de la autofagia. En el análisis mediante dos híbridos en levadura (Y2H) realizado con *ATG9b* como cebo y la biblioteca de ADNc preparada a partir de raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. tropici*, entre los 24 genes identificados como proteínas que interactúan, CDO fue un hallazgo interesante.

Con base en esto, decidimos analizar la función del gen *PvATG9b* durante la etapa de infección y nodulación en las raíces de *P. vulgaris*, así como el fenotipado de la planta cuando el gen se encuentra sobreexpresado. De igual manera se realizó la clonación del gen *PvCDO-RNAi* para futuros análisis.

3. Justificación

Phaseolus vulgaris es una especie sumamente importante en la agricultura, actualmente nos enfrentamos a cambios climáticos constantes y drásticos por lo que las sequías, los cambios en los nutrientes en el suelo, las precipitaciones intensas y los cambios en las temperaturas son desafíos que debemos enfrentar. Es por esto por lo que conocer alternativas para mejorar los cultivos, en este caso *P. vulgaris*, es importante no solo por la óptima producción que se puede llegar a tener, sino también los beneficios que trae consigo al fijar N₂ en suelos escasos de nutrientes.

Conocer la función del gen *ATG9b* durante la SFN entre *P. vulgaris* y *R. tropici* nos ayudará a comprender y enriquecer el conocimiento que hemos adquirido junto con los de otros genes que se expresan durante esta asociación simbiótica para así tener un enfoque aplicable con el fin de mejorar y optimizar la producción de cultivos de gran importancia a nivel mundial (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

Bajo esta premisa y revisando en la bibliografía, conocemos que las leguminosas pueden establecer una relación simbiótica con las bacterias del género *Rhizobium*, las cuales permiten a la planta obtener los nutrientes necesarios para tener un óptimo desarrollo y crecimiento (Ferguson et al., 2019).

La fijación de nitrógeno simbiótica (SNF) conlleva una serie de modificaciones en la transcripción y la modificación de proteínas, lo que culmina en el proceso infeccioso dentro de la planta. Este proceso es crucial para el desarrollo de estructuras altamente especializadas conocidas como nódulos, que proporcionan el entorno adecuado para la fijación de nitrógeno atmosférico presente en el suelo. (Roy et al., 2020).

Una de las interacciones químicas que ocurren durante la simbiosis de *P. vulgaris* con *R. tropici*, activa la ruta de la autofagia (Roy et al., 2020). Se ha propuesto que la autofagia en los últimos años es un proceso esencial que podría ayudar a mejorar la resistencia a las enfermedades, la mejora del rendimiento y la resistencia a las condiciones de estrés abiótico (Estrada-Navarrete et al., 2016).

Basándonos en la información previa, sería valioso explorar el posible papel de la autofagia en la regulación de la simbiosis en las plantas leguminosas cuando interactúan simbióticamente con bacterias que tienen la capacidad de fijar nitrógeno.

En este documento, se eligió el gen *ATG9b* de *P. vulgaris* para el análisis funcional, sobreexpresado este gen mediante la inducción y crecimiento de raíces peludas en *P. vulgaris* para su posterior fenotipado durante la simbiosis con *R. tropici*. Además, también hemos clonado al gen Cisteína Dioxigenasa (CDO), gen que interactúa con *ATG9b*, para realizar el fenotipado de la planta en futuros experimentos.

4 Antecedentes

4.1 *Phaseolus vulgaris*

El frijol común es uno de los cultivos con mayor importancia económica a nivel mundial. Es una especie originaria de Mesoamérica que pertenece a la familia Leguminosae, del género *Phaseolus*, resultando su nombre científico *Phaseolus vulgaris*. Es una especie de alto valor nutricional para la dieta humana debido a su alto contenido de fibra, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales; diversos estudios han demostrado el alto contenido en componentes bioactivos que sintetiza esta especie, entre ellos están las antocianinas, taninos, flavonoides, fenoles, lectinas, oligosacáridos, entre otros (Chávez-Mendoza, 2017).

Phaseolus vulgaris es una especie importante en la agricultura, no solo por su valor económico sino también por su alta productividad, debido a la habilidad que posee de fijar nitrógeno en el suelo, convirtiéndose en un cultivo clave para los ecosistemas naturales (Roy et al., 2020).

Es una especie que puede lograr una relación simbiótica con algunas bacterias gram negativas mejor conocidas como Rizobios. *Phaseolus vulgaris* es una especie considerada como hospedera promiscua debido a la facilidad que posee para establecer simbiosis con este tipo de bacterias. Esta relación simbiótica desencadena una serie de reacciones bioquímicas tanto fuera como dentro de la planta generando la nodulación radicular dentro de las cuales se establecen estructuras específicas llamadas simbiosomas, que a su vez serán los sitios de fijación de nitrógeno (Mwenda, 2018). Esto es sumamente importante especialmente con un enfoque en la agricultura ya que puede considerarse como una fuente sostenible de N para los cultivos, reduciendo el uso de fertilizantes que ocasionan un impacto negativo al medio ambiente (Roy et al., 2020).

4.2 *Rhizobium tropici* y su relación simbiótica con *P. vulgaris*

En la actualidad, se han identificado diversas especies bacterianas capaces de producir y liberar polisacáridos. Por lo tanto, el estudio de estos procesos bioquímicos resulta altamente atractivo para la industria, debido a la diversidad de productos que pueden derivarse de ellos. Ejemplos de tales productos incluyen fármacos, fungicidas, herbicidas e insecticidas, entre otros. Uno de los principales productores de exopolisacáridos (EPS) son los rizobios, los cuales han demostrado ser una fuente significativa para la fertilidad del suelo y promover el crecimiento óptimo de las plantas (Luque et al., 2014).

Diversos estudios han comprobado que establecer una relación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici* mejora considerablemente la productividad de la planta (Mwenda, 2018). La fijación simbiótica de nitrógeno (SNF) es un proceso compuesto por una serie de interacciones químicas y físicas entre *P. vulgaris* y *R. tropici* (Figura 2). Este tipo de interacciones comienza principalmente en suelos que carecen de nitrógeno en donde las plantas leguminosas comienzan a secretar flavonoides que son metabolitos secundarios (Figura 2A), estos compuestos son reconocidos por los rizobios y activan la síntesis de los factores de nodulación NOD, estos factores permiten que la planta reconozca al simbionte permitiéndole entrar. La planta, al percibir estos factores, comienza una despolarización en la membrana celular, así como un cambio en el flujo de iones, como un cambio en el flujo de iones,

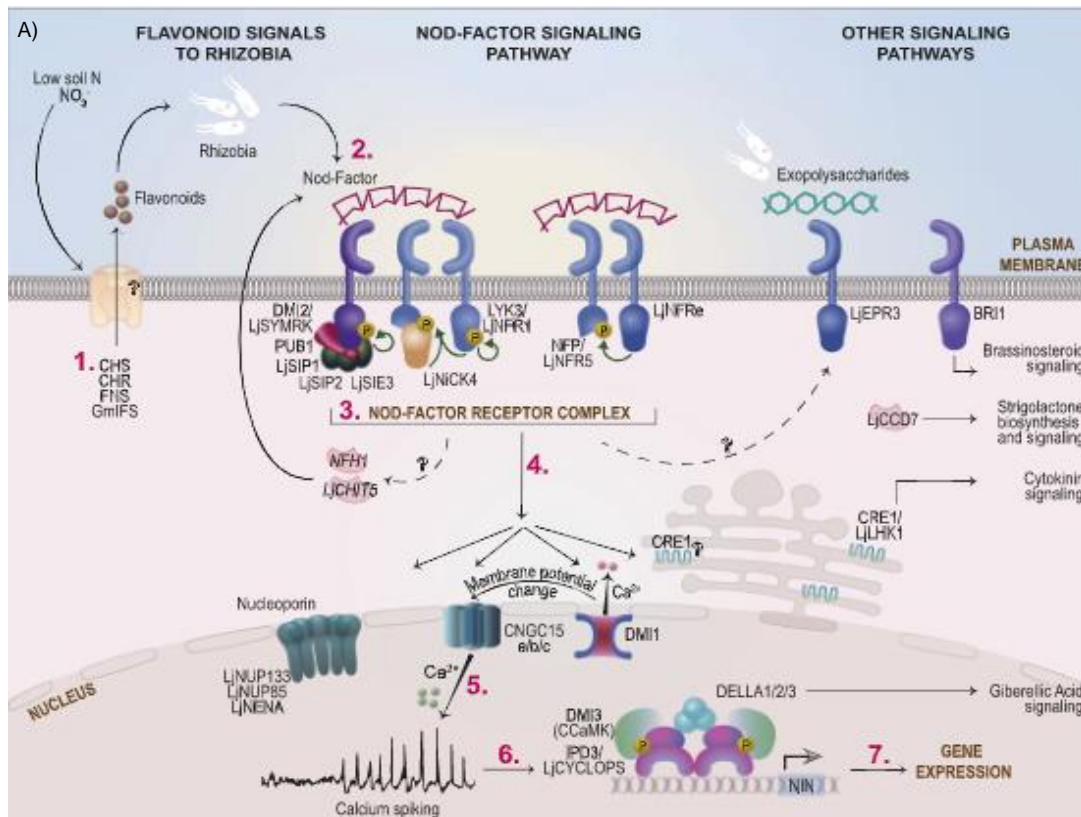


Figura 1 Interacción química y física de la FSN. **A)** Interacción química en la que se liberan flavonoides para atraer a las bacterias activando los factores NOD, el complejo receptor y cambios en el flujo de iones afectando la expresión celular (Roy et al., 2020).

incluyendo la concentración de calcio, llamado “picos de calcio”, en los núcleos de las células epidérmicas de los pelos radiculares. Estas modificaciones influyen en la expresión génica de las células, facilitando el desarrollo del proceso infeccioso que culmina en la creación de los nódulos en las raíces de las plantas. (Roy et al., 2020).

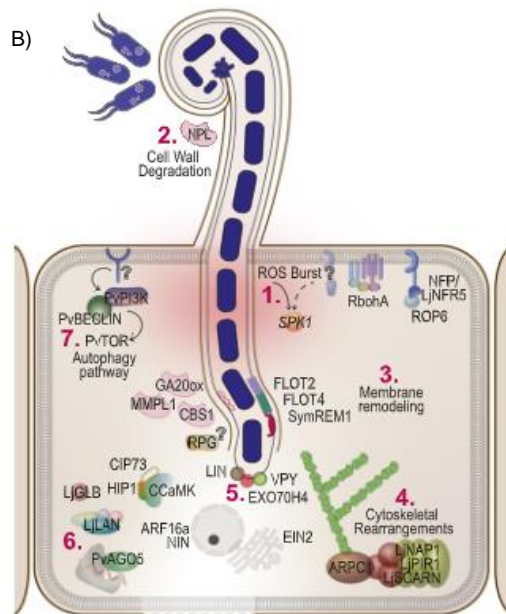


Figura 2 Interacción química y física de la FSN. **B)** Interacción física en la que el pelo radicular se enrosca, se forma el hilo de infección hasta llegar a las células corticales promoviendo la división celular y la formación de nódulos. A la par se activan cambios transcripcionales y postraduccionales (Roy et al., 2020).

El proceso infeccioso (Figura 2B), una vez que la planta reconoce a la bacteria, se da por los pelos radicales los cuales se curvan para “atrapar” a la bacteria formando las bolsas de infección, para después formar estructuras tubulares por las que se transportarán a las bacterias, creando un hilo de infección (Quinto et al., 2022), la pared celular comenzará a deshacerse y la membrana plasmática a invaginarse permitiendo la entrada de la infección hasta las células corticales promoviendo la división celular e iniciando la organogénesis nodular (Roy et al., 2020).

El inicio de la formación de los nódulos primarios y la vascularización ocurre mediante la entrada de la bacteria en las células corticales. Luego, de manera análoga a la endocitosis, las bacterias avanzan hacia las células internas del nódulo en desarrollo, donde son envueltas por la membrana celular de la planta. Este proceso posibilita la diferenciación de las bacterias en estructuras llamadas bacteroides. Finalmente, se formarán los simbiosomas, organelos especializados en la fijación de nitrógeno, conformados por cientos de bacteroides (Quinto et al., 2022), paralelamente iniciará una

serie de cambios transcripcionales y postraduccionales, así como la activación de la autofagia, como se puede observar en la Figura 1 (Roy et al., 2020).

4.3 Autofagia

La autofagia es un mecanismo ampliamente conservado de degradación intracelular que se encuentra en todas las células eucariotas. (Magen, et al., 2022). Es un proceso catabólico mediante el cual se busca mantener la homeostasis en las células eucariotas. Los mecanismos de la autofagia fueron descubiertos por Yoshinori Ohsumi quien ganó el Premio Nobel en fisiología o medicina en 2016 (Adelipour, et al., 2022).

En las plantas se clasificaron tres tipos de autofagia, las cuales se dividen en: microautofagia, macroautofagia y megaautofagia. La microautofagia es la formación de una vesícula intravascular como producto de una invaginación que sufre el tonoplasto, en donde los componentes citosólicos son directamente absorbidos por la vacuola. Por otra parte, la macroautofagia implica la generación de estructuras de doble membrana conocidas como autofagosomas, los cuales se originan en el interior del citosol. Finalmente, la megaautofagia desintegra el tonoplasto liberando enzimas vacuolares como proteasas e hidrolasas en el citosol, provocando la degradación del material citosólico, provocando la muerte celular (Magen et al., 2022).

En este proyecto nos enfocaremos en la macroautofagia, comúnmente conocida como autofagia. Es un proceso dinámico relacionado a una gran variedad de respuestas fisiológicas o patológicas, por ejemplo: defensa del huésped durante alguna infección, desarrollo, infección, tumorigénesis, estrés biótico o abiótico, estrés oxidativo, hipoxia, entre otras. Es un proceso mediante el cual las membranas subcelulares sufren cambios morfológicos drásticos (Klionsky & Emr, 2000). Este proceso es mediado por genes ATG que son genes conservados descubiertos por primera vez en *S. cerevisiae*. Este mecanismo implica capturar elementos presentes en el citosol dentro de vesículas de doble membrana denominadas "autofagosomas", los cuales más tarde se fusionarán con lisosomas o vacuolas con el propósito de ser descompuestos como se muestra en la Figura 3. La autofagia puede activarse cuando los nutrientes en el organismo se están agotando, se inhibe mTOR o se activa AMPK permitiendo la expresión de los genes ATG y otros (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

La ruta de la autofagia es un proceso que consta de diferentes pasos y es mediado por diferentes proteínas que se encargan de regularlos (Magen et al., 2022). Estas proteínas son sintetizadas por los genes ATG como se muestra en la Figura 3. El proceso se divide en 5 pasos que constan de lo siguiente: 1) Iniciación en donde mTOR y AMPK actúan como los principales reguladores, negativo y positivo respectivamente, y durante esta etapa se activa el complejo ULK1; 2) Nucleación de doble membrana y formación de pre-

autofagosoma, dirigida por ATG9 que se encarga de liberar vesículas que junto con el complejo de nucleación PI3KIII y PI3P comienzan a formar la membrana del fagosoma; 3) Elongación del fagóforo y secuestro de carga citoplasmática, con ayuda del sistema de conjugación ATG12 se activa el sistema de conjugación LC3 que permitirá la unión de la membrana para formar el autofagosoma con el material citoplasmático dentro; 4) Fusión del autofagosoma al lisosoma; 5) Degradación de la carga citoplasmática (Hansen et al., 2018).

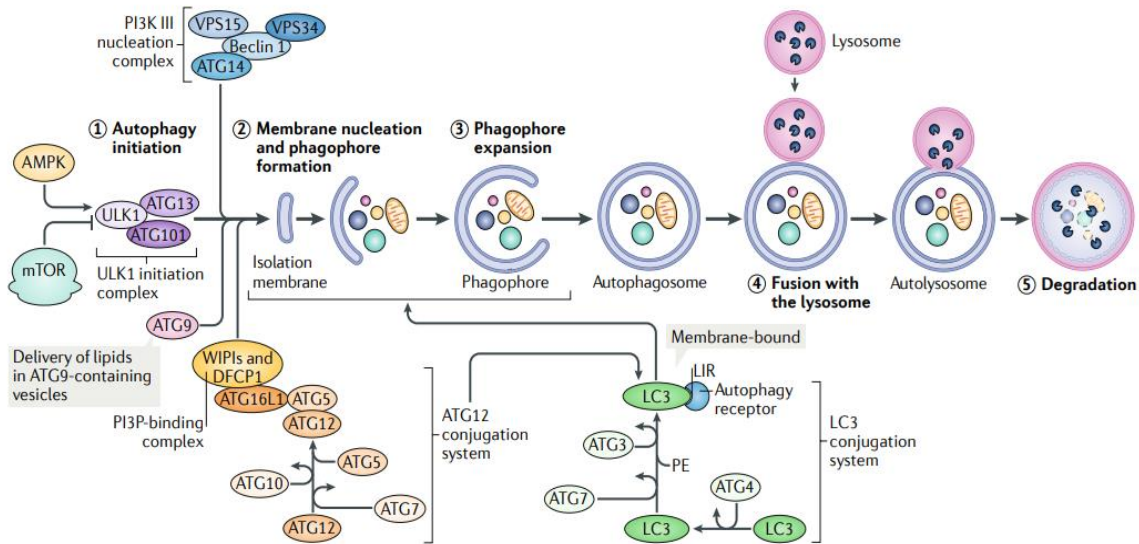


Figura 3 Autofagia. Proceso mediado por genes ATG dividido en 5 pasos: Iniciación, formación de un pre-autofagosoma, expansión del fagóforo, fusión con el lisosoma y degradación (Hansen et al., 2018).

4.4 Genes ATG

Los genes ATG fueron descritos por primera vez en levaduras y se ha observado que son genes altamente conservados en eucariotas, por otro lado, en *A. thaliana* se han identificado más de 40 genes ATG (Magen et al., 2022). El nombre proviene de la palabra en inglés AuTophagy (ATG) (King, 2012).

Diversos estudios han demostrado la expresión de genes ATG durante la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*, estos genes se clasifican en complejo de **kinasa** ATG1, complejo de reciclaje ATG9, complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y los sistemas de conjugación ATG8 y ATG12 (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

El complejo ATG1 está conformado por los genes **ATG1, ATG11, ATG13 y ATG101**, estos se encargan de dar inicio al proceso de autofagia. En el complejo ATG2-ATG18 se

encuentran los genes **ATG9**, **ATG2** y **ATG18** que se encargan de formar y reclutar la membrana de los autofagosomas. Posteriormente se encuentra el complejo PI3K que contiene a los genes **ATG6** y **ATG14** quienes se encargarán de la elongación y formación de los autofagosomas. Después se encuentra el complejo de conjugación similar a la ubiquitina con los genes **ATG3**, **ATG4**, **ATG7**, **ATG8** y **ATG5**, los cuales se encargarán de los sistemas de conjugación de proteínas similares a la ubiquitina. Finalmente se encuentra el complejo de conjugación similar a la ubiquitina conformado por los genes **ATG10**, **ATG12** y **ATG16** (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

4.5 Gen Cisteína Dioxigenasa (CDO)

El metabolismo de la cisteína a sus productos finales de sulfoxidación depende de dos enzimas dependientes de hierro, son las únicas tiol dioxigenasas conocidas de mamíferos. Éstas dos enzimas son cisteína dioxigenasa (CDO) y cisteamina dioxigenasa (ADO), ambas son esenciales para la biosíntesis de hipotaurina/taurina. CDO utiliza cisteína y oxígeno (O₂) como sustrato y convierte estos sustratos en ácido cisteinsulfínico, posteriormente tiene dos opciones, la primera es descarboxilarse a hipotaurina o transaminarse al supuesto intermedio 3-sulfinil piruvato que se descompone espontáneamente en piruvato y sulfito (Stipanuk, 2011).

El gen *CDO* se colocó inicialmente en la superfamilia de las cupinas. Esta es una superfamilia de diversas proteínas con dominios conservados, en ella se encuentran enzimas y proteínas de almacenamiento de semillas no enzimáticas como las globulinas 7S y 11S, también conocidas como vicilinas y leguminas respectivamente, las cuales se encuentran en altas concentraciones en las semillas de las plantas (Stipanuk, 2011).

Fue agrupada en esta ya que contiene motivos cupin conservados. Las proteínas de la superfamilia tienen una amplia gama de funciones biológicas en arqueas, bacterias y eucariotas. Las funciones de las proteínas de la superfamilia de cupinas incluyen actividades enzimáticas como descarboxilasas, dioxigenasas, hidrolasas, isomerasas y epimerasas, así como funciones no enzimáticas como la unión a auxinas, factores de transcripción y almacenamiento de semillas (Stipanuk, 2011).

En animales y plantas se han explorado diversos mecanismos para detectar la concentración de oxígeno y regular la expresión génicas en respuesta al estrés por falta de oxígeno llamado hipoxia, uno de los genes relacionados con esta respuesta es el CDO (Chen, 2021).

4.6 Hipoxia

Las plantas son organismos aeróbicos que requieren de oxígeno para su respiración (Loreti & Perata, 2020). El oxígeno es una molécula necesaria para los procesos metabólicos de diversos organismos. El crecimiento de las plantas depende del oxígeno para un crecimiento y desarrollo óptimo ya que de esta molécula dependen más de 200 reacciones celulares. Sin embargo, las plantas experimentan diversos estreses tanto bióticos como abióticos (sequías, inundaciones, salinidad, patógenos, etc.) (Zahra et al., 2021).

Cuando el suministro de oxígeno es insuficiente, muchas de las funciones celulares se ven comprometidas, lo cual puede conducir a su muerte. Con el fin de mantener los niveles de oxígeno bajo control, las células reaccionan induciendo a la hipoxia con el fin de adaptarse para sobrevivir a través de la regulación de genes que a su vez generan una respuesta adaptativa a la planta (Loreti & Perata, 2020).

Los niveles de oxígeno se clasifican en tres niveles según su disponibilidad: normoxia (normal), hipoxia (deficiencia parcial) y anoxia (deficiencia total). Cuando el suministro de oxígeno permite que la fosforilación oxidativa se lleve a cabo se denomina normoxia, en donde los niveles de oxígeno se encuentran en un rango normal. Por otro lado, se hace mención a la hipoxia cuando la concentración de oxígeno disminuye y empieza a influir en el proceso de fosforilación oxidativa en las mitocondrias, restringiendo la generación de trifosfato de adenosina (ATP) teniendo como resultado una deficiencia parcial ya que la producción no es nula, sin embargo, no es suficiente para llevar a cabo un crecimiento y desarrollo óptimo en la planta; la hipoxia ocurre cuando el nivel de oxígeno se encuentra entre 1% y 5% (Loreti & Perata, 2020).

Finalmente, el estado de anoxia se alcanza cuando la cantidad de la producción de ATP es menor comparado con la fermentación y la glucólisis provocando una deficiencia total en la planta, interfiriendo negativamente en el crecimiento y desarrollo de esta (Zahra et al., 2021).

La adaptación de las plantas al bajo suministro de oxígeno se da a partir de diversos cambios metabólicos modulados por diferentes vías de señalización. La respuesta de las plantas, así como su capacidad adaptativa a este estrés, depende de las moléculas de señalización y los factores transcripcionales que desencadenan cascadas de señalización para provocar cambios anatómicos, alteraciones bioquímicas y transformaciones genéticas (Zahra et al., 2021).

El mecanismo mediante el cual se detectan los niveles de oxígeno en la planta se muestra en la Figura 4, en donde las proteínas pertenecientes al grupo VII de los Factores de Respuesta a Etileno (ERF-VIIs) son desestabilizadas por el oxígeno y se

estabilizan bajo la hipoxia. Los ERF-VII son factores de transcripción que contienen un residuo Cys en su N-terminal. Durante la normoxia, los residuos Cys son oxidados por las enzimas llamadas Oxidasas de Cisteína Vegetal (PCO) y al dirigirse a las proteínas ERF-VII, las degrada hasta llegar a la rama Cys (Loreti & Perata, 2020).

Por otro lado, durante la hipoxia, los ERF-VII son estables debido a la ausencia de oxígeno que impide la oxidación del residuo Cys por los PCO, por lo que estas proteínas pueden trasladarse al núcleo donde se encargan de activar la transcripción de genes anaeróbicos al unirse al elemento promotor sensible a hipoxia (HRPE) (Loreti & Perata, 2020).

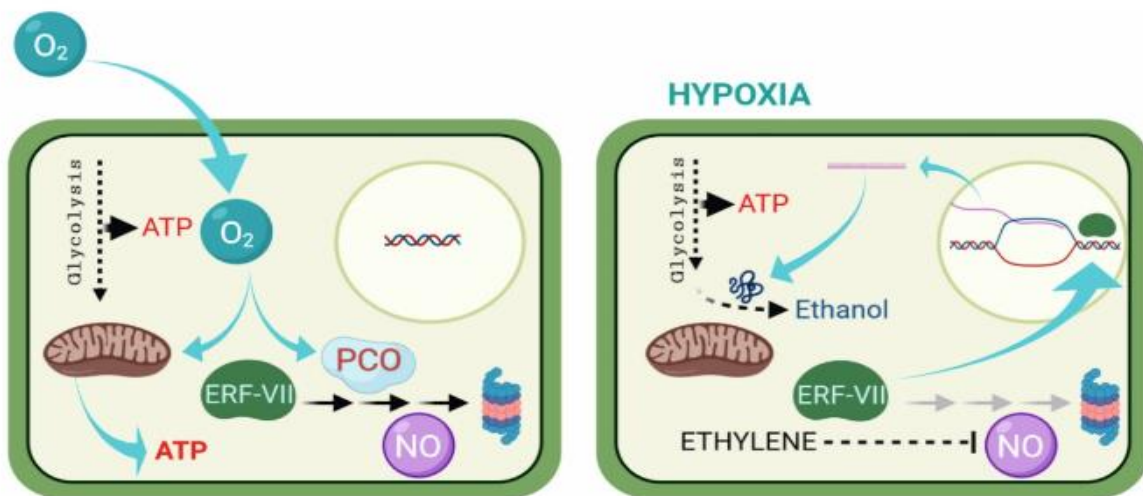


Figura 4 Percepción del oxígeno por las plantas. En condiciones aeróbicas, las mitocondrias producen ATP necesario para el metabolismo celular. Los genes ERF-VII se expresan constitutivamente, sin embargo, los PCO pueden comprometer su estabilidad, éstos requieren oxígeno para degradar el residuo Cys, canalizando a las proteínas ERF-VII al proteasoma en un proceso que requiere óxido nítrico (NO). Por otro lado, bajo la hipoxia, la respiración mitocondrial se disminuye drásticamente, reduciendo la producción de ATP, permitiendo la estabilización de las proteínas ERF-VII gracias a la producción de etileno que amortigua la presencia de NO en la célula. Estas proteínas migran al núcleo donde activan a los genes responsables de hipoxia (HRG).

Las plantas activan una respuesta a la hipoxia a través de diferentes estrategias como lo es la elongación de sus tallos, peciolo u hojas mientras que las otras partes de la planta están sumergidas en agua. Todas estas respuestas son mediadas a través de la regulación de la expresión de genes que le permiten tolerar diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, en humanos la hipoxia regula el crecimiento de tumores y la metástasis, mientras que en las plantas puede ocurrir en órganos y tejidos bajo la disponibilidad normal de oxígeno en etapas específicas del crecimiento de estas (Loreti & Perata, 2020)

En el proceso simbiótico de fijación de nitrógeno en las plantas leguminosas, los microorganismos rizobios requieren crear un ambiente de baja concentración de oxígeno, ya que la nitrogenasa, la enzima responsable de realizar la fijación del nitrógeno, queda inactivada por la presencia de oxígeno libre. (Loreti & Perata, 2020). En la SNF las células huésped del nódulo son capaces de mantener un ambiente con bajas concentraciones de O_2 con el fin de permitir que los bacteroides tengan una respiración eficiente sin que se active la nitrogenasa al expresar leghemoglobinas que se encargarán de transportar el O_2 a los bacteroides para que se lleve a cabo la fijación de nitrógeno (Becana et al., 2015).

4.7 Leghemoglobina (Lb)

Cuando las plantas leguminosas establecen una relación simbiótica con los rizobios, se generan estructuras específicas en sus raíces conocidas como "nódulos". El proceso de inicio de esta interacción y el posterior desarrollo de los nódulos requieren la participación de distintos tipos de hemoglobinas. Un ejemplo de estas hemoglobinas es la leghemoglobina (Lb), que está estrechamente ligada a la capacidad de fijación de nitrógeno (N_2) y se encuentra presente en los nódulos radiculares de las leguminosas (Larrainzar *et al.*, 2020).

La leghemoglobina (Lb) se encuentra en el citosol de las células huésped del nódulo en concentraciones que oscilan entre 1 y 5 mM. Su función principal es transportar y suministrar oxígeno (O_2) a los simbiosomas a niveles bajos de concentración. Esto permite que las bacterias llamadas bacteroides puedan realizar una respiración eficiente en el interior de los nódulos. Al mismo tiempo, esta función de la leghemoglobina evita que la nitrogenasa se inactive, manteniendo así la capacidad de fijación de nitrógeno en el proceso (Becana *et al.*, 2015).

Los nódulos contienen múltiples Lb como es el caso de la soya en donde se encuentran las Lbs a, c1, c2 y c3, así como b, d1, d2 y d3, o bien, en el chícharo que contienen LbI y LbIV (Larrainzar et al., 2020). Sin embargo, en el frijol común solo se expresa una Lb mayor (Becana et al., 2015). De cualquier manera, los estudios realizados en estas especies sugieren que los cambios en las proporciones de Lb durante el desarrollo nodular tienden a maximizar la eficiencia de la fijación de N_2 , así como que su expresión está regulada espaciotemporalmente (Larrainzar et al., 2020).

La Lb es una proteína presente en los nódulos radiculares de las plantas leguminosas, como se mencionó anteriormente, su papel es sumamente importante en la SFN. El color rojo que se produce en los nódulos maduros se debe a la capacidad que tiene la Lb de unir y transportar oxígeno a su estructura gracias a su grupo hemo, este es una estructura

química compleja que consta de un átomo de hierro unido a un anillo porfirínico en donde se unirá el oxígeno, adquiriendo una tonalidad rojo brillante. Dentro de los nódulos actúa como regulador de oxígeno, manteniendo los niveles bajos para promover la actividad de la nitrogenasa. Entre más rojo sea el nódulo, más cantidad de Lb se encuentra presente (Becana & Klucas, 1992).

4.8 Técnica de clonación Gateway

La técnica de clonación Gateway es una técnica bastante utilizada en la biología molecular debido a su gran adaptabilidad, eficiencia y compatibilidad con la clonación tradicional, además es un sistema que resuelve muchos de los desafíos del área debido a que permite la clonación de productos PCR en un plásmido central, seguido de la transferencia de segmentos de ADN entre este clon y otros vectores específicos, en un orden predefinido (Katzen, 2007).

La fundamentación de esta técnica radica en la reorganización precisa del sitio que facilita tanto la inserción como la eliminación controlada o escisión del material genético del bacteriófago. Se realizan recombinaciones en secuencias específicas de unión al DNA del fago (attP) y en el cromosoma bacteriano (attB). Estos sitios están compuestos por una secuencia central de 7 pb y por dos brazos llamados P y P', B y B'. La recombinación inicia cuando el factor de integración bacteriano (IHF) y las moléculas de la integrasa codificadas por el fago se unen al par de bases 232 attP. Después, el complejo con el par de 21 bp attB se integra al cromosoma bacteriano. Se producen unas pequeñas hendiduras de DNA en los extremos de la secuencia central de attP y attB para posteriormente hacer un intercambio de cadenas entre ellas para posteriormente tener dos sitios híbridos llamados attL y attR (Katzen, 2007).

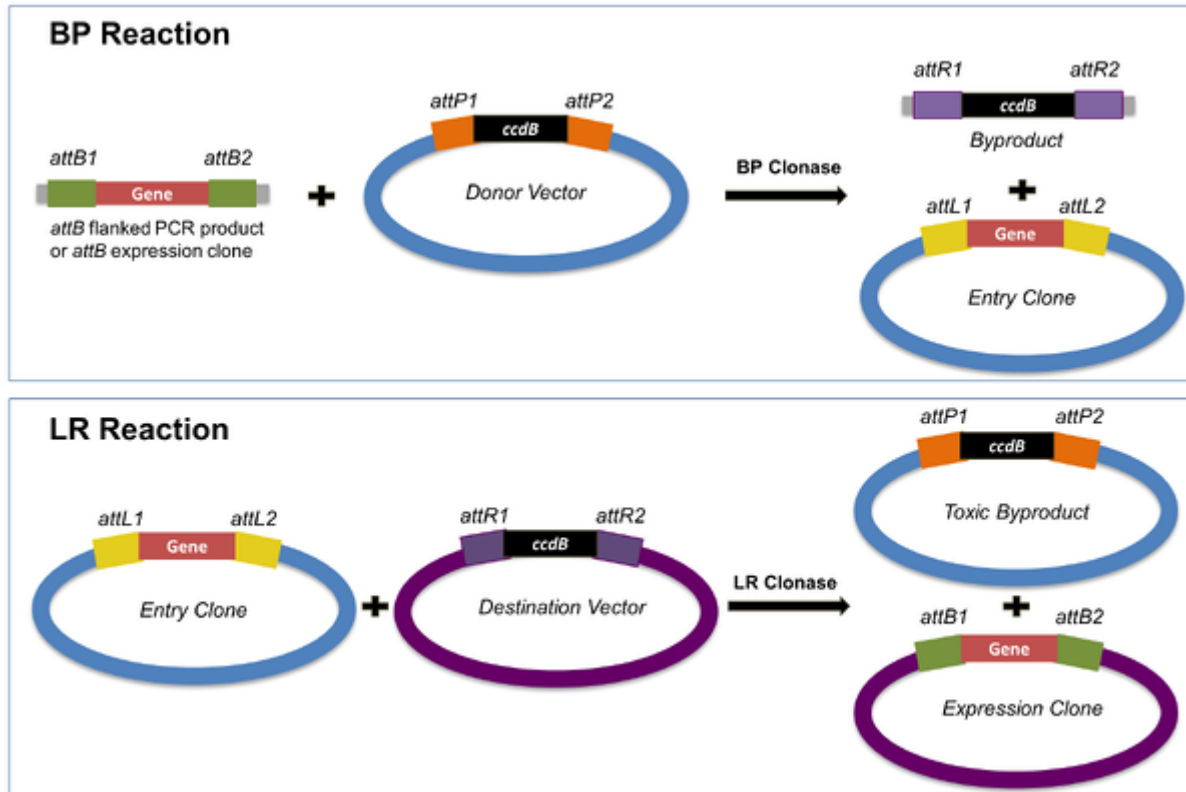


Figura 5 Diagrama de reacción BP y LR de la técnica de clonación Gateway (Katzen, 2007).

El clon inicial se compone de un plásmido en el cual el fragmento deseado se conecta a las secuencias attL. Una vez obtenido este vector de entrada, el fragmento deseado se transfiere a un segundo plásmido, conocido como vector destino. En esta etapa, se lleva a cabo una subclonación, donde el clon de entrada presenta las secuencias attL y el vector destino incorpora las secuencias attR. Para lograr esta modificación, se emplean las proteínas Int, IHF y Xis, junto con la enzima LR clonasa. Posteriormente, este proceso se completa mediante la introducción de este nuevo vector en células de *E. coli* que son competentes para la transformación. Como resultado, se obtienen dos opciones de selección distintas: el clon de entrada y el vector destino. Ambos portan genes de resistencia a antibióticos diferentes, como kanamicina o ampicilina. Además, el vector destino incluye un marcador ccdB que facilita la identificación de las células transformadas con el clon que se pretende expresar (Katzen, 2007).

4.9 Ensayos de infección: GUS y fluorescencia GFP

Las primeras aplicaciones de un nuevo sistema de genes reporteros en plantas transgénicas se demostraron en 1987 por Richard Jefferson (Hull, et al., 1995.). Para analizar y comprender el papel que desempeña un gen de algún organismo es necesario conocer su expresión espaciotemporal, para esto se han desarrollado diversas estrategias para utilizar construcciones de genes reporteros que codifican a alguna proteína para su fácil estudio. Existen dos reporteros comunes en las plantas: β -glucuronidasa (GUS) y la proteína verde fluorescente (GFP), GUS es codificada por el gen *uidA* de *E. coli*, mientras que GFP de la medusa *Aequorea victoria* (Mudunkothge & Krizek, 2014).

Estos genes reporteros han sido utilizados para identificar elementos promotores involucrados en la regulación de la expresión génica como lo son la regulación específica del tejido y del desarrollo, regulación hormonal, respuesta a heridas y fotorregulación, entre otras. GUS ha sido utilizado en estudios referentes a la transformación de plantas con el fin de estudiar los mecanismos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Hull & Devic, 1995.).

Existen tres tipos de reporteros: transcripcionales, traduccionales y traslacionales. Los reporteros transcripcionales consisten en impulsar la expresión de GUS a partir de la región promotora de un gen teniendo, como objetivo el informar sobre la actividad del promotor. Por otro lado, los reporteros trasduccionales se basan en una fusión de un gen de interés para GUS, controlado por la región promotora. Finalmente, los reporteros traslacionales se encuentran con secuencia ascendente 5' para exones e intrones y secuencia UTR 3' (Mudunkothge & Krizek, 2014)

GUS puede ser utilizado para identificar genes que se expresan en un tejido particular de la planta, o bien, en una etapa en particular. Cuando se practican ensayos histoquímicos, se utiliza el sustrato 5-bromo-cloro-3-indolil glucurónido (X-gluc), el producto de la hidrólisis sufre una dimerización oxidativa que da como resultado un precipitado de color azul (Mudunkothge & Krizek, 2014). Observaremos esta coloración en los resultados obtenidos en esta tesis.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Identificar, caracterizar y analizar la función del gen *ATG9b* durante el establecimiento y desarrollo de la interacción simbiótica entre *Rhizobium tropici* y *Phaseolus vulgaris*. Así como la clonación del gen interactuante *CDO*.

5.2 Objetivos específicos

1. Generar raíces transgénicas peludas expresando el vector pBGWFS7.0-OX::*PvATG9b*.
2. Analizar el fenotipo de la raíz de pBGWFS7.0-OX::*PvATG9b* y del vector vacío expresado en las raíces control.
3. Estudio del fenotipo simbiótico del nódulo radicular tras la inoculación con *R. tropici*.
4. Identificación de cisteína dioxigenasa (CDO) de *P. vulgaris* y aislamiento de 366 pb de la región 3'UTR de *PvCDO*.
5. Clonación de *PvCDO* usando la técnica Gateway en el vector RNAi pK7GWIWG2D(II).

6. Hipótesis

Phaseolus vulgaris es considerado uno de los cultivos de mayor relevancia a nivel global, y optimizar su crecimiento y desarrollo resulta fundamental para obtener un rendimiento agrícola más elevado. Las leguminosas pueden establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno llamadas rizobios. La SNF de *P. vulgaris* con *R. tropici* permite establecer un equilibrio en las concentraciones de nitrógeno cuando el suelo carece de este o bien, cuando la planta se enfrenta a algún estrés.

Para lograr desarrollar una adaptación al estrés, *P. vulgaris* establece una relación simbiótica con *R. tropici*, promoviendo una serie de cambios transcripcionales y postrasduccionales, activando ciertas rutas metabólicas dirigidas por diferentes genes, entre ellas la ruta de la autofagia en donde los genes *PvATG* desempeñan un papel muy importante.

La autofagia ha sido poco estudiada en plantas, sin embargo, estudios previos realizados en nuestro grupo de laboratorio identificaron los genes involucrados en este proceso, en donde se analizó la función del gen *PvATG9b* mediante el silenciamiento y el estudio espacio-temporal de este, encontrando que es una proteína transmembranal única en vesículas, esencial para la generación de los autofagosomas, en donde el fenotipo, cuando *PvATG9b* se encuentra silenciado, se formaban hilos de infección anómalos, las raíces secundarias tenían un crecimiento reducido y las hojas presentaban un tamaño pequeño y una tonalidad amarillenta. En cuanto a la distribución, los análisis de localización detectaron la presencia de *PvATG9b* en áreas como el tejido vascular, la extremidad de las raíces laterales y los pelos radiculares (Quezada-Rodríguez et al., 2021).

Con base en estos estudios, creemos que la sobreexpresión de *ATG9b* en las raíces de *P. vulgaris* incrementará el éxito en la formación de hilos de infección y, por lo tanto, de nódulos primordiales derivados de la simbiosis establecida con *R. tropici*.

El papel de la autofagia en las asociaciones simbióticas de leguminosas es uno de los aspectos menos comprendidos. Investigaciones actuales resaltan el papel crucial de los procesos relacionados con la autofagia en la simbiosis de los nódulos radiculares. Sin embargo, ninguno de los genes de autofagia se identifica como reguladores directos de los procesos simbióticos. En el presente estudio proponemos a *ATG9b* como candidato a gen clave de autofagia involucrado en la simbiosis de nódulos de raíz debido a su alta expresión en condiciones simbióticas. Además, la interacción de *ATG9b* con el gen relacionado con la hipoxia de la cisteína dioxigenasa (CDO) y los genes de leghemoglobina, nos lleva a plantear una hipótesis en la cual *ATG9b* desempeña un papel importante en la fijación simbiótica de nitrógeno.

7. Metodología

7.1 Fenotipado de la sobreexpresión del gen *ATG9b* en *P. vulgaris*

Optamos por aumentar la expresión del gen *PvATG9b* con el propósito de examinar el crecimiento y desarrollo de la planta, así como la formación de los nódulos radiculares en el contexto de su interacción simbiótica con *R. tropici*.

7.1.1 Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión *PvATG9b-OX /pBGWFS7.0* en *A. rhizogenes*

Se pusieron a germinar semillas de *P. vulgaris* negro Jamapa en una incubadora a 28 °C por 48 horas. Un día antes de la inyección se realizó un cultivo en placas con 100 µL del cultivo K599/ *PvATG9b* y 100 µL del cultivo control de sobreexpresión en placas LB agar (figura S13) con espectinomicina (200 µg/mL). El día de la inyección se retiró la testa de las semillas, se colocaron en tubos Falcon de 15 mL con medio ByD (figura S9) previamente esterilizados, se tomó el cultivo de las placas de Petri en tubos de microcentrífuga formado una alícuota que posteriormente se inyectó en la raíz principal de cada semilla. Finalmente se taparon y se incubaron a 28°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad, regando a diario.

7.1.2 Inoculación de las plantas con el vector *ATG9b-OX /pBGWFS7.0* con *R. tropici*

Transcurridos 10 días desde la inyección, se comprobó la presencia de raíces peludas transformadas observando la fluorescencia GFP con un estereoscopio. Una vez confirmado esto se cortaron aquellas raíces que no tenían fluorescencia y la planta se traspasó a tierra dejándolas 24 horas para su adaptación. Dos días antes de la inoculación se colocó el cultivo de *Rhizobium tropici* cepa CIAT899 (figura S12) en 150 mL de medio PY líquido (figura S10) a 28 °C en agitación 200 RPM. El día de la inoculación se colocaron 4 mL del cultivo de *R. tropici* a cada una de las plantas.

7.1.3 Fenotipado de *P. vulgaris* durante la simbiosis con *R. tropici*

Después de 21 días desde la inoculación, se realizó una evaluación del tamaño, la forma, el número y la etapa (primordial, madura, senescente) de los nódulos de cada una de las plantas. Se midió el tamaño de las raíces, la cantidad de raíces primarias y secundarias, así como el tamaño de tallos y hojas.

7.2 Identificación y clonación de CDO en vector RNAi

7.2.1 Identificación de la secuencia del RNAi del gen CDO

Se buscó la secuencia genómica de *Phaseolus vulgaris* utilizando la base de datos del sitio web Phytozome v12.1 (<http://www.phytozome.net>) y se seleccionaron 23 pb para el oligo forward y 24 pb para el oligo reverse, correspondientes a la 370 pb en el extremo 3' de secuencia del gen *CDO*.

7.2.2 Análisis de la secuencia de PvCDO-RNAi

Utilizando el programa Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) se analizó que los oligos no tuvieran ninguna discrepancia, que no hubiera homologías para evitar la unión en sitios distintos al de interés, que los oligos no formaran estructuras complementarias, que la temperatura de fusión (TM) fuera de 55 °C o más sin variar más de 2 °C entre cada oligo, que no hubiera más de 3 G o C consecutivas y finalmente que tuvieran un contenido de G / C entre el 40 y 60 %.

7.2.3 Diseño de oligos específicos para CDO-RNAi

Finalmente se solicitaron los oligos al Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM. El diseño final de los oligos se muestra en la Figura S1.

7.3 Clonación del RNAi de CDO

7.3.1 Amplificación del fragmento de RNAi de CDO

Se utilizaron los oligos específicos diseñados previamente para *PvCDO-RNAi* y utilizando la técnica de PCR se amplificó un fragmento de 370 pb. Posteriormente se confirmó la amplificación por medio de electroforesis para finalmente purificar las bandas positivas del gel de agarosa utilizando el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction. Los detalles acerca de los componentes, las cantidades y el programa utilizado en la reacción de PCR están representados en la Figura S2.

7.3.2 Introducción del fragmento CDO-RNAi al vector pENTR/D-TOPO

Se utilizó el vector de entrada pENTR/D-TOPO (figura S15) para la introducción del fragmento CDO-RNAi amplificado por PCR. Se realizó una elución utilizando Gene Jet Gel Kit añadiendo 6 µL del producto PCR, 1 µL de sal y 0.65 µL del vector pENTR para finalmente incubar a temperatura ambiente toda la noche. Los detalles acerca de los componentes, las cantidades y el programa utilizado en la reacción de PCR están representados en la Figura S3.

7.3.3 Transformación de *E. coli* top10 con el vector CDO-RNAi/ pENTR

Un tubo que contenía 100 µL de células competentes de *E. coli* Top 10 fue descongelado en hielo durante 15 minutos. Luego, se añadió la reacción del vector (pENTR/CDO-RNAi) a las células competentes y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de este período, se sometió a las células a un choque térmico a 42°C durante 50 segundos, seguido inmediatamente de un enfriamiento en hielo durante 4 minutos. Para finalizar, se incorporaron 500 µL de medio líquido LB (conforme se muestra en la Figura S14) y las células se incubaron a 37°C con agitación durante 1 hora.

Se prepararon placas Agar LB con Kanamicina (50 µg/mL) y se plaquearon 100 y 150 µL del cultivo anterior. Finalmente se incubaron a 37°C por 24 horas.

7.3.4 PCR de colonias con el plásmido pENTR *E. coli* Top 10

Al día siguiente, se verificó el crecimiento de colonias y se llevó a cabo una PCR en algunas de ellas para confirmar la transformación exitosa.

Después se llenó un tubo Falcon con 6 mL de medio LB con Kanamicina (50 µg/mL) de la colonia positiva seleccionada para crecer la cepa en agitación a 37°C por 24 horas. Después se realizó un miniprep utilizando el Kit GeneElute Plasmid Miniprep de Sigma siguiendo los pasos que este indica para obtener los plásmidos.

7.3.5 PCR con oligos M13 del plásmido de CDO-RNAi/ pENTR

Se realizó un PCR del plásmido pENTR utilizando los oligos M13 (Forward y Reverse) para inducir el fragmento de CDO-RNAi al vector final. Los detalles acerca de los componentes, las cantidades y el programa utilizado en la reacción de PCR están representados en la Figura S4.

7.3.6 Inserción del fragmento CDO-RNAi al vector final pK7GWIWG2D(II) -RNAi::PvCDO

Se mezclaron 3.5 µL el plásmido pENTR/CDO-RNAi-1, 1.5 µL del vector final pK7GWIWG2D(II) y 1 µL de la clonasa LR. La reacción se incubó a 65 °C por 5 minutos para después enfriarse en hielo durante 2 minutos. Finalmente se incubó a temperatura ambiente por 48 horas.

7.3.7 Transformación de *E. coli* top 10 con el vector final pK7GWIWG2D(II) - RNAi::PvCDO

En la mezcla previa, se introdujo 1 μL de proteinasa K y se incubó a 31 °C durante 10 minutos. Luego, se descongeló en hielo un tubo que contenía 100 μL de células competentes de *E. coli* Top 10 durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió la reacción del vector (pK7GWIWG2D(II) /CDO-RNAi) a las células competentes y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 50 segundos, seguido inmediatamente de un enfriamiento en hielo durante 4 minutos. Luego se incorporaron 500 μL de medio LB y las células se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 hora.

Se prepararon placas Agar LB con espectinomicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se sembraron volúmenes de 100, 150 y 250 μL del cultivo previo en las placas. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

7.3.8 PCR de colonias con el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO *E. coli* Top 10

Al día siguiente, se volvió a verificar el crecimiento de las colonias y se realizó una PCR de algunas de ellas para confirmar la transformación exitosa. También se llevó a cabo una técnica llamada "patch plate". Los detalles acerca de los componentes, cantidades y el protocolo utilizado en la reacción de PCR se pueden observar en la Figura S5.

Luego, se llenó un tubo Falcon con 6 ml de medio LB que contenía espectinomicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una colonia positiva seleccionada. Este tubo fue colocado en agitación a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de la cepa. Posteriormente, se realizó un procedimiento de minipreparación utilizando el Kit GeneElute Plasmid Miniprep de Sigma, siguiendo los pasos indicados en el kit, para obtener los plásmidos deseados.

7.3.9 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599)

Se descongeló en hielo un tubo con 50 μL de células competentes de *A. rhizogenes* K599. Después, se agregaron 3 μL de pl-GFP/CDO-Ri a las células y se colocaron en hielo por 30 min. Posteriormente, se transfirieron los 53 μL de células a la cubeta de electroporación pre-enfriada y se utilizó el MicroPulser a 1.80 Kv por 0.1 cm de cubeta por pulsación de 5 msegundos. La cubeta se colocó en hielo por 5 minutos al finalizar este proceso. A continuación, se tomaron las células de la cubeta y se agregaron en 500 μL de LB sin antibióticos para finalmente incubar en agitación a 28 °C por 2 horas.

Se prepararon cajas Agar LB con espectinomicina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se plaquearon 100, 150 y 250 μL del cultivo. Estas placas se incubaron a 28 °C por 3 días.

7.3.10 PCR de colonias con el plásmido pK7GIWG2D(II)-RNAi::PvCDO de *A. rhizogenes*

Al día siguiente, se verificó nuevamente el crecimiento de las colonias y se llevaron a cabo tanto un patch plate como una PCR de algunas de las colonias para confirmar la transformación exitosa. Los detalles acerca de los componentes, las cantidades y el programa utilizado en la reacción de PCR se pueden observar en las Figuras S7 y S8.

Se colocaron 6 mL de medio LB con espectinomicina (200 µg/ml) y se cultivaron las colonias positivas, se colocó en agitación a 28 °C por 24 horas para posteriormente preparar stock con 500 µL de glicerol al 80 % y 500 µL del cultivo, los cuales se guardaron a -80 °C.

7.4 Fenotipado del silenciamiento del gen CDO en *P. vulgaris*

Silenciamos el gen CDO para analizar el crecimiento y desarrollo de la planta, así como los nódulos radiculares durante su asociación simbiótica con *R. tropici*.

7.4.1 Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de silenciamiento CDO-Ri /pK7GIWG2(II) en *A. rhizogenes*

Se llevó a cabo la germinación de semillas de *P. vulgaris* en una incubadora a 28 °C por 48 horas. Un día previo a la inyección, se plaquearon 100 µL del cultivo CDO-Ri/ K599 y 100 µL del cultivo control de sobre expresión en placas LB agar (figura S13) con espectinomicina (200 µg/mL). El día de la inyección se retiró la testa de las semillas, se colocaron en tubos Falcon con medio ByD (figura S9) previamente esterilizados, se tomó el cultivo de las placas petri en tubos eppendorf formado una alícuota que posteriormente se inyectó en la raíz principal de cada semilla. Finalmente se taparon y se incubaron a 28 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de oscuridad, regando a diario.

7.4.2 Inoculación de las plantas con el vector CDO-Ri / pK7GIWG2(II) con *R. tropici*

Transcurridos 10 días desde la inyección, se comprobó la presencia de raíces peludas transformadas observando la fluorescencia GFP con un estereoscopio. Una vez confirmado esto se cortaron aquellas raíces que no tenían fluorescencia y la planta se traspasó a tierra dejándolas 24 horas para su adaptación. Dos días antes de la inoculación se colocó el cultivo de *Rhizobium tropici* cepa CIAT899 (figura S12) en 150 mL de medio PY líquido (figura S10) a 28 °C en agitación. El día de la inoculación se colocaron 4 ml del cultivo de *R. tropici* en cada una de las plantas.

8 Resultados

8.1 Fenotipado de la sobreexpresión del gen *ATG9* en *P. vulgaris*

Estructura de *PvATG9b*

PvATG9b (Phvul.007G194300) se localiza en el cromosoma 7: 31618092-31623866, cuenta con 2,622 pb de las cuales se dividen en 9 exones y 8 intrones (figura 4). La secuencia de codificación se amplificó con oligos específicos de genes y se clonó en el vector de sobreexpresión pBGWFS7.0 mediante la tecnología Gateway según las instrucciones del fabricante. El vector binario *PvATG9-OX* se transformó en *A. rhizogenes*.

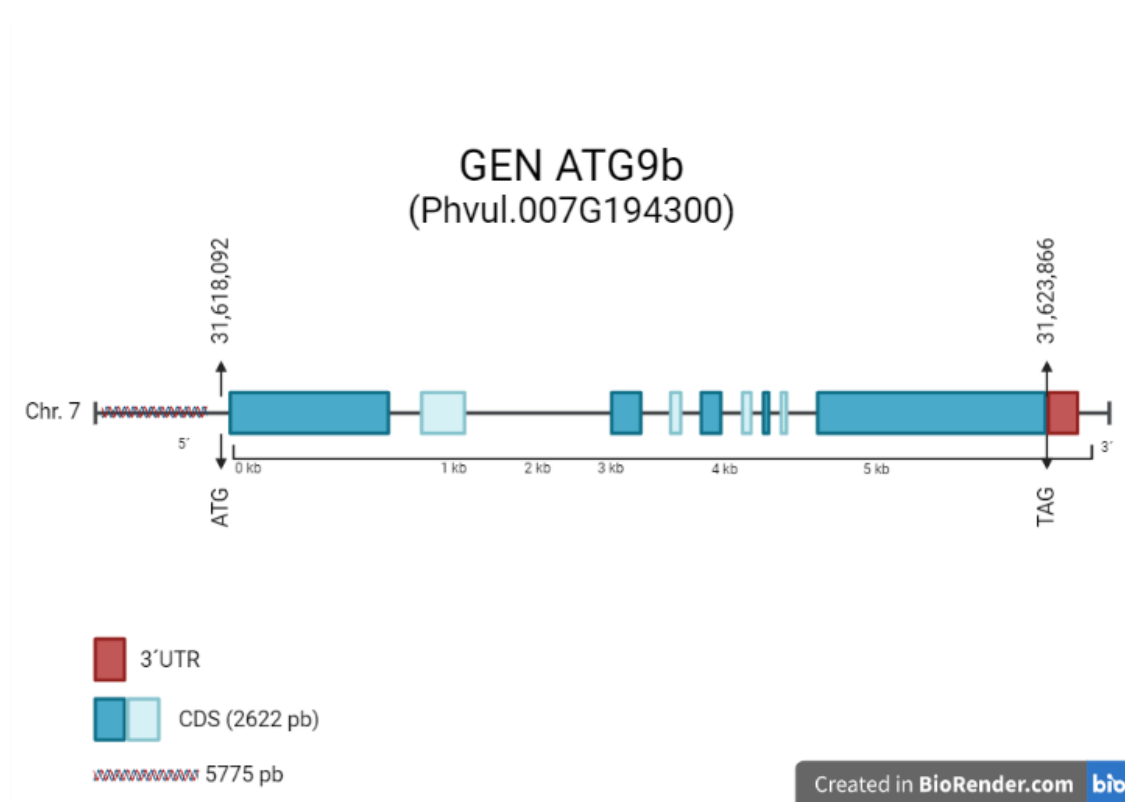


Figura 6 *PvATG9b* (Phvul.00G194300). Estructura del gen en el cromosoma 7 con 9 exones y 8 intrones. Figura creada en BioRender.com

8.1.1 Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión *ATG9b-OX* /pBGWFS7.0 en *A. rhizogenes*

Se inyectaron las semillas de *P. vulgaris* con K599/*ATG9b-OX* como se muestra en la figura 5A), a los 14 días de emergencia (figura 5B) se confirmó su

transformación mediante fluorescencia GFP en estereoscopio. En la figura C se observa la transformación de raíces pilosas en las plantas control mientras que en la figura D la transformación de raíces pilosas en las plantas inyectadas con el vector de sobreexpresión. Ambas mostraron fluorescencia indicándonos una transformación positiva.

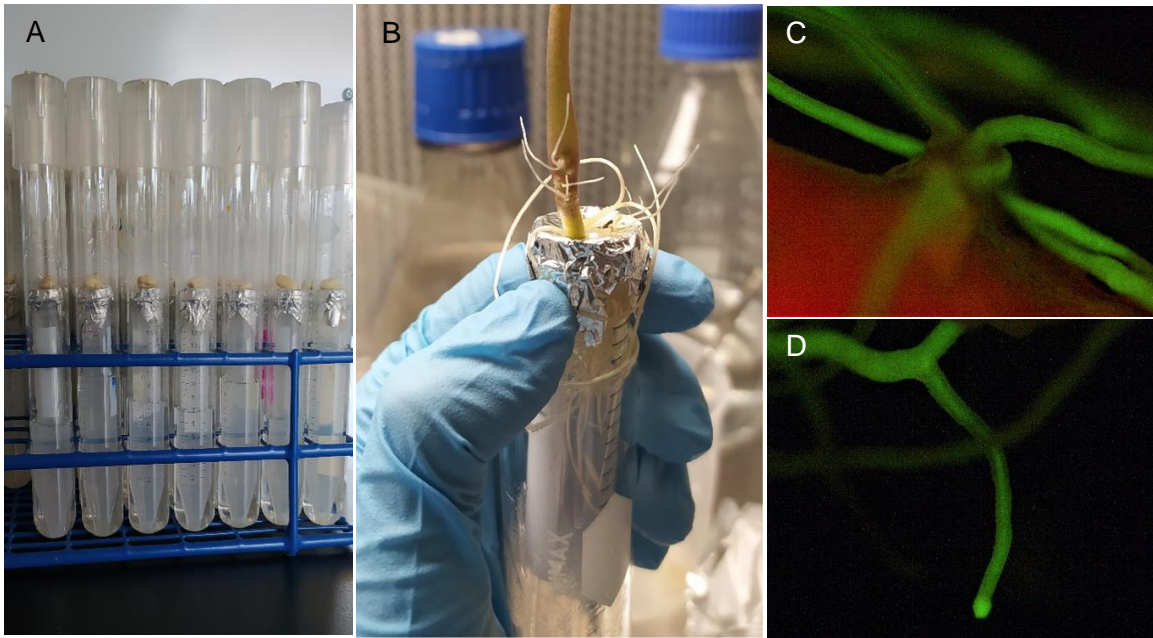


Figura 7 Transformación de raíces en *P. vulgaris*. A) inyección de *A. rhizogenes* K599 con vector de sobreexpresión PvATG9b en raíces de *P. vulgaris*. B) Emergencia de raíces pilosas a los 14 días post inyección. C) Raíz pilosa transformada fluorescente (GFP) de plantas control. D) Raíz pilosa transformada fluorescente (GFP) de plantas con vector de sobreexpresión PvATG9b.

8.1.2 Inoculación de las plantas con el vector *ATG9b-OX /pBGWFS7.0* con *R. tropici*

Tras la transformación de raíces, se cortaron aquellas que no tenían fluorescencia, después se trasplantaron en tierra como se muestra en la figura 6 y se aclimataron durante 1 día en la cámara de crecimiento. Finalmente se realizó la inoculación agregando 5 ml del cultivo de *R. tropici* (con genes reporteros: RFP/GUS) y se llevaron al invernadero. Las plantas control presentaron menor tamaño en comparación con las *ATG9b-OX*.



Figura 8 Inoculación con *R. tropici* a plantas *P. vulgaris*. A) Plantas PvATG9b. B) Plantas control.

8.1.3 Fenotipado de *P. vulgaris* durante la simbiosis con *R. tropici*

Pasados 21 días desde la inoculación, se procedió a enjuagar las raíces con agua del grifo y se llevó a cabo el recuento de nódulos presentes en cada planta. El conteo de nódulos se realizó manualmente, observando cada nódulo en las raíces y categorizándolo como primario, maduro o senescente en función de su estado de desarrollo, determinado por su color y tamaño. En la Figura 9 se observan los nódulos radiculares observados bajo estereoscopio en donde A corresponde a las raíces de las plantas control y B a las plantas con el vector de sobreexpresión *PvATG9b-OX*. En A se observa un menor número de nódulos los cuales se encontraron principalmente en etapa madura mientras que B presentó un mayor número de nódulos, la mayoría en etapa primordia.



Figura 9 Clasificación de nódulos en *P. vulgaris* durante la simbiosis con *R. tropici*. A) Control: nódulos en etapa madura. B) *PvATG9b-OX*: Nódulos en etapa primordia.

El menor crecimiento, así como la mayor cantidad de nódulos fue una característica muy notoria en aquellas raíces que contenían el vector de sobreexpresión *PvATG9b* en donde se observó un mayor número de nódulos en etapa primordial en comparación con las raíces de las plantas control en las que se observó un menor número de nódulos, los cuales se encontraban mayoritariamente en etapa madura y con vasculaturas bien definidas a los 21 días después de la inoculación. Posteriormente se realizó un RT-qPCR, el conteo de nódulos según su etapa (primordial, madura o senescente), se midió el largo de la raíz principal utilizando una regla, así como la densidad de raíz lateral, obteniendo los siguientes datos mostrados en la Figura 10:

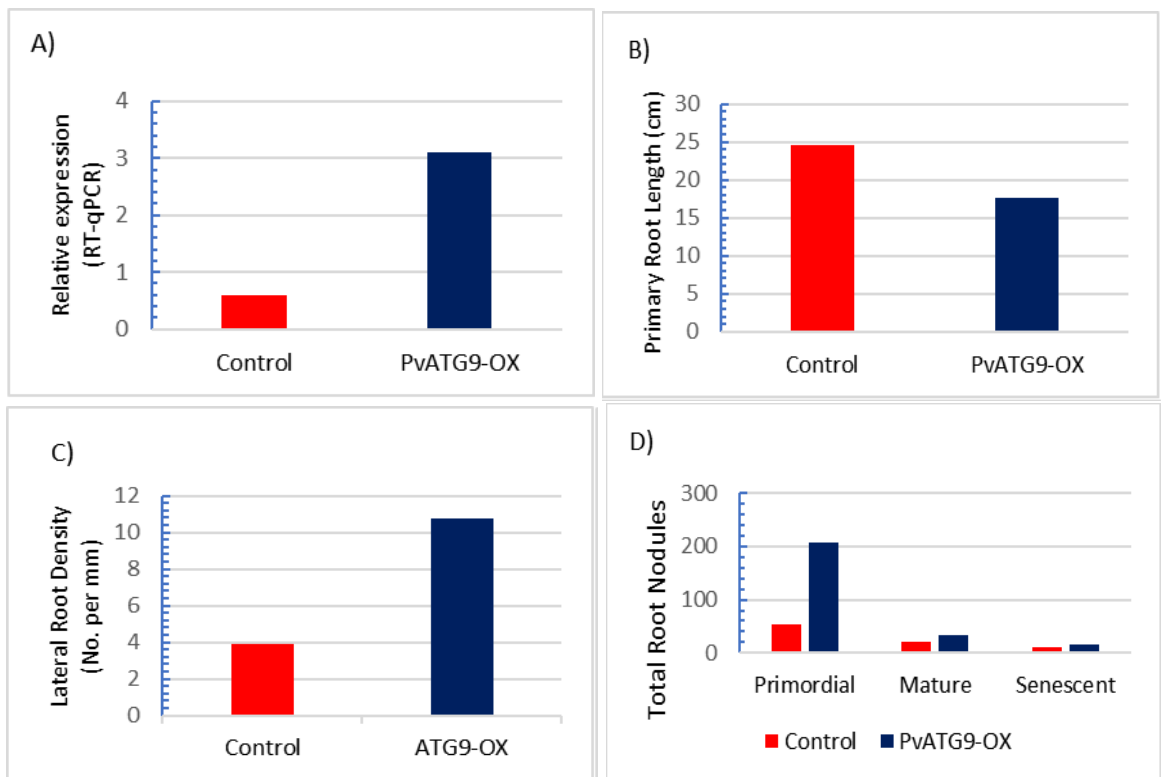


Figura 10 Análisis fenotípicos de las raíces transformadas de *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión *PvATG9b* durante la simbiosis con *R. tropici*. A) RT-qPCR. B) Largo de la raíz primaria. C) Densidad de la raíz lateral. D) Total de nódulos radiculares por etapa de crecimiento (primordial, maduro o senescente).

En la Figura 10 se observan los datos obtenidos de las diferencias entre las plantas control y aquellas que contenían el vector de sobreexpresión *PvATG9b-OX*. En la figura 10 A) pudimos observar que la expresión relativa del gen *PvATG9b-OX* era hasta 3 veces mayor comparada con la expresión del mismo gen en las plantas control, lo cual nos indicó que la sobreexpresión se realizó de manera exitosa.

En la Figura 10 B), se puede observar la longitud de la raíz primaria. Se observa que las plantas del grupo de control mostraron un mayor crecimiento en comparación con las plantas *PvATG9b-OX*, donde las raíces del grupo de control alcanzaron una longitud de hasta 25 cm, mientras que las que contenían el vector de sobreexpresión tuvieron una longitud de 16 a 17 cm. Esto sugiere que la expresión del gen *PvATG9b* no está asociada con el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria y que la sobreexpresión de este gen no impacta en el desarrollo de la raíz primaria.

Por otro lado, en la Figura 10 C), se muestra la densidad de las raíces laterales en términos del número total de raíces laterales por milímetro. Se observa que esta densidad aumentó hasta 2.5 veces en las plantas que contenían el vector de sobreexpresión *PvATG9b-OX* en comparación con las plantas de control.

Finalmente se realizó el conteo de nódulos de las raíces a los 21 días después de la inoculación (Figura 10 D), clasificándolos según su etapa de maduración (primordial, maura y senescente); se encontró que la cantidad de nódulos fue mucho mayor en aquellas plantas que contenían el vector de sobreexpresión *PvATG9b-OX*, específicamente en la etapa primordial.

Esto último nos indicó que el gen *ATG9b* está involucrado durante el proceso de infección de *R. tropici* en la planta más no en el crecimiento y desarrollo nodular. Comparando con las raíces de las plantas control, observamos que la mayor cantidad de nódulos de estas plantas se encontraron en la etapa de maduración.

8.2. Identificación y análisis del RNAi de *CDO*

8.2.1 Identificación de la secuencia del RNAi del gen *CDO*

En la red de proteínas de la biblioteca de cDNA de *P. vulgaris*, con el *PvATG9b* se encontró la interacción de *CDO* y Leghemoglobina (Lb) (Figura 1A), así como la interacción entre *CDO*, Lb y *ATG9* (Figura 1B) en donde *CDO* actúa como un intermediario entre ambas Lbs al momento de la expresión de *ATG9* durante la simbiosis con *R. tropici*.

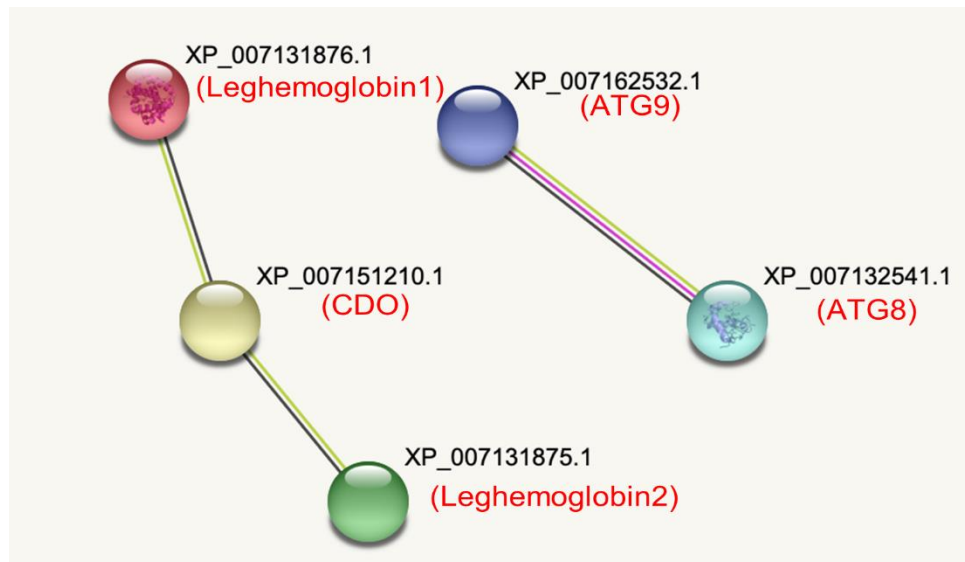
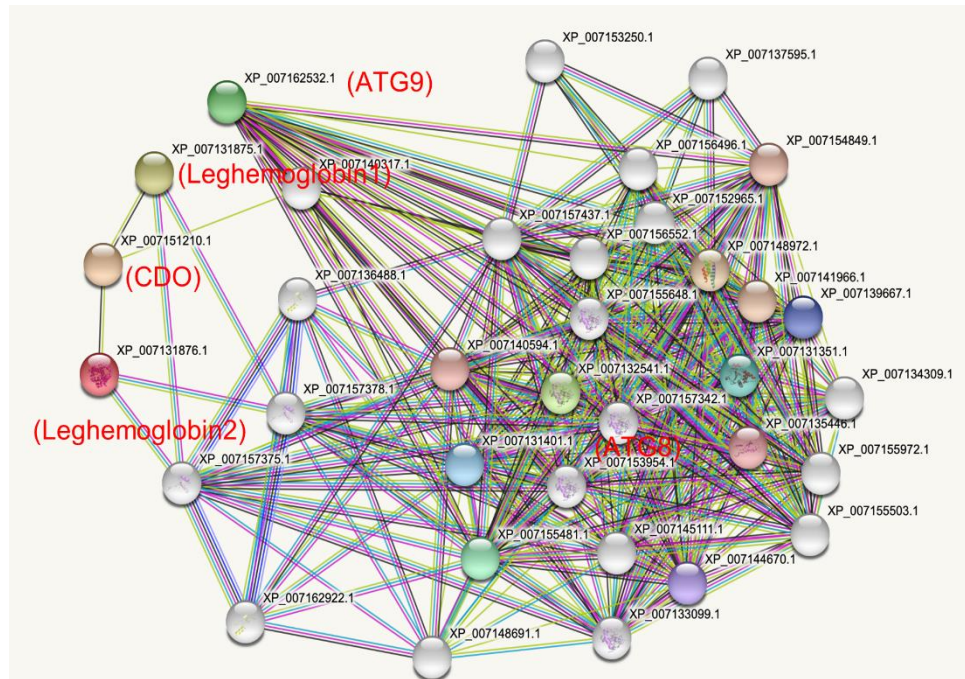


Figura 11 A) Interacción entre la red de proteínas de la biblioteca de cDNA de *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión ATG9b. B) Interacción entre CDO, Lb y ATG9b en *P. vulgaris* con el vector de sobreexpresión ATG9b.

8.3. Clonación del RNAi de *CDO*

8.3.1 Amplificación del fragmento de RNAi de *CDO*

Se realizó la amplificación del fragmento con un tamaño de 370 pares de bases (Figura 12), se utilizaron los oligos específicos previamente diseñados (Figura S2). El producto amplificado se separó en un gel de agarosa al 1.2 %, por 30 min a 100 V. Se utilizaron 4 μ L del marcador de peso molecular 1Kb Plus de la marca Invitrogen para comparar el tamaño del fragmento amplificado con el esperado. Se visualizó en ambos carriles (1 y 2) un tamaño de 370 pb, lo cual nos indicó una amplificación exitosa.

Posteriormente, el fragmento se extrajo del gel utilizando el Kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction, siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de esto, se verificó el tamaño correcto del fragmento purificado y se almacenó a una temperatura de -20 °C.

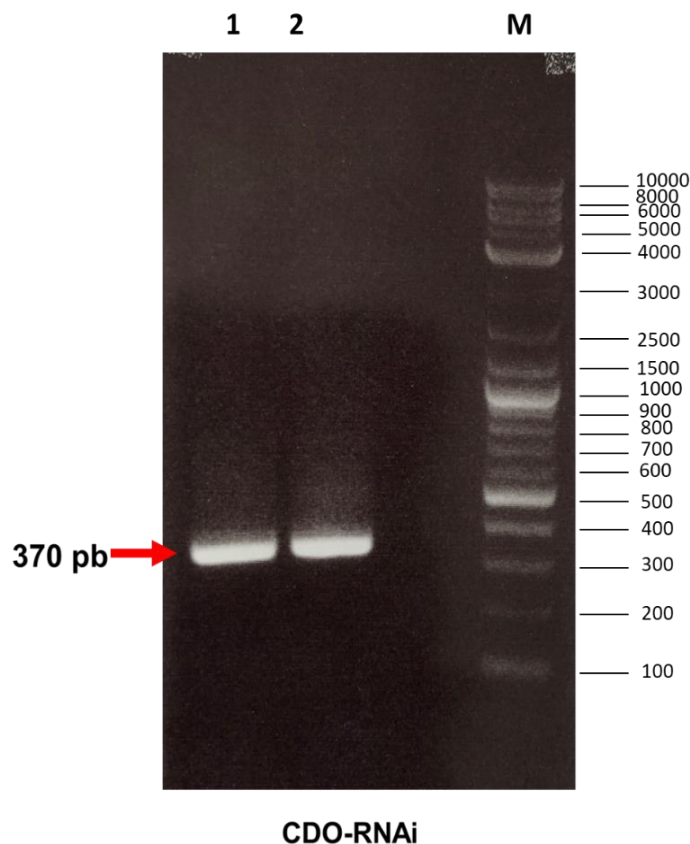


Figura 12 Amplificación del fragmento *CDO-RNAi* con PCR. Gel de agarosa al 1.2%. Carril 1 y 2 producto de PCR, carril M con Marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus.

8.3.2 Introducción del fragmento CDO-RNAi al vector pENTR/D-TOPO

Se llevó a cabo la inserción del fragmento CDO-RNAi en el vector de entrada pENTR/D-TOPO, y se confirmó su tamaño mediante la técnica de PCR y posterior análisis por electroforesis. En la Figura 13, se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Plus. En el primer carril se muestra el control obtenido de la amplificación anterior (Figura 12), mientras que en el segundo carril se presenta el producto de PCR (pENTR/CDO-RNAi) junto al vector de entrada.



Figura 13 PCR pENTR/CDO-Ri. Carril 2 "M" marcador de peso molecular 1Kb plus, 3 "+ve" Control positivo, 4 Producto PCR. Tamaño del fragmento 370 pb.

8.3.3 Transformación de *E. coli* TOP10 con el vector CDO-RNAi/ pENTR

Se plaquearon 2 cajas petri de LB sólido con Kanamicina (50 µg/mL) utilizando el cultivo obtenido de la transformación con concentraciones de 100 y 150 µL, al pasar 24 horas a 37 °C se observó crecimiento de colonias aisladas en cada una de las placas, lo cual nos indicó que había células transformadas ya que contenían la resistencia a kanamicina.

8.3.4 PCR de colonias con el plásmido pENTR *E. coli* Top 10

Tras la transformación en *E. coli* TOP10 con el vector de entrada, se realizó un PCR de colonias para confirmar el crecimiento y transformación de colonias positivas. En la Figura 14 observamos, por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 1.2 %, que todas las colonias seleccionadas fueron positivas al tener el tamaño de banda esperado igual a 370 pb, igual al control positivo utilizado (figura 9), en donde “M” corresponde al carril cargado con el marcador de tamaño molecular 1 Kb, los números corresponden al número de colonia seleccionada de cada placa y “+ve” al control positivo utilizado.

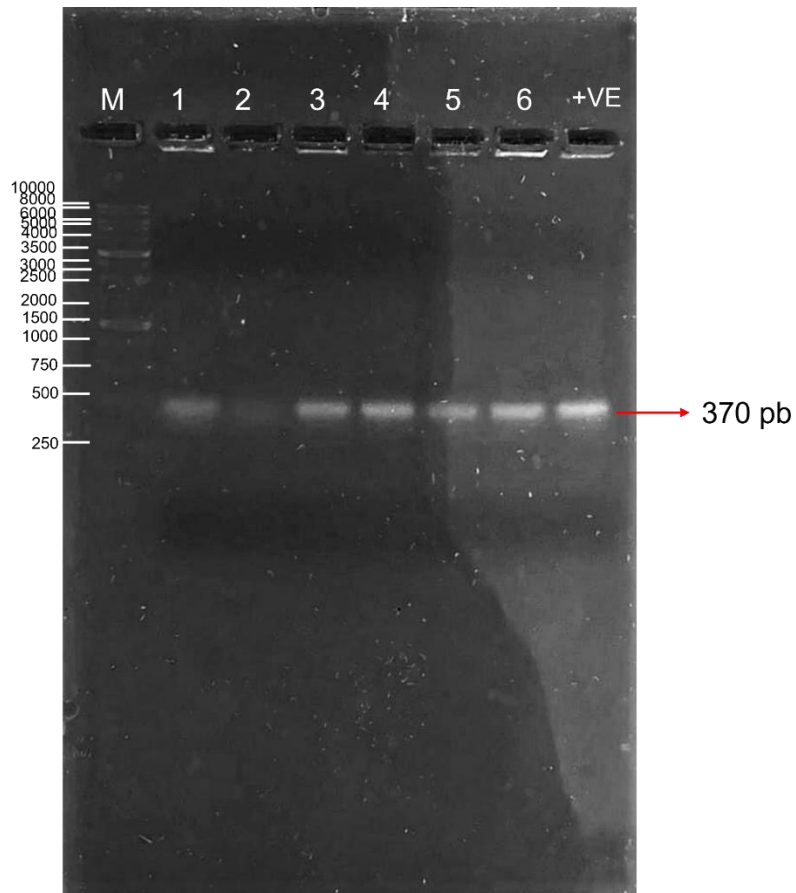


Figura 14 PCR de colonias apENTR/CDO-Ri (carriles 2-7). Marcador de tamaño molecular 1 Kb (carril 1) y control positivo ((carril 8) (figura 9)).

8.3.5 PCR con oligos M13 del plásmido de CDO-RNAi/ pENTR

Luego de llevar a cabo la PCR utilizando los oligos M13, se procedió a confirmar el tamaño del plásmido mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.2 %. Las bandas resultantes coincidieron con el tamaño esperado de 370 pares de bases, lo cual fue confirmado al comparar con la banda de control positivo cargada en el gel.

8.3.6 Transformación de *E. coli* top 10 con el vector final pK7GWIWG2D(II) - RNAi::PvCDO

Se realizó una transformación utilizando las bacterias *E. coli* TOP10 (Figura S8). Se prepararon cajas Petri con medio Agar LB y espectinomicina al 200 % y se plaquearon concentraciones de 100, 150 y 200 μ L, de las cuales se obtuvieron colonias positivas (Figura 15). Luego se procedió a llevar a cabo una PCR de las colonias seleccionadas para confirmar su tamaño. Estas colonias se eligieron en función de su tamaño y crecimiento dentro de las placas. Específicamente, se escogieron las colonias 4, 5, 6, 7, 16, 17, 18 y 19, tal como se ilustra en la Figura 15. En esta figura, se puede observar que todas las bandas resultantes presentan un tamaño de 370 pares de bases.

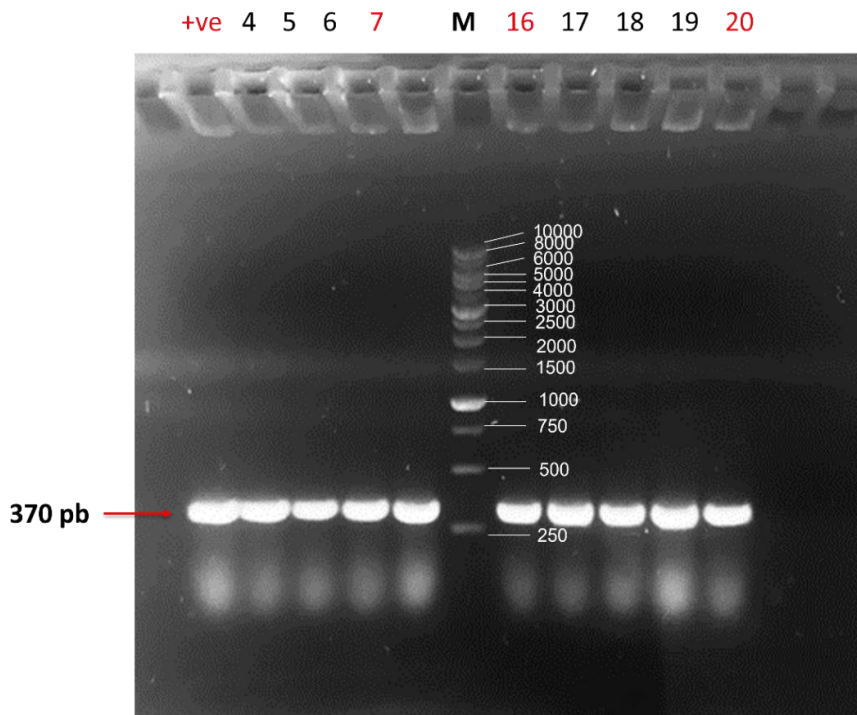


Figura 15 Introducción del fragmento amplificado al vector final pK7GWIWG2D(II). PCR colonias α CDO-RiGFP: carril +ve cargada con el producto de la amplificación (figura 9) seguido de 4 carriles cargados con el producto de PCR de colonias (4-7 y 16-20), marcador "M" de tamaño molecular 1 Kb.

8.3.7 PCR de plásmido pK7GIWG2D(II)-RNAi::PvCDO *E. coli* Top 10

Finalmente se realizó un aislamiento de plásmidos de las colonias seleccionadas con base en el PCR anterior (7, 16 y 20), utilizando el kit GeneElute Plasmid Miniprep de Sigma siguiendo los pasos que este indica. Finalmente se realizó un PCR y se confirmó la extracción del plásmido mediante electroforesis como se muestra en la Figura 16 en donde podemos observar el tamaño de los fragmentos en 370 pb indicándonos que el aislamiento fue correcto.

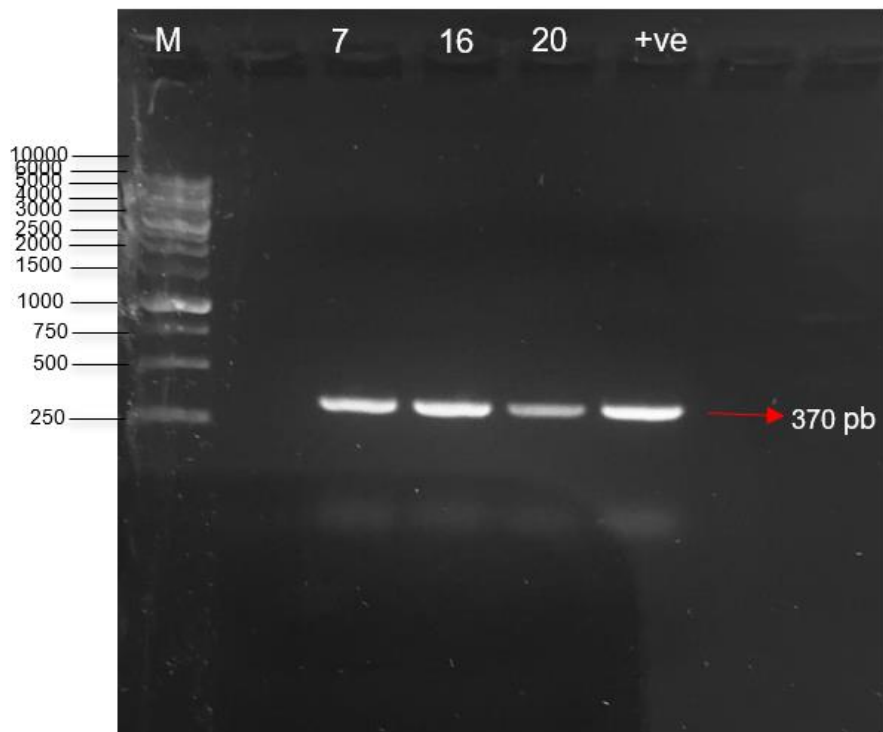


Figura 16 α -pl/ CDO-RiGFP. M marcador de tamaño molecular 1Kb seguido con los 3 plásmidos obtenidos de las colonias 7, 16 y 20, finalizando con el control positivo (figura 9).

8.3.8 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599)

Se realizó la transformación utilizando la cepa K599 de *A. rhizogenes* y los plásmidos obtenidos anteriormente (figura 16). Se plaquearon 3 cajas Petri con medio LB sólido y espectinomicina al 200 % por cada plásmido, 9 en total, con concentraciones de 100, 150 y 250 μL . Se obtuvo crecimiento de colonias aisladas como se observa en la figura 15 A. Se realizó un patch plate en cajas Petri preparadas igual que las anteriores, se dejaron incubando por 24 h a 28 °C y se obtuvo el crecimiento necesario para realizar PCR de colonias.

8.3.9 PCR de colonias con el plásmido pK7GWIWG2D(II)-RNAi::PvCDO de *A. rhizogenes*

Se llevó a cabo un PCR de las colonias con el propósito de confirmar la transformación exitosa. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % (Figura 17), utilizando el marcador de tamaño molecular 1 Kb. En la imagen del gel, el primer carril corresponde a la muestra de control (fragmento amplificado), mientras que los otros cuatro carriles corresponden a los productos PCR obtenidos de las colonias. En la Figura 17 se observa la transformación positiva de todas las colonias al tener el tamaño esperado de 370 pb al igual que el control.

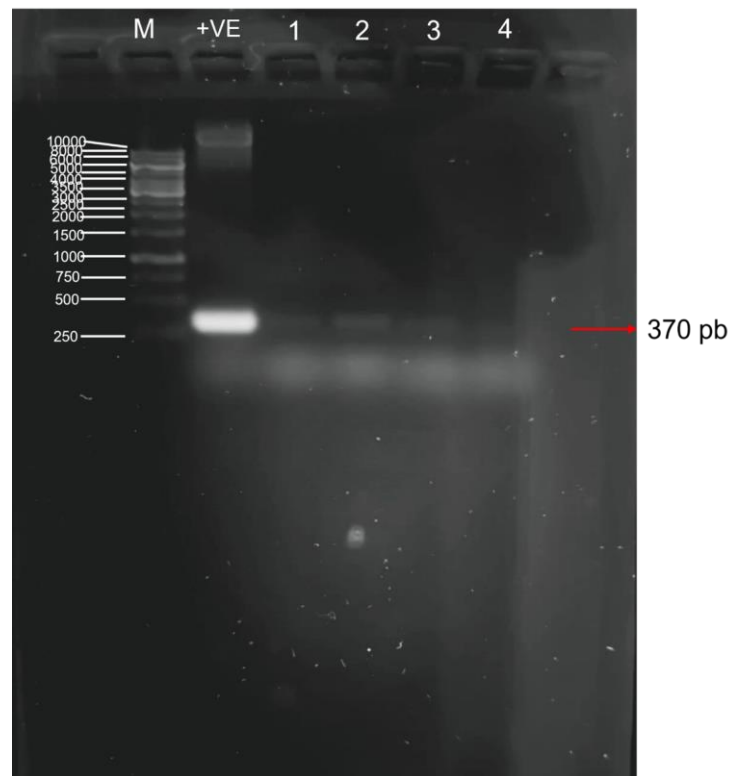


Figura 17 Figura 2 PCR de colonias K599/ CDO-RiGFP.
M: Marcador de peso molecular 1 Kb, +ve: control

8.4 Fenotipado del silenciamiento del gen CDO en *P. vulgaris*

Silenciamos el gen CDO para analizar el crecimiento y desarrollo de la planta, así como los nódulos radiculares durante su asociación simbiótica con *R. tropici*.

8.4.1 Generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* con el vector de silenciamiento CDO-Ri /pK7WIWG2(II) en *A. rhizogenes*

Se inyectaron las semillas de *P. vulgaris* con K599/CDO-Ri como se muestra en la figura 18, a los 14 días de emergencia se confirmó su transformación mediante fluorescencia GFP en estereoscopio. En ella se observa la transformación de raíces peliosas en las plantas control mientras que en la que contenía el vector de silenciamiento también se observó la transformación de raíces peliosas. Ambas mostraron fluorescencia indicándonos una transformación positiva.

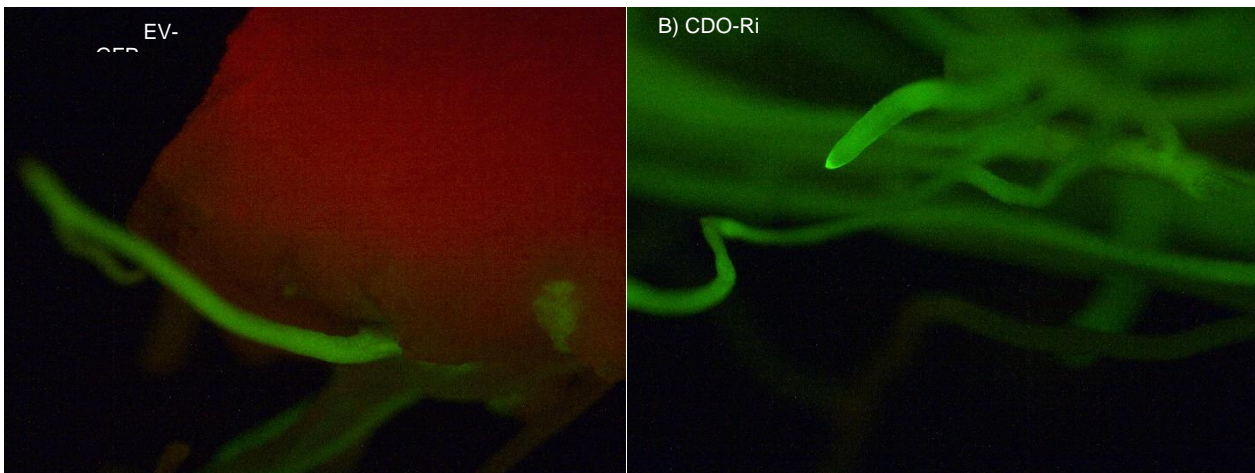


Figura 18 Transformación de raíces peliosas en *P. vulgaris* 14 después de inyección de CDO-Ri/ K599-GFP, bajo estereoscopio con fluorescencia GFP. A) punto de inyección en donde comienza el crecimiento de las raíces transformadas en las plantas control. B) Raíces transformadas en las plantas inyectadas con el vector de silenciamiento.

8.4.2 Inoculación de las plantas con el vector CDO-Ri /pK7WIWG2(II) con *R. tropici*

Tras la transformación de raíces, se cortaron aquellas que no tenían fluorescencia, después se trasplantaron a un sustrato cuya mezcla consta de vermiculita y peat moss, proporción 1:1, y se aclimataron durante 1 día en la cámara de crecimiento a 28 °C. Finalmente se inocularon con 5 mL del cultivo de *R. tropici* (con genes los reporteros: RFP/GUS) y se llevaron al invernadero. Las plantas control presentaron mayor tamaño en comparación con las CDO-Ri como se puede observar en la Figura 19.



Figura 19 Traspaso de plantas a sustrato, tras corte de raíces no transformadas. A la derecha planta control y a la izquierda planta con el vector de silenciamiento a los 14 dpi.

También se realizó la medición de la longitud de la raíz principal tanto en plantas control como en aquellas que tenían el vector de silenciamiento CDO-Ri, utilizando una regla. Se encontró que las plantas control tenían una mayor longitud de raíz principal, así como una mayor densidad de raíces laterales como se puede observar en la Figura 20 A. Por otro lado, en la Figura 20 B, podemos observar una gráfica con la longitud de la raíz principal en las plantas control (EV-GFP) en donde éstas alcanzaron un promedio de hasta 22.5 cm de largo mientras que la raíz principal de las plantas inyectadas con el vector de silenciamiento (CDO-Ri) alcanzó una longitud menor promedio de 18 cm.

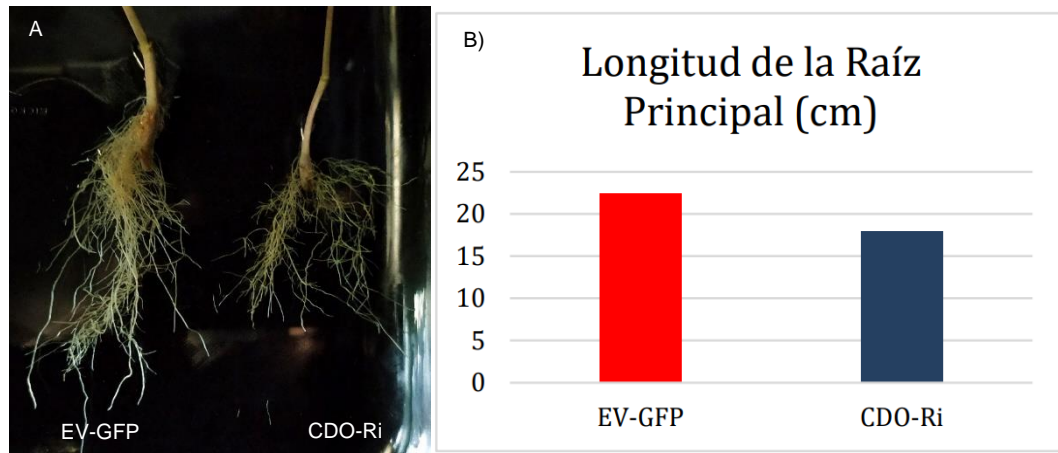


Figura 20 Longitud de raíz principal de plantas control contra CDO-Ri. A) Gráfica del largo en cm de la raíz principal de cada planta. B) Diferencia de tamaño y densidad de raíces entre plantas control y CDO-Ri.

Se realizó el conteo de raíces laterales para conocer la densidad de cada planta. En la Figura 21 A se puede observar la diferencia del crecimiento de raíces laterales en plantas control (EV-GFP) y silenciamiento (CDO-Ri). En ellas se observa que las plantas control lograron desarrollar una mayor cantidad de raíces laterales a los 14 después de haber sido inyectadas, mientras que las plantas CDO-Ri desarrollaron menos de la mitad de las raíces laterales en comparación con el control.

Por otro lado, la Figura 21 B nos muestra una gráfica del conteo realizado en las plantas para conocer la densidad de raíz lateral. Aquí observamos que las plantas control desarrollaron más del doble de raíces laterales en comparación con las plantas de silenciamiento CDO-Ri.

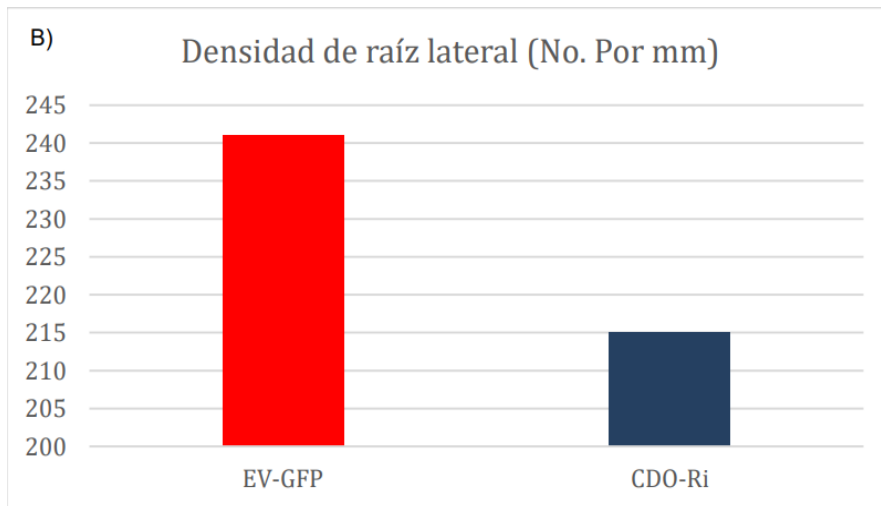
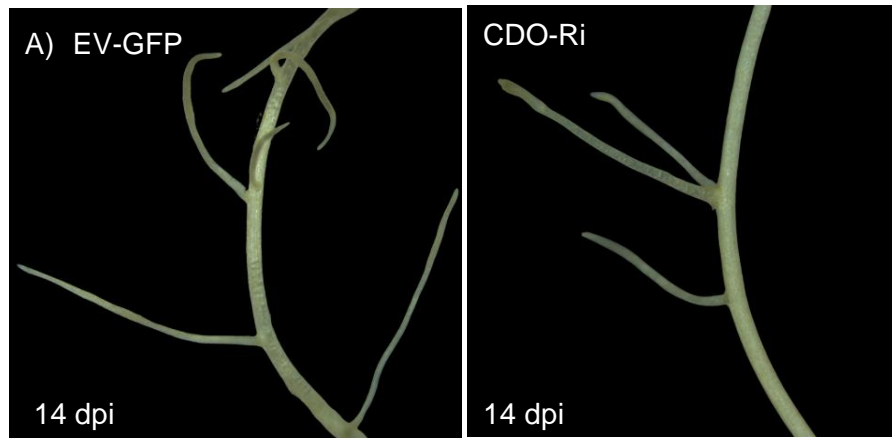


Figura 21 Densidad de raíz lateral de plantas control (Ev-GFP) contra silenciamiento (CDO-Ri). A) Imágenes de raíces laterales a los 14 días después de inyección (dpi). B) Gráfica del conteo de raíces laterales por mm.

9 Discusión

Este estudio abordó el análisis funcional del gen *ATG9b* durante la asociación simbiótica entre *R. tropici* y *P. vulgaris*. También se llevó a cabo la clonación del gen *CDO*, el cual interactúa con *ATG9b*. En términos generales, nuestros hallazgos indican que *ATG9b* está activamente expresado y desempeña un papel en la regulación del número y el desarrollo de los nódulos durante la simbiosis entre el frijol común y el rizobio. Sin embargo, no parece tener influencia en la maduración de los nódulos. Por otro lado, el gen *CDO* se considera relevante debido a su previa identificación como un gen que interactúa con *ATG9b*, establecida a través del análisis Y2H.

9.1 Fenotipado y análisis de la sobreexpresión del gen *ATG9b* en *P. vulgaris*

ATG9b es una proteína transmembranal cuya actividad se lleva a cabo durante el proceso de la autofagia (Quezada et al., 2021).

En este estudio, exploramos los efectos de la sobreexpresión del gen *ATG9b* (*PvATG9b-OX*) en la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*, en comparación con las plantas control. Nuestros resultados revelaron que la sobreexpresión de este gen promovió la infección en las raíces pilosas de las plantas de frijol común. Se observó un aumento significativo en la cantidad de nódulos presentes en las raíces con la sobreexpresión de *ATG9b*. No obstante, la mayoría de estos nódulos exhibieron un aspecto blanco y un tamaño reducido, lo que sugiere una carencia de leghemoglobina. Además, hubo una mayor presencia de nódulos primordiales a los 21 días después de la inoculación (dpi) en comparación con los nódulos de las raíces de las plantas control, que a su vez mostraban una cantidad menor de nódulos en su mayoría en una etapa de maduración avanzada.

Además, los nódulos mostraron vasculaturas bien formadas y un color rojizo indicando la presencia de leghemoglobina (Lb). Según Becana & Lucas (1992), esta proteína se encuentra presente en los nódulos radiculares tras la SFN y es responsable de producir dicho color rojizo gracias a la capacidad que tiene de transportar oxígeno gracias a su estructura que contiene un grupo hemo. Comparando la bibliografía explorada junto con los datos obtenidos, pudimos observar que efectivamente se estaba llevando a cabo la fijación de nitrógeno dentro de los nódulos maduros de las plantas control a los 21 dpi, mientras que en los nódulos de las plantas expresando el vector de *PvATG9b-OX*, la mayoría de los nódulos alcanzaron la etapa primordial, más no la de maduración. La Lb actúa como regulador de oxígeno dentro de los nódulos para promover la actividad

de la nitrogenasa, por lo que entre más rojo sea el nódulo, mayor cantidad de Lb se encuentra presente en él (Becana & Klucas, 1992).

La autofagia es mediada por genes *ATG*, entre ellos *ATG9* (a y b) que se encarga de impulsar la formación del fagóforo (Quezada-Rodríguez et al., 2021). Con el fenotipo de nodulación de las raíces que sobreexpresan PvATG9b, teníamos curiosidad por conocer las proteínas de *ATG9b* que interactúan en el genoma de *Phaseolus* bajo la simbiosis del nódulo de la raíz. Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis de dos híbridos de levadura con una biblioteca de cDNA de raíces inoculadas con *Rhizobium* y *ATG9b*. Entre muchas proteínas identificadas, la cistemina dioxigenasa se destacó por ser importante.

9.2 Identificación y análisis del RNAi de *CDO*

Los análisis realizados en la biblioteca de cDNA de *P. vulgaris* cuando *ATG9b* se sobreexpresa, demostraron que *CDO* es un gen que interactúa como intermediario entre ambas leghemoglobinas. Chen (2021) menciona que el mecanismo para regular la expresión génica en respuesta al estrés por falta de oxígeno es la hipoxia y uno de los genes relacionados con esta es el *CDO* tanto en animales como en plantas.

Durante el proceso de infección, las células sufren una invaginación similar a la endocitosis, la planta activa diferentes señales incluyendo la ruta de la autofagia, como se mencionó al principio de este trabajo (Roy et al., 2020). La bacteria necesita recibir el oxígeno justo para vivir por lo que al observar que *CDO* es un gen interactuante cuando *ATG9b* se expresa, se sugiere que este gen podría estar implicado en la regulación del ciclo del nitrógeno, lo que potencialmente facilita la creación de un entorno propicio para la supervivencia bacteriana y el óptimo crecimiento y desarrollo de la planta.

9.3 Clonación de RNAi de *CDO*

Con base en los análisis obtenidos anteriormente, se hizo la clonación del gen *CDO*-RNAi con el fin de caracterizarlo y observar su análisis funcional en la planta cuando ésta se encuentra en una relación simbiótica con *R. tropici*.

Se realizó la clonación para el silenciamiento del gen *CDO* utilizando la técnica de clonación Gateway, esta técnica es una de las más utilizadas en la biología molecular al ser adaptable, eficiente y compatible con la clonación tradicional (Katzen, 2007). La clonación del *CDO*-RNAi se realizó con éxito, se obtuvieron colonias positivas tras la transformación en *A. rhizogenes* K599 con un tamaño de banda de 370 pb correspondientes al tamaño del fragmento esperado.

Esta clonación se utilizará para futuros estudios en nuestro grupo de laboratorio con el fin de realizar el fenotipado de la planta *P. vulgaris* durante la asociación simbiótica con *R. tropici* y de esta manera saber cuál es el papel que desempeña el gen *CDO* durante esta relación.

En conjunto, nuestros estudios de sobreexpresión de *PvATG9b* durante la simbiosis de *P. vulgaris* con *R. tropici* nos muestran que este gen posee un papel fundamental en el proceso de infección para poder llegar a la formación de nódulos radiculares que posteriormente, bajo la actividad de otros genes, alcanzará la etapa de maduración y se llevará a cabo la fijación de nitrógeno.

Este estudio nos permitió observar que *PvATG9b* es un gen que beneficia a la planta y al simbiote ya que al tener un mayor número de nódulos habrá más fijación de nitrógeno y esto es benéfico para la planta y la bacteria.

Finalmente, la clonación del gen interactuante *CDO-RNAi* nos permitirá estudiar su función para proporcionarnos una mayor comprensión sobre el papel que desempeña este gen durante la simbiosis del frijol común con el rizobio, así como la relación que tiene con *ATG9b* y las leghemoglobinas.

En conjunto, todos estos datos nos permitirán conocer y describir la ruta de la autofagia en las plantas leguminosas cuando estas se encuentran en una simbiosis con *R. tropici*.

9.4 Fenotipado del silenciamiento del gen *CDO* en *P. vulgaris*

Se confirmó la transformación de las raíces pilosas a través de la observación de fluorescencia GFP utilizando un estereoscopio tanto en plantas control como en aquellas inyectadas con el vector de silenciamiento *CDO-Ri* / K599 (figura 18).

A los 14 días post inyección, se cortaron las raíces no transformadas y se pasaron a sustrato en donde se observó un mayor tamaño en los tallos de las plantas control comparados con las plantas *CDO-Ri* (figura 19 y 20), al igual que el tamaño y volumen de las raíces transformadas en donde en las plantas control hubo una mayor cantidad de raíces laterales con una mayor longitud de raíz principal, mientras que en las plantas *CDO-Ri* se observó una menor cantidad de raíces laterales con una menor longitud de raíz principal (figura 21).

Las implicaciones que el gen *CDO* tiene en la fisiología de *P. vulgaris*, van más allá de sus implicaciones durante el proceso simbiótico, ya que además de regular los niveles de O_2 dentro de los simbiosomas para permitir la activación de la nitrogenasa, nuestros resultados demuestran su influencia en el fenotipo radicular. Como podemos observar en la figura 21 B, el número de raíces laterales se

incrementó en las plantas control en relación con el grupo de CDO-Ri. A pesar de que sería necesario caracterizar la función específica del gen durante la organogénesis, es evidente que la actividad de CDO está implicada en este proceso.

10 Conclusiones

Se logró identificar y aislar el gen *PvATG9b* para su sobreexpresión en las raíces transformadas con *A. rhizogenes* K599 de *P. vulgaris* durante la asociación simbiótica con *R. tropici*.

Se generaron las raíces peludas transgénicas, expresando el vector de sobreexpresión pBGWFS7.0-OX::*PvATG9b* con *A. rhizogenes* K599.

PvATG9b se ha revelado como un elemento esencial para la generación de los nódulos radiculares en su etapa primordial durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici*. Estos resultados indican que *PvATG9b* cumple su función durante las fases iniciales de la infección y la creación de los nódulos primordiales, pero no parece influir en su posterior maduración. Además, se ha demostrado que desempeña un papel crucial en el proceso de infección al instigar la actividad de la autofagia, lo que a su vez previene una infección excesiva de las células en los nódulos radiculares. Cabe destacar que la expresión de *PvATG9b* es prácticamente inexistente en nódulos maduros y senescentes.

Se logró identificar y aislar el gen *CDO* para su silenciamiento en las raíces transformadas con *A. rhizogenes* K599 de *P. vulgaris* durante la asociación simbiótica con *R. tropici*.

Se realizó la clonación del vector binario pK7GWIWG2D(II) para el silenciamiento del gen *CDO*-RNAi. Posteriormente se realizó la clonación del vector binario pK7GWIWG2D(II) (K599/*CDO*-RiGFP) que será utilizado para futuras investigaciones en

el grupo del laboratorio con el fin de analizar el fenotipo de la planta durante la asociación simbiótica.

Se generaron las raíces peludas transgénicas, expresando el vector de silenciamiento pK7GWIWG2D(II) K599/*CDO-Ri GFP* con *A. rhizogenes* K599.

CDO demuestra ser un factor clave en el crecimiento y desarrollo tanto de la planta como de sus raíces

11 Referencias bibliográficas

Adelipour, M., Saleth, L. R., Ghavami, S., Alagarsamy, K. N., Dhingra, S., & Allameh, A. (2022). The role of autophagy in the metabolism and differentiation of stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 166412. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166412>

Ángel Martín-Rodríguez, J., Ariani, A., Leija, A., Elizondo, A., Fuentes, S. I., Ramirez, M., Gepts, P., Hernández, G., & Formey, D. (2021). Phaseolus vulgaris MIR1511 genotypic variations differentially regulate plant tolerance to aluminum toxicity. *Plant Journal*, 105(6), 1521–1533. <https://doi.org/10.1111/tpj.15129>

Ángel Martín-Rodríguez, J., Ariani, A., Leija, A., Elizondo, A., Fuentes, S. I., Ramirez, M., Gepts, P., Hernández, G., & Formey, D. (2021). Phaseolus vulgaris MIR1511 genotypic variations differentially regulate plant tolerance to aluminum toxicity. *Plant Journal*, 105(6), 1521–1533. <https://doi.org/10.1111/tpj.15129>

Ayala-García, P., Jiménez-Guerrero, I., Jacott, C. N., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., del Cerro, P., & Pérez-Montaña, F. (2022). The Rhizobium tropici CIAT 899 NodD2 protein promotes symbiosis and extends rhizobial nodulation range by constitutive nodulation factor synthesis. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac325>

Becana, M., & Klucas, R. V. (1992). Oxidation and Reduction of Leghemoglobin in Root Nodules of Leguminous Plants¹. In *Plant Physiol* (Vol. 98).

Castellane, T. C. L., Lemos, M. V. F., & Lemos, E. G. D. M. (2014). Evaluation of the biotechnological potential of Rhizobium tropici strains for exopolysaccharide production. *Carbohydrate Polymers*, 111, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.066>

Chávez-Mendoza, C., & Sánchez, E. (2017). Bioactive compounds from mexican varieties of the common bean (Phaseolus vulgaris): Implications for health. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22081360>

Chen, M., Zhu, J. Y., Mu, W. J., & Guo, L. (2022). Cysteine dioxygenase type 1 (CDO1): Its functional role in physiological and pathophysiological processes. In *Genes and Diseases*. Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.12.023>

Chen, Z., Guo, Q., Wu, G., Wen, J., Liao, S., & Xu, C. (2021). Molecular basis for cysteine oxidation by plant cysteine oxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Structural Biology*, 213(1). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107663>

Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., & Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2(7), 1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>

Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X., & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. In *Plant Cell and Environment* (Vol. 42, Issue 1, pp. 41–51). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>

Fonseca-García, C., López-García, C. M., Pacheco, R., Armada, E., Nava, N., Pérez-Aguilar, R., Solis-Miranda, J., & Quinto, C. (2022). Metallothionein1A Regulates Rhizobial Infection and Nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031491>

Gunnabo, A. H., Geurts, R., Wolde-Meskel, E., Degefu, T., Giller, K. E., & van Heerwaarden, J. (2021). Phylogeographic distribution of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab046>

Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 9, pp. 579–593). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>

Hull, G.A., Devic, M. (1995). The β -Glucuronidase (gus) Reporter Gene System. In: Jones, H. (eds) *Plant Gene Transfer and Expression Protocols*. *Methods in Molecular Biology*TM, vol 49. Springer, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1385/0-89603-321-X:125>

Lacopino, S., & Licausi, F. (2020). The Contribution of Plant Dioxygenases to Hypoxia Signaling. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01008>

Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: A biological operating system. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 2, Issue 4, pp. 571–589). <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>

- King, J. S. (2012). Autophagy across the eukaryotes: Is *S. cerevisiae* the odd one out? In *Autophagy* (Vol. 8, Issue 7, pp. 1159–1162). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.20527>
- Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. In *Science* (Vol. 290, Issue 5497).
- Larrainzar, E., Villar, I., Rubio, M. C., Pérez-Rontomé, C., Huertas, R., Sato, S., Mun, J. H., & Becana, M. (2020). Hemoglobins in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *New Phytologist*, 228(2), 472–484. <https://doi.org/10.1111/nph.16673>
- Loreti, E., & Perata, P. (2020). The Many Facets of Hypoxia in Plants. *Plants*, 9(6), 745. <https://doi.org/10.3390/plants9060745>
- Magen, S., Seybold, H., Laloum, D., & Avin-Wittenberg, T. (2022). Metabolism and autophagy in plants—a perfect match. In *FEBS Letters*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14359>
- Masson, N., Keeley, T. P., Giuntoli, B., White, M. D., Lavilla Puerta, M., Perata, P., Hopkinson, R. J., Flashman, E., Licausi, F., & Ratcliffe, P. J. (n.d.). *Conserved N-terminal cysteine dioxygenases transduce responses to hypoxia in animals and plants*. <https://www.science.org>
- Mudunkothge, J. S., & Krizek, B. A. (2014). The GUS reporter system in flower development studies. *Methods in Molecular Biology*, 1110, 295–304. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9408-9_15
- Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., de Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.02.001>
- Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M. K., Alvarado-Affantranger, X., Quinto, C., Sánchez, F., & Lara, M. (2016). A legume TOR protein kinase regulates *Rhizobium* symbiosis and is essential for infection and nodule development. *Plant Physiology*, 172(3), 2002–2020. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>
- Quezada Rodríguez, E.-H., G, H., Arthikala, M.-K., Lara, M., Hernández, A., & Nanjareddy, K. (2022). Exploration of Autophagy Families in Legumes and Dissection of the ATG18 Family with a Special Focus on *Phaseolus vulgaris*.

Quezada Rodríguez, E.-H., Gã, H., Arthikala, M.-K., Lara, M., Hernã, A., & Nanjareddy, K. (2022). Exploration of Autophagy Families in Legumes and Dissection of the ATG18 Family with a Special Focus on Phaseolus vulgaris.

Quezada, E. H., García, G. X., Arthikala, M. K., Melappa, G., Lara, M., & Nanjareddy, K. (2019). Cysteine-rich receptor-like kinase gene family identification in the phaseolus genome and comparative analysis of their expression profiles specific to mycorrhizal and rhizobial symbiosis. *Genes*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010059>

Rainwater, R., & Mukherjee, A. (2021). The legume-rhizobia symbiosis can be supported on Mars soil simulants. *PLoS ONE*, 16(12 December). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259957>

Rodríguez, E. H. Q., Gómez-Velasco, H., Arthikala, M. K., Lara, M., Hernández-López, A., & Nanjareddy, K. (2021). Exploration of autophagy families in legumes and dissection of the atg18 family with a special focus on phaseolus vulgaris. *Plants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122619>

Rodríguez, E. H. Q., Gómez-Velasco, H., Arthikala, M. K., Lara, M., Hernández-López, A., & Nanjareddy, K. (2021). Exploration of autophagy families in legumes and dissection of the atg18 family with a special focus on phaseolus vulgaris. *Plants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/plants10122619>

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

Sainz, M., Calvo-Begueria, L., Pérez-Rontomé, C., Wienkoop, S., Abián, J., Staudinger, C., Bartesaghi, S., Radi, R., & Becana, M. (2015). Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant Journal*, 81(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/tpj.12762>

Serova, T. A., Tikhonovich, I. A., & Tsyganov, V. E. (2017). Analysis of nodule senescence in pea (*Pisum sativum* L.) using laser microdissection, real-time PCR, and ACC immunolocalization. *Journal of Plant Physiology*, 212, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.01.012>

Stipanuk, M. H., Simmons, C. R., Karplus, P. A., & Dominy, J. E. (2011). Thiol dioxygenases: Unique families of cupin proteins. In *Amino Acids* (Vol. 41, Issue 1, pp. 91–102). <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0518-2>

Zahra, N., Hafeez, M. B., Shaukat, K., Wahid, A., Hussain, S., Naseer, R., Raza, A., Iqbal, S., & Farooq, M. (2021). Hypoxia and Anoxia Stress: Plant responses and tolerance mechanisms. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(2), 249–284. <https://doi.org/10.1111/jac.12471>

12 Productos generados

Los resultados parciales de este trabajo de investigación han sido compartidos a la comunidad mediante la participación en dos congresos, uno nacional y otro internacional en los cuales se obtuvieron constancias de participación. Así mismo, se pretende realizar el proceso de escritura de un artículo para su publicación en una revista científica de alto impacto.

12.1 Congresos

Internacional:

2ND LATIN AMERICAN CONFERENCE ON NATURAL AND APPLIED SCIENCES

Held on April 5-7, 2022 / Colombia, Bogotá

“Overexpression of pvATG9 increases nodule numbers but affects root nodule maturation during *Phaseolus vulgaris* - *Rhizobium tropici* interaction”

Nacional:

Primer Congreso Nacional de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y Sustentabilidad.

Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT)

Llevado a cabo del 31 de agosto- 2 de septiembre del 2022 / Tamaulipas, México.

“PvATG9 es esencial para el desarrollo y funcionamiento de nódulos durante la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. tropici*”

13 Glosario

SNF Fijación Simbiótica de Nitrógeno

CDO Cisteína Dioxigenasa

ATG Autophagy Related Genes (Genes Relacionados con la autofagia)

ATG9 Autophagy Related Genes 9 (Genes Relacionados con la autofagia 9)

Lb Leghemoglobina

pb Pares de Bases

IT Infection Tread (Hilo de infección)

OX Over Expression (Sobreexpresión)

RNAi RNA de interferencia

PL Plásmido

LB Luria Broth

mTOR mammalian Target of Rapamycin (diana de rapamicina en células de mamífero)

ULK Unc-51 like kinase

GFP Green Florescent Protein (Proteína Verde Florescente)

Dpi Days Post Inoculation (días post inoculación)

Hr Hairy root (pelo radicular)

P. vulgaris *Phaseolus vulgaris*

R. tropici *Rhizobium tropici*

LOX Lipoxigenasa

CCDs Dioxigenasa de Escisión de Carotenoides

PCO Cisteína Oxidasa Vegetal

2-ODDs (2OG) Dioxigenasas dependientes de 2-Oxoglutarato

HRPE Elemento Promotor de Respuesta a Hipoxia

ERF-VII Factores de respuesta a Etileno grupo VII

PDC Piruvato descarboxilasa

ADH Alcohol deshidrogenasa

ANPs Polipéptidos anaerobios

HRG Genes Responsables de Hipoxia

ATP Adenosin-trifosfato

14 Anexos

FRAGMENTO RNAi (370 pb)
CDO RiF- CAC CCA AGC TCC TGA GAT GAG GC
CDO RiR- AGT TCT CCA CAA TCT TTG GAC CAC

Figura S1 Oligos diseñados (Forward y Reverse)

AMPLIFICACIÓN				
cDNA	5 μ l			
Oligo F	2.5 μ l			
Oligo R	2.5 μ l			
dntps	2 μ l			
5x Superfi buffer	10 μ l			
Superfi Taq.	0.5 μ l			
H2O	27.5 μ l			
Volumen Total	50 μl			
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
3'	30	30	30	7'
	x35			

Figura S 2 Componentes, cantidades y programa para la amplificación mediante PCR del fragmento CDO-RNAi.

INTRODUCCIÓN DEL FRAGMENTO AL VECTOR pENTR	
Fragmento eluido	6 μ l
Sal	1 μ l
Vector pENTR	0.65 μ l
H ₂ O	0.35 μ l
Volumen Total	8 μl

Figura S 3 Componentes y cantidades para la introducción del fragmento amplificado al vector de entrada pENTR (pENTR/CDO-RNAi).

PCR con oligos M13				
Plásmido		1.5 μ l		
Go Taq.		10 μ l		
Oligo M13 F		1 μ l		
Oligo M13 R		1 μ l		
H ₂ O		6.5 μ l		
Volumen Total		20 μl		
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
3'	30	30	30	7'
x30				

Figura S4 Componentes, cantidades y programa para la adición de oligos M13 al plásmido pENTR/CDO-RNAi mediante PCR.

PCR pI-GFP(II)/ CDO-RNAi				
Plásmido		2 μ l		
Go Taq.		10 μ l		
Oligo Mix (F&R)		1 μ l		
H ₂ O		7 μ l		
Volumen Total		20 μl		
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
5	30	30	37	5
X31				

Figura S5 Componentes, cantidades y programa para PCR de plásmido GFP(II)/CDO-Ri.

Oligo Mix CDO	
Oligo Forward	5 μ l
Oligo Reverse	5 μ l
H ₂ O	90 μ l
Volumen Total	100 μl

Figura S6 Componentes y cantidades para el mix de oligos CDO F y R.

PCR k599/ CDO-RNAi				
Plasmido		3 μ l		
Go Taq.		10 μ l		
Oligo Mix (F&R)		1 μ l		
H ₂ O		6 μ l		
Volumen Total		20 μ l		
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
5	30	30	37	5
X31				

Figura S 7 Componentes, cantidades y programa para PCR de control positivo (plasmido) en PCR de colonias.

PCR COLONIAS k599/ CDO-RNAi				
Células		9 μ l		
Go Taq.		10 μ l		
Oligo Mix (F&R)		1 μ l		
Volumen Total		20 μ l		
PROGRAMA				
95	95	55	72	72
5	30	30	37	5
X31				

Figura S 8 Componentes, cantidades y programa para PCR de colonias K599/CDO-Ri

CULTIVO <i>R. tropici</i> GUS	
Medio PY	100 ml
NAL	100 μ l
Kanamicina	50 μ l
CaCl 1M	700 μ l
<i>R. tropici</i> GUS	400 μ l

Figura S9 Componentes y cantidades para cultivo *R. tropici* GUS.

Solución B&D			
Solución A		500 µl	
Solución B		500 µl	
Solución C		500 µl	
Solución D		500 µl	
H ₂ O		1 L	
Solución Stock	Componentes	Molaridad final	Fórmula
Solución A	Ca	100 µM	CaCl ₂ ·2H ₂ O
Solución B	P	500 µM	KH ₂ PO ₄
Solución C	Fe	10 µM	C ₆ H ₅
Solución D	Mg	250 µM	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	K	1500 µM	K ₂ SO ₄
	S	500 µM	SO ₂
	Mn	1 µM	MnSO ₄ ·H ₂ O
	B	2 µM	H ₃ BO ₄
	Zn	0.5 µM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
	Cu	0.2 µM	CuSO ₄ ·5H ₂ O
	Co	0.1 µM	CoSO ₄ ·7H ₂ O
	Mo	0.1 µM	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O

Figura S10 Componentes y cantidades para preparación de solución ByD.

MEDIO LB LÍQUIDO	
NaCl	1.5 g
Triptona	1.5 g
Extracto de levadura	0.75 g
H2O	150 ml

Figura S11 Componentes y cantidades para preparar medio LB líquido.

MEDIO LB SÓLIDO	
NaCl	1.5 g
Triptona	1.5 g
Extracto de levadura	0.75 g
Agar	3 g
H2O	150 ml

Figura S12 Componentes y cantidades para preparar medio LB sólido.

MEDIO PY	
Peptona	0.5 g
Extracto de levadura	0.3 g
H ₂ O	100 ml

Figura S13 Componentes y cantidades para preparar medio PY.

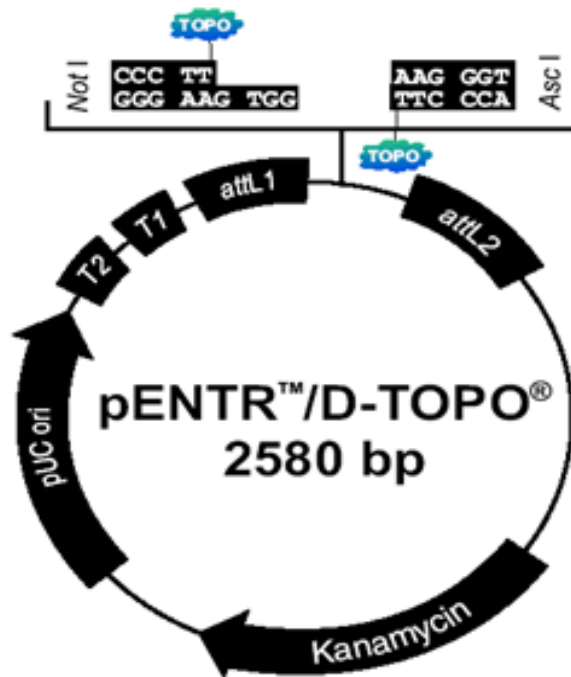


Figura S14 Vector de entrada pENTR/D-TOPO 2580 pb. Vector utilizado para la clonación Gateway de CDO-Ri y ATG9-OX

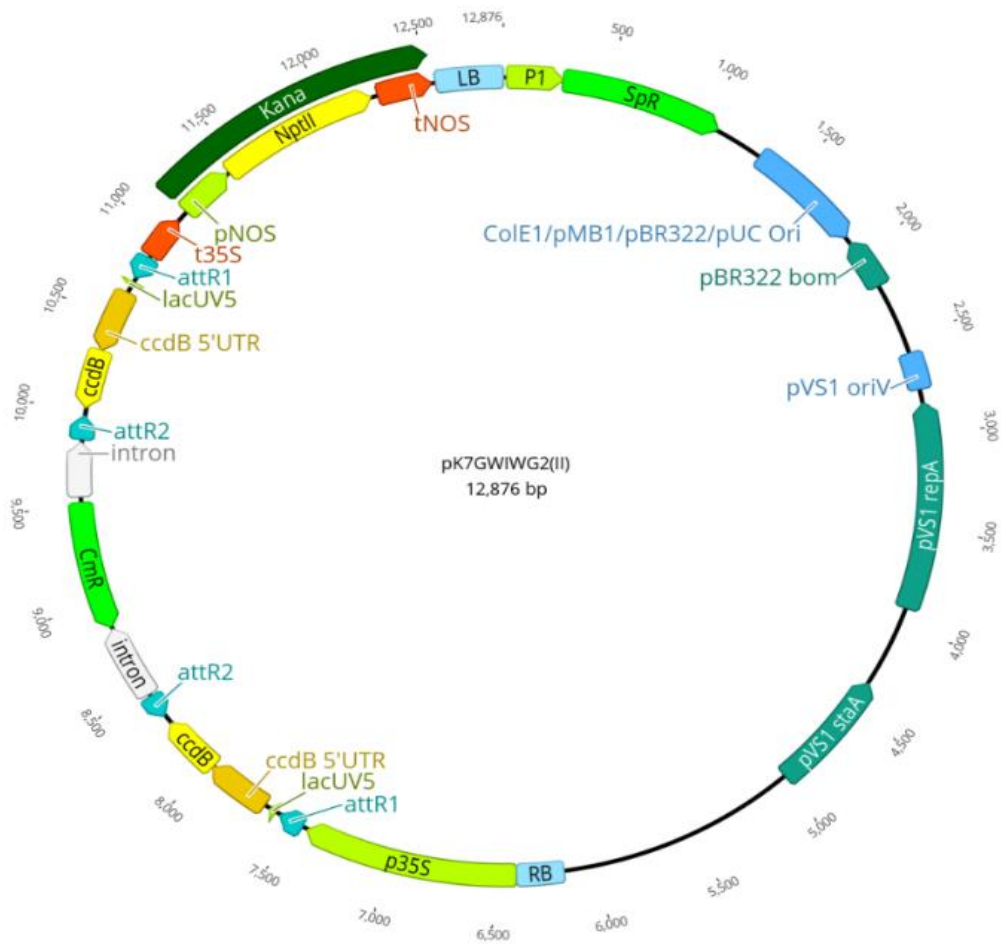


Figura S15 Vector final pK7GIWGW2(II) 12876 pb. Vector utilizado para la clonación Gateway de CDO-Ri

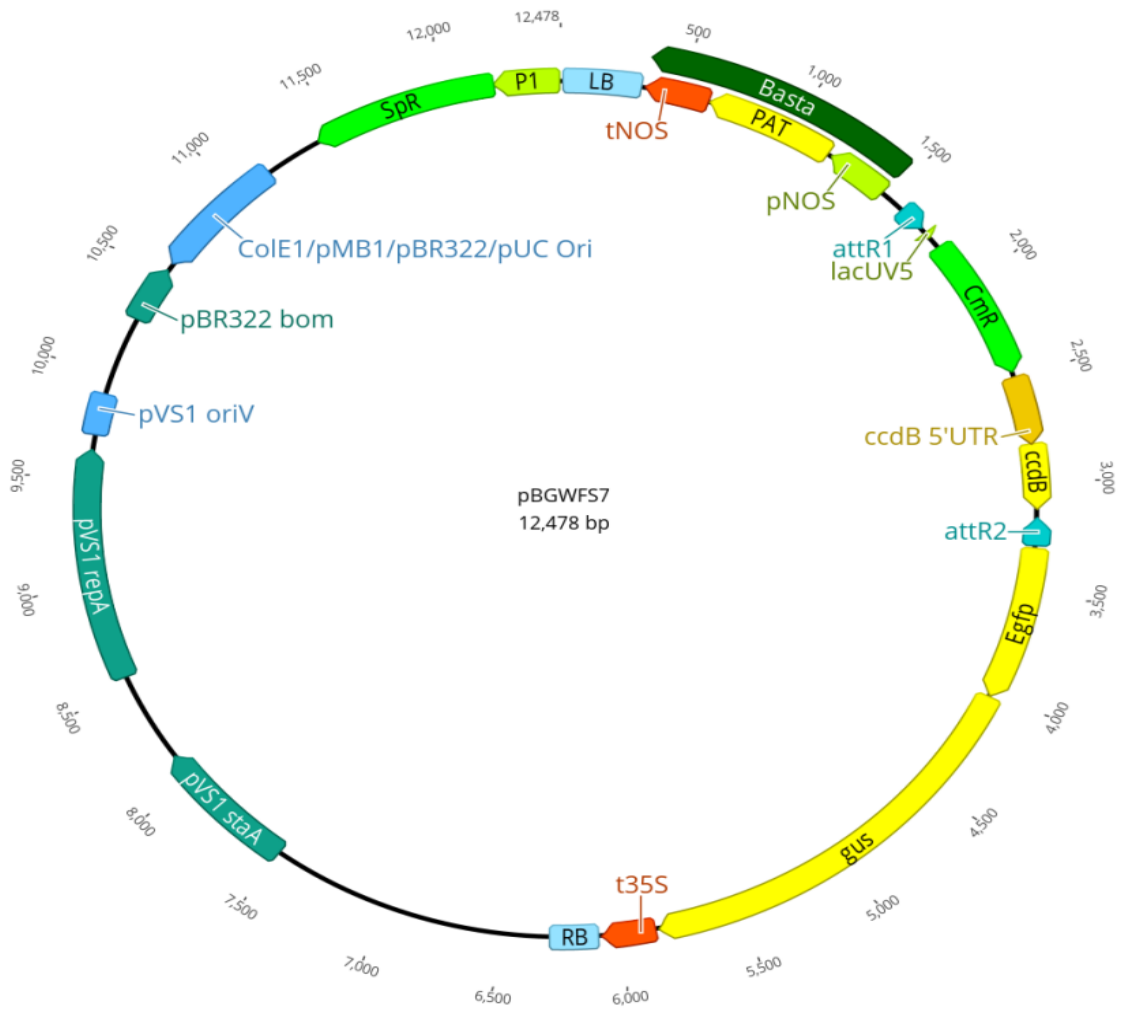


Figura S16 Vector final pBGWFS7 12478 pb. Vector utilizado para la clonación Gateway de ATG9b-OX