



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Análisis de la expresión de los factores de transcripción *PvMYB200* y *PvMYB700* en raíces de *Phaseolus vulgaris* y su participación al inicio de la nodulación

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Francisca Catalina Anastassia Bucarey Ruiz

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosana Sánchez López
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elizabeth Cordoba Martínez, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. José Luis Reyes Taboada, Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Marzo 2024



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.

BUCAREY RUIZ FRANCISCA CATALINA ANASTASSIA
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **4 de diciembre de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis de la expresión de los factores de transcripción PvMYB200 Y PvMYB700 en raíces de Phaseolus vulgaris y su participación al inicio de la nodulación**", dirigida por el/la Dr(a). **SÁNCHEZ LÓPEZ ROSANA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

GUEVARA GARCÍA ANGEL ARTURO	PMDCBQ	PRESIDENTE
DIAZ CAMINO CLAUDIA	PMDCBQ	SECRETARIO
HERNÁNDEZ DELGADO GEORGINA	PMDCBQ	VOCAL
SÁNCHEZ CARBENTE MARÍA DEL RAYO	PMDCBQ	VOCAL
JESÚS MONTIEL GONZÁLEZ	ACADÉMICO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 4 de diciembre de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

**“Análisis de la expresión de los factores de transcripción *PvMYB200* y *PvMYB700*
en raíces de *Phaseolus vulgaris* y su participación al inicio de la nodulación”**

que presenté para obtener el grado de maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Francisca Catalina Anastassia Bucarey
521462772

Este trabajo se realizó en el grupo de la Dra. Rosana Sánchez López, investigadora del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM, con financiamiento parcial y apoyo de beca para Obtención de grado Maestría a partir de proyecto DGAPA- PAPIIT IN204721.

Reconocimiento al apoyo de beca CONAHCyT nivel maestría número 790637 para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis papás, Alejandra y Rafael, por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, sin ustedes nada de esto sería posible. Gracias a mis hermanas y hermanos por escucharme y alegrar mis días. También quiero agradecer a José Ángel por haber sido parte de esta etapa llena de altibajos y por siempre estar a mi lado, la vida no sería lo mismo sin ti o en su defecto sin Rumpel.

Mi más profundo agradecimiento a mi tutora Rosana Sánchez López por guiarme con paciencia y dedicación durante mi formación académica, su constante apoyo me permitió alcanzar metas que en algún momento no creí posibles. Además quiero agradecer a Valeria, Wendy, Gabriel, Erik, Mariana y en especial a Elizabeth por haber sido el mejor grupo de trabajo que una alumna de maestría pudo pedir, no sólo fueron compañeros, se convirtieron en amigos.

Un agradecimiento especial al Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales (LInPI 2) el cual fue un espacio seguro y ameno que me permitió realizar experimentos de manera exitosa y a veces no tan exitosa, y cuyos integrantes me hicieron sentir parte de la comunidad aunque fuéramos de diferentes grupos de trabajo.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, por sus servicios y apoyo técnico con la síntesis de los oligonucleótidos diseñados durante este proyecto.

“Las primaveras al marcharse dejan las lloviznas de otoño preparadas... Pequeña, ve despacio, mucho juicio, no te quemen tus llamas”

Alfonsina Storni

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Generalidades del desarrollo del nódulo	10
1.2 Generalidades del ciclo celular en células vegetales	13
1.3 Estructura de un gen eucariótico	18
1.3.1 Factores de transcripción	20
1.4.1 Familia de factores de transcripción MYB	21
2. ANTECEDENTES	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO GENERAL	30
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Análisis bioinformático de las secuencias codificantes de los genes <i>PvMYB200</i>, <i>PvMYB700</i>, <i>AtMYB3R1</i> y <i>AtMYB3R4</i>.	31
6.2 Diseño de los pares de oligonucleótidos gene-específicos	32
6.3 Extracción de DNA genómico (DNAg)	33
6.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	34
6.5 Reacciones de amplificación por PCR	34
6.6 Reacción de clonación en pENTR™/D-TOPO	35
6.7 Reacción de recombinación en pEarleyGate104 o pBGWFS7	35
6.8 Reacciones con enzimas de restricción, fosfatasa y ligasa	36
6.9 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	36
6.10 PCR de colonia	37
6.11 Transformación en <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 electrocompetentes	38
6.12 Preparación de <i>A. rhizogenes</i> K599 electrocompetentes	38
6.13 Desinfección y germinación de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Negro Jamapa).	39
6.14 Generación de raíces transgénicas de frijol	39
6.15 Inoculación de las raíces transgénicas de frijol con <i>Rhizobium etli</i> CE3-DsRed pMP604 o <i>R. etli</i> CE3 pMP604	40

6.16 Actividad histoquímica de GUS	40
6.17 Estereomicroscopía y microscopía confocal	41
7. RESULTADOS	42
7.1 Análisis de secuencia de los genes <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i>	42
7.1.1 Secuencias de factores de transcripción MYB-R3 en el genoma de <i>P. vulgaris</i>	42
7.1.2 Análisis de la posible ortología de los genes <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i> con respecto a <i>AtMYB3R1</i> y <i>AtMYB3R4</i>	42
7.1.3 Análisis comparativo del tamaño e identidad de secuencia de las proteínas <i>PvMYB200</i>, <i>PvMYB700</i>, <i>AtMYB3R1</i> y <i>AtMYB3R4</i>	44
7.1.4 Distribución de motivos en la secuencia de los transcritos primarios de <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i> .	46
7.1.5 Identificación de señales de localización nuclear en la secuencia peptídica de <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i> .	47
7.1.6 Búsqueda de regiones intrínsecamente desordenadas en las secuencias peptídicas <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i> .	50
7.2 Construcción de cassettes de expresión para evaluar la actividad de los promotores de <i>PvMYB200</i> y <i>PvMYB700</i>	52
7.2.1 Organización de los fragmentos designados como <i>promPvMYB200</i> y <i>promPvMYB700</i> .	52
7.2.2 Clonación de las secuencias <i>promPvMYB200</i> y <i>promPvMYB700</i> en <i>pBGWFS7</i>	53
7.3 Evaluación de la actividad de <i>promPvMYB700</i> y <i>promPvMYB700 XbaI-NcoI</i> en raíces transgénicas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	57
7.4 Evaluación de la actividad de <i>promPvMYB700</i> y <i>promPvMYB700 XbaI-NcoI</i> en raíces transgénicas de <i>Phaseolus vulgaris</i> inoculadas con <i>R. etli</i> CE3 pMP604.	63
7.5 Análisis de la citolocalización de YFP-<i>PvMYB700</i> en raíces transgénicas de <i>Phaseolus vulgaris</i>.	66
7.5.1 Construcción del vector de expresión <i>promPvMYB700 XbaI-NcoI::YFP-PvMYB700</i> .	66
7.5.2 Análisis de la citolocalización de YFP- <i>PvMYB700</i> expresada en raíces transgénicas de <i>Phaseolus vulgaris</i> bajo la regulación de <i>promPvMYB700XbaI-NcoI</i> .	69
8. DISCUSIÓN	71
9. CONCLUSIONES	78
10. PERSPECTIVAS	80
11. REFERENCIAS	81
ANEXOS	92

ABREVIATURAS

°C: Grados centígrados

5'UTR: Región 5 prima no traducida (siglas en inglés de **5' Untranslated Region**).

3'UTR: Región 3 prima no traducida (siglas en inglés de **3' Untranslated Region**).

dpg: Días post germinación

DNAg: DNA genómico

FT: Factor de Transcripción

h: Hora

hpg: Horas post-germinación

IDR: Secuencias intrínsecamente desordenadas (siglas en inglés de **Intrinsically Disordered Regions**)

LRP: Primordio de raíz lateral (por sus siglas en inglés de **Lateral Root Primordium**),

min: Minuto

mL: Mililitro

MP: Membrana Plasmática

MSA: Motivo activador específico de la mitosis (siglas en inglés de **Mitosis Specific Activator**).

PPB: Banda de la pre-profase (siglas en inglés de **Pre-Prophase Band**)

pb: Pares de bases

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundo

SIT: Sitio de Inicio de la Traducción

TSS: sitio de inicio de la transcripción (siglas en inglés de **Transcription Start Site**)

RESUMEN

El desarrollo del nódulo fijador de nitrógeno en las leguminosas es un proceso complejo, que inicia con una fina coordinación espacio-temporal entre la infección epidermal con rizobia y la reactivación del ciclo celular en las células corticales adyacentes al sitio de infección. Si bien el programa genético que reactiva la división celular aún no ha sido explorado a detalle, la evidencia acumulada indica que las rondas de división celular utilizan los mecanismos típicos del control de la progresión de las fases del ciclo celular, reguladas por CDKs, CYCs y factores de transcripción tipo E2F y MYB-R3, entre otros. En esta tesis se describe la caracterización de dos genes de *P. vulgaris*, *PvMYB200* (Phvul.001G061200) y *PvMYB700* (Phvul.009g106700) implicados en el proceso. De acuerdo a su organización de exones, secuencia codificante, distribución de motivos conservados y perfil de expresión espacio-temporal, estos genes son los probables ortólogos de los genes de los factores de transcripción MYB3R1 y MYB3R4 de *Arabidopsis thaliana*, los cuales están involucrados en la transición G2/M del ciclo celular. El análisis de la actividad del promotor de *PvMYB700* (prom*PvMYB700*), y la de su versión corta (prom*PvMYB700XbaI-NcoI*), mostró que ambas versiones de promotor presentan una especificidad espacio-temporal similar, siendo activos en células de la zona del meristemo apical de la raíz, de primordio de raíz lateral y el ápice de la raíz lateral emergente. A lo largo del proceso de nodulación, ambos promotores presentan actividad en células del primordio de nódulo, así como en el tejido central y la provasculatura del nódulo joven. En los nódulos maduros, su actividad se restringe a la vasculatura del nódulo. En resumen, la actividad del promotor de *PvMYB700* es específica de las células en división y, muy relevante, la secuencia de prom*PvMYB700XbaI-NcoI* es suficiente para conferir tal especificidad. Las imágenes preliminares de raíces transgénicas que expresan la construcción prom*PvMYB700XbaI-NcoI*::YFP-*PvMYB700* confirman la expresión espacio-temporal de YFP-*PvMYB*. Si bien las imágenes de fluorescencia sugieren que YFP-*PvMYB* tiene una distribución subcelular en núcleo y citoplasma, para confirmar este dato es necesario repetir el análisis con imágenes con mayor resolución, así como, incluir marcadores fluorescentes específicos de organelos.

ABSTRACT

The development of the nitrogen-fixing nodule in legumes is a complex process which begins with a fine spatio-temporal coordination between epidermal infection of rhizobia and reactivation of the cell cycle in cortical cells adjacent to the site of infection. Although the genetic program that reactivates cell division has not yet been fully explored, the accumulated evidence indicates that rounds of cell division utilize typical mechanisms of cell cycle phase progression control, regulated by CDK, CYCs, and transcription factors such as E2F and MYB-R3, among others. This thesis describes the characterization of two genes from *P. vulgaris*, *PvMYB200* (Phvul.001G061200) and *PvMYB700* (Phvul.009g106700), implicated in the process. Based on their exonic organization, coding sequence, distribution of conserved motifs and spatiotemporal expression profile, these genes are the putative orthologs of the transcription factor MYB3R1 and MYB3R4 of *Arabidopsis thaliana*, which are involved in the G2/M transition of the cell cycle. Analysis of *PvMYB700* promoter activity (prom*PvMYB700*), and its short version (prom*PvMYB700XbaI-NcoI*), showed that both versions exhibit a similar spatiotemporal specificity, being active in cells of the apical meristem zone of the root, lateral root primordium and emerging lateral root apex. Throughout the nodulation process, both promoters show activity in nodule primordium cells, as well as in the central tissue and provascular system of young nodules. In mature nodules, their activity is restricted to the nodule vasculature. In summary, *PvMYB700* promoter activity is specific to dividing cells, and notably, the prom*PvMYB700-XbaI-NcoI* sequence is sufficient to confer such specificity. Preliminary images of transgenic roots expressing the construct prom*PvMYB700-XbaI-NcoI*::YFP-*PvMYB700* confirm the spatiotemporal expression of YFP-*PvMYB*. Although fluorescence images suggest that YFP-*PvMYB* has a subcellular distribution in the nucleus and cytoplasm, repeating this analysis with higher resolution images and including specific organelle fluorescent markers is necessary to confirm this data.

1. INTRODUCCIÓN

El modelo de estudio se centra en la etapa inicial de la formación de un nódulo fijador de nitrógeno en raíces de *Phaseolus vulgaris*, con particular interés en la división celular. El desarrollo de este tipo de nódulos es característico de la relación simbiótica entre leguminosas y bacterias diazótrofes (fijadoras de nitrógeno atmosférico) del suelo, genéricamente conocidas como rizobia, siendo *Rhizobium etli* uno de los endosimbiontes de *P. vulgaris*. La leguminosa se beneficia al recibir amonio del rizobio y disponer de este para la síntesis de metabolitos nitrogenados asimilables, como los ureidos, mientras que la planta proporciona a las rizobia azúcares como fuente de carbono (Brewin, 1991; Ferguson y cols., 2010; Oldroyd y cols., 2011; Wong y cols., 2019).

1.1 Generalidades del desarrollo del nódulo

Cabe destacar que existen dos tipos de nódulos, los indeterminados, que se caracterizan por tener forma ovalada y actividad meristemática persistente en el ápice, los cuales son típicos de la nodulación en las leguminosas *Medicago truncatula*, *Pisum sativum* (chícharo), *Trifolium repens* (trébol blanco) y *Medicago sativa* (alfalfa); y los nódulos determinados, que se desarrollan en *Lotus japonicus*, *Glycine max* (soya) y *P. vulgaris* (frijol común), y que presentan una forma esférica, con actividad meristemática que cesa en las etapas tardías del desarrollo del nódulo (Ferguson y cols., 2010; Popp & Ott, 2011). Otra de las características que diferencia a los dos tipos de nódulos, es la capa celular en la que se reactiva el ciclo celular en el sitio de infección durante la organogénesis, siendo que, en el caso de nódulos determinados corresponde a las células del córtex externo; mientras que en nódulos indeterminados son las células del periciclo y córtex interno las que reinician la división celular (Gresshoff y cols., 1988).

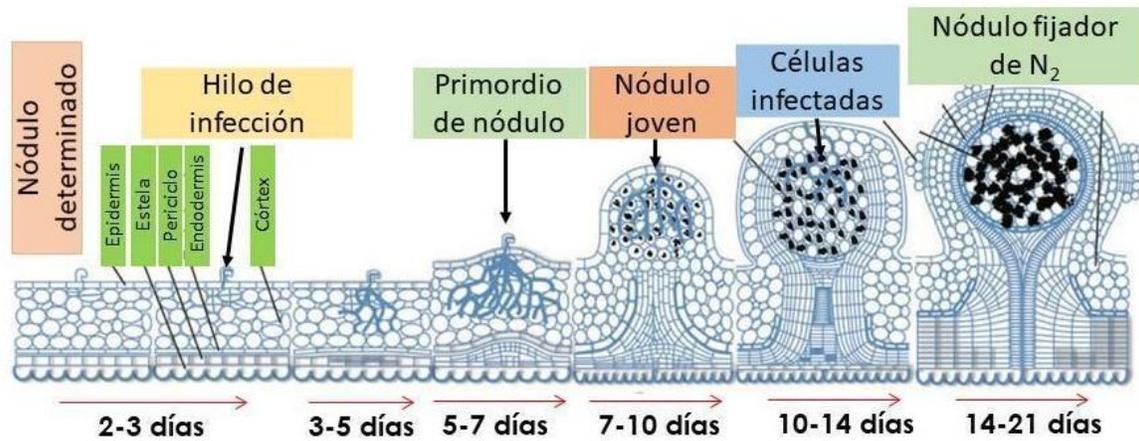


Figura 1. Esquema de formación del nódulo determinado, como el que se forma en *P. vulgaris*. Versión modificada de Ferguson y colaboradores (2010).

La simbiosis leguminosa-rhizobia es un proceso complejo en el que se coordinan dos etapas: la infección del rhizobia y la organogénesis del nódulo (Figura 1), cuyas características genéticas y de desarrollo son, en términos generales, similares en el desarrollo de nódulos determinados e indeterminados (Ferguson y cols., 2010). Además, la relación simbiótica que se establece es de tipo especie-específica ya que depende del tipo de flavonoides/isoflavonoides secretados por la raíz de la leguminosa y reconocidos por el rizobio endosimbionte, así como de los factores Nod (moléculas señalizadoras de origen bacteriano, con estructura tipo lipoquitoligosacárido) sintetizados por la bacteria. En términos generales, la infección se establece cuando los factores Nod son percibidos en la membrana plasmática (MP) del pelo radical a través de receptores tipo cinasa específicos, conocidos como NFR5-NFR1 o NFP-LYK3, en *L. japonicus* y *M. truncatula*, respectivamente (Wong y cols., 2019). En respuesta, el ápice del pelo radical se enrosca, lo que propicia que en el pliegue se forme una cámara de infección que favorece el desarrollo de una microcolonia rizobial. En este sitio se induce la invaginación de la pared celular y la

MP del pelo radical, para formar el hilo de infección (HI) por el que las bacterias entran a la raíz de la leguminosa.

El HI es una estructura transcelular, tubular, única, delimitada por la MP y la pared celular del pelo radical. El lumen del HI es una matriz extracelular compuesta por polisacáridos tipo hemicelulosa, celulosa, pectina, glucoproteínas y extensinas, entre otros (Tsyganova y cols., 2021); además contiene compuestos secretados por la bacteria, tales como exopolisacáridos y lipopolisacáridos (Brewin,1991). El lumen del HI propicia la proliferación de las rizobia, así como la extensión del HI, el cual se ramifica y crece hacia la base del pelo radical, para cruzar hacia la zona cortical de la raíz (Monroy-Morales y cols., 2022). La organogénesis del nódulo inicia de forma paralela y coordinada con la formación del HI (Figura 1). Se caracteriza por la reactivación del ciclo celular de células adyacentes al sitio de infección, dando lugar a una alta actividad meristemática para formar el primordio del nódulo. La siguiente etapa es la diferenciación celular y formación del córtex, haces vasculares y zona de infección del nódulo maduro, que en el nódulo determinado corresponde a las células del tejido central del nódulo en formación. El nódulo alcanza su madurez cuando el HI vierte las rizobias hacia el interior de las células del tejido central y forma un quasi-organelo, el simbiosoma, en el que las bacterias se diferencian a bacteroides capaces de expresar el complejo multienzimático nitrogenasa, responsable de la fijación del nitrógeno (González-Guerrero y cols., 2014).

1.2 Generalidades del ciclo celular en células vegetales

En eucariotes, el ciclo celular consiste en la duplicación del contenido genético y celular, y su posterior repartición y división en dos células hijas; este proceso se divide en las siguientes etapas (Figura 2): interfase, que comprende las fases G₁, S y G₂, la etapa de mitosis (M), en la que tiene lugar la división nuclear y segregación del material genético, y la citocinesis o repartición de organelos y contenido citoplasmático, que concluye con la separación física de las dos células hijas (Wang y cols., 2021). A continuación se presenta una breve descripción de cada etapa del ciclo celular, en la que se enfatizan las peculiaridades que presenta el ciclo celular vegetal, en particular en la fase G₂ tardía, la mitosis y la citocinesis (Chabouté & Schmit, 2016).

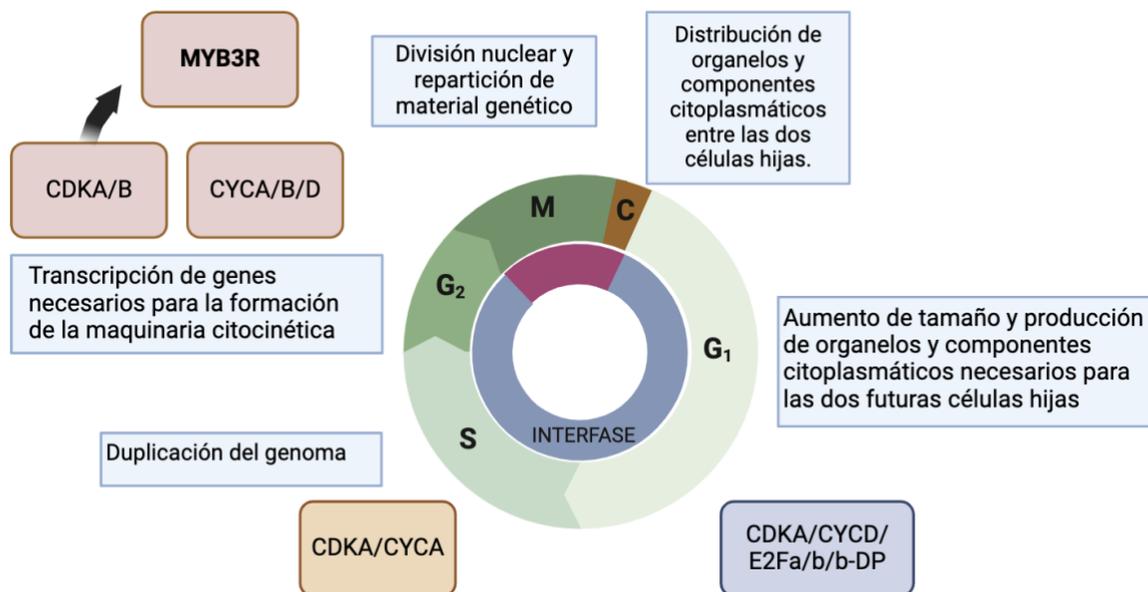


Figura 2. Esquema de las fases que constituyen el ciclo celular, basado en Qi y Zang (2020). En los recuadros se describen los procesos que corresponden a cada fase y se resaltan algunos de los genes relacionados a la regulación de la transición entre las fases G₁/S (recuadros en azul y café claro) y G₂/M (recuadros en color rosa) y algunos de los factores de transcripción asociados a la regulación de estos genes. M: mitosis, C: citocinesis, S: síntesis, CDK: cinasas dependientes de ciclina, CYC: ciclinas.

En la fase G1 la célula eucariótica se prepara para la duplicación del genoma, por lo que aumenta su tamaño, produce los organelos y los componentes citoplasmáticos necesarios para las dos futuras células hijas. La fase S se caracteriza por la duplicación del genoma y la síntesis de proteínas asociadas al empaquetamiento del DNA. En seguida, tiene lugar la fase G2, la cual es un punto de revisión o control del ciclo celular, en la que se verifica que el DNA no presente daño, y de ser el caso, tenga lugar la reparación; por último, se transcriben los genes necesarios para la formación de la maquinaria responsable de la mitosis y la citocinesis. Una característica de la fase G2 tardía en el ciclo celular vegetal es que, en preparación para la mitosis, los microtúbulos se reorganizan en un anillo o banda, denominada banda de la pre-profase (PPB, por sus siglas en inglés de **Pre-prophase band**), cuya posición determina el plano de división celular. La periferia de la PPB se asocia a la MP, mientras que la zona central está asociada al núcleo y define el plano de la división celular (Yabuuchi y cols., 2015; Chabouté y Schmit, 2016).

La mitosis es un proceso complejo que, si bien transcurre como un continuo, es posible distinguir algunas características que enmarcan el avance o sucesión de eventos específicos, por lo que la mitosis se subdivide en las fases denominadas profase, metafase, anafase y telofase (Figura 3).

En profase se forman los bipolos mitóticos (centrosomales en células animales y acentrosomales en células vegetales; Liu & Lee, 2022), asociados a sitios de nucleación de microtúbulos antiparalelos, localizados en los polos opuestos del núcleo. En la zona central del núcleo tiene lugar la condensación de cada par de cromosomas replicados (cromátides hermanas), cuya zona centromérica se asocia a través de una estructura multiproteica, conocida como cinetocoro, que se ensambla *de novo* (Yu y cols., 2000; Job y cols., 2003;

Cheeseman & Desai, 2008). Antes de concluir la profase se inicia el desensamblaje de la envoltura nuclear (Chen, 2012; Hotta & Hashimoto, 2014; Motta & Schnittger, 2021; Liu y Lee, 2022).

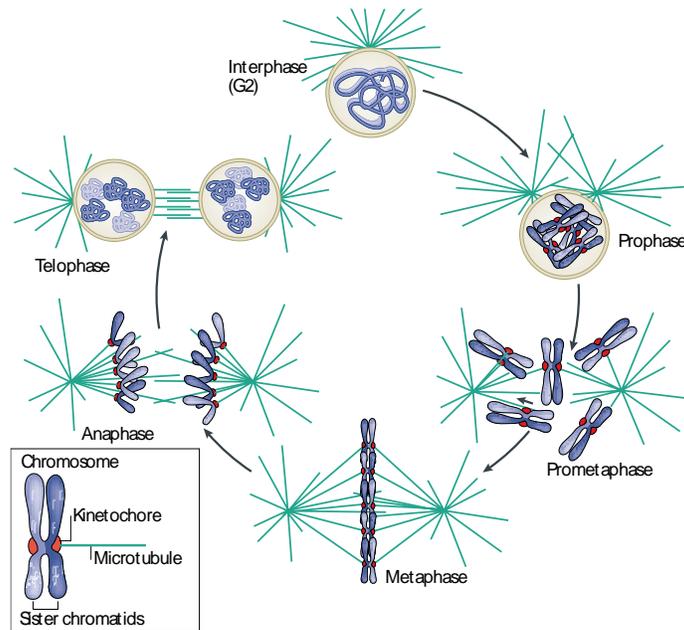


Figura 3. Esquema de las etapas de la mitosis y la segregación de cromosomas mitóticos en la mitosis. Tomado de Cheesman y Desai (2008).

En la metafase, la interacción entre la zona externa del cinetocoro y los microtúbulos de los bipolos mitóticos favorece la segregación de las cromátides hermanas (etapa también conocida como prometafase) y su orientación en la zona ecuatorial del núcleo (Figura 3; Cheeseman & Desai, 2008). En esta etapa concluye el desensamble de la envoltura nuclear (Chen, 2012). La anafase se distingue por la disociación y segregación de las cromátides hermanas hacia los polos opuestos de la célula en división. Al final de la anafase se inicia la organización de la maquinaria citocinética, que en células animales consiste en la organización de un anillo contráctil constituido por filamentos de actina (Seguí-Simarro y cols., 2004), mientras que en células vegetales se forma una estructura de tipo barril

denominada fragmoplasto, conformada por dos conjuntos de microtúbulos y microfilamentos de actina, organizados de forma antiparalela, que se ordenan de forma perpendicular al plano de la división celular, y da soporte al inicio de la formación de la estructura endomembranosa conocida como placa celular, que al concluir la citocinesis se convierte en las membranas plasmáticas que separan a las células hijas (Heese y cols., 2001; Monroy-Morales y cols., 2021). En la siguiente etapa, la telofase, se observa la migración de los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula y se re-ensambla una envoltura nuclear alrededor de cada juego de cromosomas, en cuya matriz de cromatina los cromosomas se condensan (Figura 3; Cheeseman y Desai, 2008).

Al igual que en células animales, el control de la progresión del ciclo celular en células vegetales depende de la activación, inactivación o reactivación periódica de genes específicos del ciclo celular y de la maquinaria de degradación de proteínas que regulan la transición hacia las fases que conforman el ciclo celular (Figura 2). Uno de los componentes de la maquinaria de degradación de proteínas específicas de ciclo celular mejor caracterizado, es el ensamble multiproteico conocido como complejo promotor de anafase/ciclosoma (APC/C, siglas en inglés de Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome), que funciona como andamiaje para la E3 ubiquitin-ligasa tipo RING involucrada en la ubiquitinación de proteínas específicas de ciclo celular para su degradación por el proteosoma (Willems & De Veylder, 2022). El APC/C está conformado por tres dominios: la plataforma central de andamiaje (subunidades APC1, APC4 y APC5), el brazo catalítico (subunidades APC2 and APC11), que se recluta con la enzima conjugadora de ubiquitina E2 y el brazo estructural o de reconocimiento del sustrato (subunidades APC8, APC6, APC3 y APC7 y los co-

activadores APC10 y CDC20/CDH1/CCS52 que interactúan con APC3), involucrados en el reconocimiento y unión de las proteínas a ubiquitina (Willems y De Veylder, 2022).

Las ciclinas, cinasas dependientes de ciclina y factores de transcripción (FT) son parte de la maquinaria que regula la transición entre las fases G1/S y G2/M (Figura 2; Qi & Zang, 2020).

Entre los FT que participan en la transición G1/S del ciclo celular en plantas se encuentran E2Fa, E2Fb, factores de las familias AP-2 (acrónimo en inglés de APETALA 2), RBR (acrónimo en inglés de Retinblastoma-related), Dof (acrónimo en inglés de DNA-binding One Zinc Finger), NAC (acrónimo de NAM/ATAF1,2/CUC2) y WRKY (acrónimo en inglés que hace referencia a la presencia del tetrapéptido conservado WRKY presente en el N-terminal de estas proteínas), y ciclinas de tipo A y D, como los son *CYCA3;1*, *CYCA3;2*, *CYCA3;4*, *CYCD3;3*, *CYCD4;1*, *CYCD4;2*, *CYCD5;1*, *CYCD6;1* y *CYCD7;1* de *A. thaliana* y cinasas dependientes de ciclinas tipo A (Ernst & Aarts, 2004; Menges y cols., 2005; Komaki & Sugimoto, 2012; Nayeri, 2014). En la transición G2/M participan los genes de la maquinaria responsable de la mitosis y la citocinesis (Figura 2), entre los que se encuentran las ciclinas de tipo A y B (*CYCA* y *CYCB*), cinasas dependientes de ciclinas tipo A y B (*CDKA* y *CDKB*), factores de transcripción de las familias DP (siglas en inglés de Dimerization Partner), DELLA (proteínas que portan el pentapéptido ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, leucina, alanina) y MYB (acrónimo en inglés de MYeloBlastosis), miembros del complejo TONNEAU (involucrados en el rearrreglo de microtúbulos y filamentos de actina), así como genes esenciales para la formación de la placa celular (por ejemplo KEULE, Dynamin-related protein 1 y 2, las sintaxinas SNAP33 y KNOLLE; Azimzadeh & Bornens, 2007, Komaki & Sugimoto, 2012).

1.3 Estructura de un gen eucariótico

De manera general, los genes eucarióticos que codifican para proteínas constan de 2 unidades, la unidad transcripcional, que comprende la secuencia a transcribir en RNA y la unidad de control del inicio de la transcripción o región promotora, que corresponde a la secuencia hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción (Figura 4).



Figura 4. Esquema ilustrativo de la organización general de un gen eucariótico. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés)

La unidad transcripcional está organizada en exones e intrones (Figura 4). Los exones que contienen los segmentos que codifican la secuencia peptídica y las regiones 5' y 3' no traducidas (5'UTR y 3'UTR, por sus siglas en inglés), que corresponden al extremo inicial y terminal del transcrito, respectivamente. Las funciones del 5'UTR están asociadas a la regulación del inicio de la transcripción y de la traducción, mientras que el 3'UTR está involucrado en el término de la transcripción y en la poliadenilación (poliA) del transcrito (Leppek y cols., 2018). Ambas regiones participan en la regulación de la estabilidad, exporte hacia el citoplasma y la degradación del transcrito. Los intrones son segmentos no codificantes intercalados entre secuencias exónicas, cuya presencia ha demostrado tener un papel en la regulación a nivel transcripcional, al aumentar la tasa de transcripción (IME, siglas en inglés de Intron-Mediated Enhancement), y a nivel postranscripcional al conferir estabilidad al transcrito, así como en el proceso de exportación nuclear (Shaul, 2017); estas

secuencias están presentes en el RNA primario pero son eliminadas por un procesamiento de corte y empalme conocido en inglés como “splicing” (Syed y cols., 2012).

La región promotora contiene por lo general la caja TATA, un sitio de reconocimiento de la maquinaria transcripcional básica (RNA polimerasa II y algunos factores de transcripción; Conaway y cols., 1992). No todos los promotores de genes vegetales tienen una secuencia tipo caja TATA, en estos genes la transcripción es mediada por la unión del factor de transcripción II D (TFIID) al motivo iniciador (Inr), la caja CAAT o la caja CG (Pugh & Tjian, 1991; Emami y cols., 1998). Otros de los componentes que constituyen un promotor son las secuencias conocidas como elementos de regulación en *cis* que, al ser reconocidos por factores de transcripción (FT) específicos, modulan la actividad y especificidad del promotor (Butler & Kadonaga, 2001). Estos elementos pueden ser de tipo potenciadores (en inglés “enhancers”), y su función es aumentar la tasa de transcripción, o tipo represores (en inglés “repressors”), cuya función es la de atenuar la tasa de transcripción. De donde, la función de la región promotora está asociada a la regulación del inicio y la tasa de transcripción del gen, así como a la especificidad espacio-temporal de la actividad transcripcional (Villao-Uzho y cols., 2023).

Dependiendo de su actividad, los promotores pueden ser clasificados en constitutivos, cuya actividad en un organismo es continua, sin importar el tipo celular, el tejido o el estado de desarrollo, y específicos, que promueven la transcripción en cierto tipo de tejidos o células, en ciertos estadios de desarrollo o en respuesta a estímulos específicos, como pueden ser las hormonas (por ejemplo, auxinas, giberelinas, citoquininas), a la presencia de nutrientes tales como fuentes de carbono, situaciones de estrés abiótico (por incremento o descenso de

temperatura, exceso de agua, sequía, salinidad, entre otros), estrés biótico por patógenos, entre otros (Conaway y cols., 1992; Cazzonelli & Pogson, 2010; Dey y cols., 2015).

1.3.1 Factores de transcripción

La regulación de la expresión génica depende de la unión de complejos macromoleculares constituidos por FTs a las secuencias del promotor, localizadas en la región 5' del sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés). La clasificación de los FT en familias se basa en el mecanismo de acción, la función reguladora, así como la estructura del dominio de unión a DNA (Stegmaier y cols., 2004), la cual puede ser tipo hélice-bucle-hélice básica (bHLH, siglas en inglés de basic Helix-Loop-Helix), cremallera de leucina (bZIP, siglas en inglés de Basic-region leucine ZIPper), dedos de zinc (ZF, siglas en inglés de Zinc Finger), lámina beta (Beta Sheet en inglés), hélice-giro-hélice (HTH, siglas en inglés de Helix-Turn-Helix), entre otros (Polyak & Meyerson, 2003; Jin y cols., 2017). Según la base de datos PlantTFDB (acrónimo en inglés de Plant Transcription Factor Database v5.0, <http://planttfdb.gao-lab.org/>), hay aproximadamente 320,370 genes que codifican para FTs en plantas, presentes en 165 especies, clasificados en 58 familias (3 especies Chlorophyta y 49 especies Streptophyta; Jin y cols., 2017). Algunas de las familias de FT con mayor número de miembros son: bHLH (28,698 FT), MYB (22,032 FT), ERF (21,129 FT), NAC (19,997 FT) y bZIP (15,498 FT), entre otros, cuyas funciones se encuentran asociadas a la respuesta a estrés biótico y abiótico (bHLH y ERF), regulación del ciclo celular (MYB y E2F), metabolismo primario (NAC), germinación y floración (bZIP), entre otros. (Jakoby y cols., 2002; Ito y cols., 2001; Qi & Zhang, 2020; Wu y cols., 2022)

1.4.1 Familia de factores de transcripción MYB

El nombre de esta familia de factores de transcripción tipo HTH tiene su origen en el acrónimo "Myb" (del vocablo en inglés myeloblastosis), designado originalmente para describir al oncogene del virus de leucemia mieloblástica aviar (AMV por las siglas inglés de avian Myeloblastosis virus; Klempnauer & Bishop, 1983). Cuando se demostró que los oncogenes virales suelen tener su contraparte de origen celular, denominados oncogenes celulares (protooncogén, en su versión inactiva), al nombre la proteína y el gen que la codifica se les agregó el prefijo v- o c- para distinguir si su origen es viral o celular, respectivamente, por ejemplo v-Myb o c-Myb (Klempnauer & Bishop, 1983).

La identificación y caracterización del gen c-Myb (Gonda & Bishop, 1983; Thompson & Ramsay, 1995) marcó la pauta para demostrar la existencia de la familia de factores de transcripción MYB (en este trabajo denominados como FT MYB), cuyos miembros están presentes en el genoma de vertebrados, invertebrados, protozoarios, levaduras y plantas (Rosinski & Atchley, 1998; Lipsick, 2010; Du y cols., 2015). No obstante, son aún pocos los FT MYB caracterizados funcionalmente.

De acuerdo con la base de datos AnimalTFDB (acrónimo de Animal Transcription Factor Database v3.0, http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/#!/tf_summary?family=MYB), en animales el número de genes MYB por especie es de 9 (*Caenorhabditis elegans*), 11 (*Drosophila melanogaster*), 27 (*Homo sapiens*), 37 (*Mus musculus*) y 45 (*Danio rerio*). Mientras que en otros organismos tales como, el hongo *Fusarium graminearum* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han reportado 2 FT MYB (Pinson y cols., 1998). En contraste, la expansión evolutiva de los FT MYB ha sido muy amplia en plantas, siendo 168 los genes identificados en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Dubos y cols., 2010). En la Tabla 1 se

muestra el número de genes que codifican para FT MYB en plantas modelo (Du y cols., 2015; Li y cols., 2016; Tian y cols., 2020).

Tabla 1. Número de genes MYB en plantas modelo reportados en la base de datos PlantTFDB. (<http://plantfdb.gao-lab.org>; tomada de Tian y cols., 2020)

Planta modelo	Número de genes de factores de transcripción MYB
<i>Phaseolus vulgaris</i>	181
<i>Marchantia polymorpha</i>	54
<i>Physcomitrella patens</i>	180
<i>Zea mays</i>	203
<i>Oryza sativa</i>	120
<i>Nicotiana tabacum</i>	319
<i>Arabidopsis thaliana</i>	168
<i>Amborella trichopoda</i>	60
<i>Medicago truncatula</i>	185

Los FT MYB se caracterizan por la presencia de un dominio de unión a DNA, conocido como dominio MYB. Este dominio puede estar compuesto por uno, dos, tres o cuatro repetidos R imperfectos, presentes en tándem (R1-R4), cuya numeración es acorde a la identidad de secuencia respecto a los tres repetidos R presentes en c-Myb. El repetido R es una secuencia de aproximadamente 52 aminoácidos, que forma tres hélices alfa (Figura 5). La segunda y tercera hélice conforman un dominio tipo hélice-vuelta-hélice (HTH, siglas en inglés de Helix-Turn-Helix; Ogata y cols., 1992). Se ha propuesto que el dominio MYB funciona de manera bipartita, es decir, que las alfa hélices formadas por R2 y R3 reconocen de manera independiente una secuencia de DNA consenso, mientras que R1 provee estabilidad al complejo DNA-proteína mediante interacciones electroestáticas (Lüscher & Eisenman, 1990; Rosinski & Atchley, 1998).

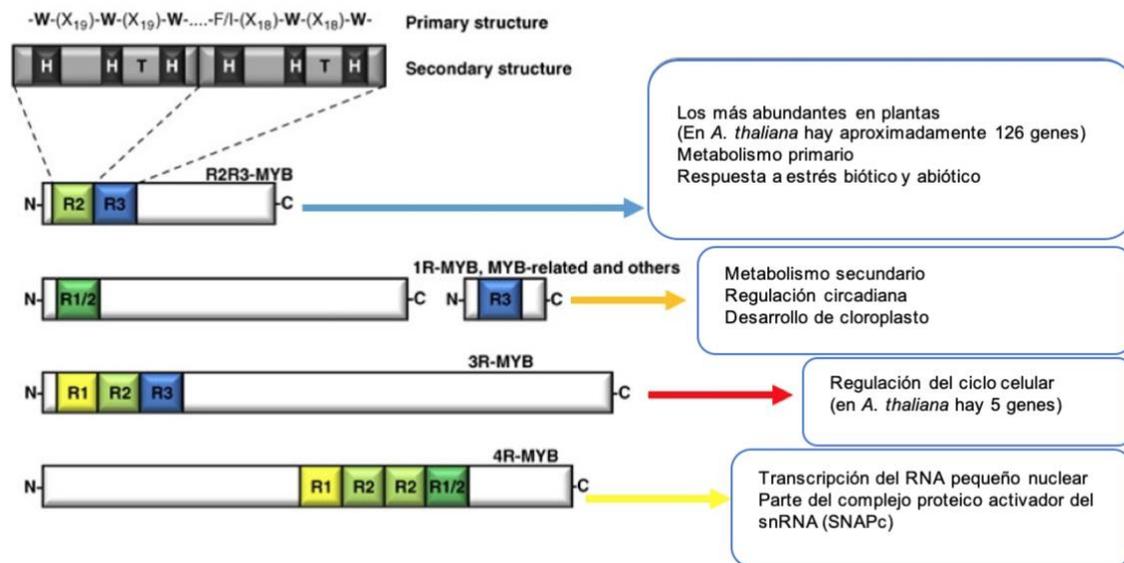


Figura 5. Esquema representativo de la clasificación de los FT MYB. Modificado de Dubos y cols., 2010. En los recuadros se mencionan algunas de las funciones asociadas cada subgrupo de FT MYB.

En función del número, distribución y secuencia de los repetidos R presentes en su estructura primaria, los FT MYB se han clasificado en los subgrupos MYB-R1, MYB-R2, MYB-R3 y MYB-R4 (Figura 5), también llamados R1 MYB, R2R3 MYB, R1R2R3 MYB o R4 MYB, respectivamente. c-Myb y v-Myb pertenecen al subgrupo MYB-R3. En plantas, el subgrupo MYB-R2 es el más numeroso y sus miembros suelen tener una nomenclatura tipo *AtMYBR23* (Dubos y cols., 2010). A este subgrupo pertenecen 125 de los 168 genes MYB de *A. thaliana* (Du y cols., 2015), mientras que sólo 5 genes conforman el subgrupo MYB-R3 (Chen y cols., 2017).

La función de los FT MYB de plantas está relacionada con diversos procesos metabólicos y celulares, que incluyen la respuesta a estrés biótico o abiótico, el desarrollo, la diferenciación, el metabolismo, la defensa y proliferación celular. Una correlación interesante (ver Figura 5), que deriva del análisis funcional de varios de los 168 FT MYB de *A. thaliana*, sugiere que la clasificación de los FT MYB en función del número de repetidos R coincide con una

clasificación acorde al tipo de procesos celulares en los que participan (Dubos y cols., 2010). Por ejemplo, los FT MYB-R1 participan en la regulación del metabolismo secundario, del ciclo circadiano y del desarrollo de cloroplasto, mientras que los FT MYB-R2 regulan el metabolismo básico y el estrés biótico y abiótico (Dubos y cols., 2010).

En contraste, los miembros del subgrupo MYB-R3, están involucrados en la regulación de la expresión de genes específicos de la transición G2/M del ciclo celular en células vegetales (Ito y cols., 2005). La caracterización de la actividad de los MYB-R3 de *A. thaliana* indica que *AtMYB3R3* y *AtMYB3R5* actúan como represores de la expresión de este grupo de genes, mientras que *AtMYB3R4* tiene una función de activador y *AtMYB3R1* presenta una actividad dual, de represor y activador (Haga y cols., 2007; Haga y cols., 2011, Yang y cols. 2021).

Por otro lado, la caracterización de la interacción DNA-FT MYB inició con ensayos en células de mamíferos, cuando Biedenkapp y colaboradores (1988) demostraron la similitud de secuencia en la región N-terminal de v-Myb y c-myb y postularon que esta región estaba involucrada en la unión a la secuencia AC^(G/T)G o DNA blanco. Posteriormente, se encontró que la interacción del DNA blanco con c-Myb o v-Myb requiere de los repetidos R2 y R3, postulando que R1 estabiliza la interacción DNA-proteína y que la secuencia consenso reconocida por los FT MYB es variable debido al reconocimiento independiente de las secuencias R2 y R3 (Howe y cols., 1990). Años más tarde, la presencia de los FT MYB en plantas fue identificada en maíz, como un factor de transcripción capaz de activar genes involucrados en la síntesis de flavonoides y cuya secuencia de reconocimiento correspondía a CC^T/_AACC, la cual coincide parcialmente con la identificada en los FT MYB de vertebrados (Grotewold y cols 1994). Fue hasta 1998 cuando a partir de la caracterización

del promotor del gen de la ciclina B1 de *Catharanthus roseus* (*Catro CycB1*) que se demostró que el fragmento de 203 pb, localizado en el extremo 3' del promotor de *Catro CycB1*, era suficiente para conferir la actividad específica de promotor de genes de la fase G2/M en células vegetales, teniendo como secuencia consenso (T/C)C(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A (Ito y cols., 2001). Al profundizar en el análisis de esta secuencia, se encontró que la secuencia del sitio de reconocimiento de *AtMYB3R1*, *AtMYB3R4*, y de los FT MYB-R3 de *Nicotiana tabacum*, *NtmybA1*, *NtmybA2* y *NtmybB*, tiene similitud con la secuencia del motivo de regulación en *cis*, denominado MSA por las siglas en inglés de Mitosis Specific Activator (Ito y cols., 1998; Ito y cols., 2001). El motivo MSA, presente en repeticiones en tandem, está involucrado en la regulación de la actividad de promotores de genes de la transición G2/M (por ejemplo *CycB1* de *C. roseus* (*Catro CycB1*), *AtNACK1/HK*, *AtCYCB1;1*, *AtCYCB2;1*, *AtCDC2*, *AtKNOLLE*, entre otros (Ito y cols., 2001; Menges y cols., 2005; Haga y cols., 2007, 2011; Kobayashi y cols., 2015); el análisis por ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) demostró la unión *in vitro* de *NtmybA1*, *NtmybA2* y *NtmybB* a la secuencia del motivo MSA (YAACGG) presente en la secuencia promotora del gen de la ciclina B de *N. tabacum* (*NtCycB1;1*; Ito y cols., 2001).

2. ANTECEDENTES

Uno de los temas de investigación de interés del grupo en el que se desarrolló este proyecto es el estudio de la división celular al inicio de la nodulación. La identificación y caracterización funcional de genes involucrados en ciclo celular es una de las estrategias experimentales utilizadas en el grupo. Uno de los genes de *P. vulgaris* estudiados ha sido *KNOLLE*, un gen específico de la citocinesis en células vegetales. *KNOLLE* codifica para

una syntaxina esencial para la fusión de las vesículas citocinéticas responsables de la formación de la placa celular (Seguí-Simarro y cols., 2004). Su transcripción y traducción tiene lugar durante la transición de fases G2/M y la fase M del ciclo celular, respectivamente, mientras que la proteína KNOLLE se degrada al concluir la citocinesis (Mayer y cols., 1991; Touihri y cols., 2011). El promotor de *PvKNOLLE* (*promPvKNOLLE*), que corresponde a un fragmento de 1.8 kb “río arriba” del TSS, tiene tres repeticiones del motivo MSA (Monroy-Morales y cols., 2022). La actividad de *promPvKNOLLE* es específica de células meristemáticas de la raíz de *P. vulgaris* (no inoculadas e inoculadas con *R. etli*), es decir, en el meristemo apical de la raíz, en primordios de raíz lateral y en las células que reactivan su ciclo celular en el sitio de infección con rizobia y primordios de nódulos (Ayala-Guzmán, 2016; Monroy-Morales y cols., 2022). En estudios recientes, utilizando una quimera fluorescente YFP-*PvKNOLLE* para visualizar la citocinesis, en el grupo se demostró que, en el sitio de infección, el HI sale del pelo radical y penetra la célula subepidermal adyacente cuando ésta está por concluir citocinesis (Monroy-Morales y cols., 2022; Monroy-Morales, 2024).

Otra de las estrategias empleadas para extender la lista de genes de *P. vulgaris* que se expresan en la transición G2/M del ciclo celular, se basó en la noción de que el motivo MSA participa en la activación de la transcripción de un número importante de genes específicos de esta etapa del ciclo celular en plantas. Con el uso de herramientas informáticas, se identificaron 73 genes de *P. vulgaris* cuyo promotor porta repetidos de MSA, entre los cuales se encuentran los posibles ortólogos de los genes *NACK1/HK*, *CYCBI;1*, *CYCBI;4* *CDC25* y, por supuesto, *KNOLLE*, así como genes de proteínas asociadas a microtúbulos y reguladas por el ciclo celular, cinesinas, FT tipo bZIP, FT MYB-R3, entre otros (Bucarey-Ruiz, 2021).

El análisis preliminar del alineamiento entre las secuencias codificadas por los genes *AtMYB3R1*, *AtMYB3R4*, y los de *P. vulgaris* Phvul.001G061200 y Phvul.009g106700 (en este trabajo denominados *PvMYB200* y *PvMYB700*, respectivamente), sugiere la ortología entre estos genes (Haga y cols., 2007; Haga y cols., 2011, Yang y cols. 2021). Por lo que resultan de particular interés como posibles reguladores de la transición G2/M durante la división celular al inicio de la nodulación.

3. JUSTIFICACIÓN

La caracterización de factores de transcripción MYB-R3 de *Phaseolus vulgaris* contribuirá a descifrar la maquinaria que regula la división celular al inicio de la nodulación.

4. HIPÓTESIS

Los genes *PvMYB200* y *PvMYB700* participan en la división celular al inicio de la nodulación.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar la organización de los genes *PvMYB200* y *PvMYB700* y su actividad espacio-temporal en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la estructura primaria de los factores de transcripción *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*.
2. Caracterizar la actividad de los promotores de los genes *PvMYB200* y *PvMYB700*
3. Determinar la citolocalización de *PvMYB700* en raíces transgénicas de *P. vulgaris*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Análisis bioinformático de las secuencias codificantes de los genes *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*.

Dependiendo del objetivo del análisis, se utilizaron las plataformas bioinformáticas referidas:

- Secuencias *in silico*

La búsqueda de secuencias promotoras o codificantes se realizó en la plataforma Phytozome disponible en:

<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/> (Goodstein y cols., 2012)

- Porcentaje de identidad

El análisis entre pares de secuencias de aminoácidos se realizó en la plataforma BLASTp en disponible en NCBI:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&DATABASE=n/a&QUERY=&SUBJECTS=

- Alineamiento múltiple de secuencias con el paquete ClustalW:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

- Búsqueda de secuencias consenso de motivos tipo señales o secuencias de localización nuclear:

<https://nucpred.bioinfo.se/nucpred/>

<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLSstradamus/>

https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_y.cgi

- Búsqueda de regiones intrínsecamente desordenadas. Se utilizó el predictor de regiones naturales desordenadas (PONDR por sus siglas en inglés; <http://www.pondr.com/>). La

plataforma despliega los resultados de manera gráfica indicando a través de un histograma las regiones consideradas como intrínsecamente desordenadas y las regiones ordenadas.

6.2 Diseño de los pares de oligonucleótidos gene-específicos

Las recomendaciones que se tomaron en cuenta para el diseño de pares de oligonucleótidos fueron:

1. Tener un contenido de G+C $\geq 50\%$ y tener una guanina o citosina en el extremo 3' del oligonucleótido para promover la unión a la secuencia blanco.
2. Una longitud de 18 a 24 nucleótidos.
3. La temperatura de fusión (T_m) $\geq 60^\circ\text{C}$
4. Evitar secuencias complementarias o palindrómicas.
5. Evitar la formación de estructuras de tipo tallo-asa.

Para el cálculo de la T_m se tomó en cuenta concentración de Mg^{2+} (2mM), dNTPs (0.25 mM) y oligonucleótidos, la enzima Taq polimerasa empleada y el % G+C del oligonucleótido utilizados en la reacción de PCR, para tal efecto se utilizaron las siguientes plataformas:

- OligoAnalyzerTm Tool de IDT Integrated DNA Technologies,
<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

- New England Biolabs, <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>

Los fragmentos de las secuencias nucleotídicas de *PvMYB200* y *PvMYB700* a amplificar fueron:

- fragmentos genómicos que comprenden aproximadamente 2000 pb “río arriba” del inicio de la transcripción incluyendo el 5'UTR del gen de interés.
- secuencias codificantes que comprenden desde el codón de inicio, hasta el codón previo al codón de paro

En Anexos Tablas 1-3 se recapitulan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de tesis.

6.3 Extracción de DNA genómico (DNAg)

Para la extracción de DNAg se utilizó tejido de hoja o raíz de plantas de *P. vulgaris* colectadas a los 15 días post-germinación, procediendo de la siguiente manera: se maceraron aproximadamente 2 gramos de tejido en mortero con nitrógeno líquido hasta formar un polvo homogéneo y fino que se pasó a tubos Eppendorf de 1.5 mL, donde se añadió el reactivo DNAzol (Invitrogen) en una relación de 300 µL por 0.1 gramo de tejido. La mezcla se incubó en agitación por 5 min a temperatura ambiente o hasta obtener una suspensión homogénea y viscosa. Después se añadieron 300 µL de cloroformo, se homogenizó por inversión a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,400 rpm por 10 min. La fase acuosa fue recuperada y se mezcló con 225 µL de etanol al 100%, posteriormente se incubó 5 min a temperatura ambiente con inversión, se centrifugó a 6000 rpm durante 4 min y se removió el sobrenadante. La pastilla resultante se lavó con una mezcla de DNAzol - etanol 100% y se agitó manualmente por 5 min a temperatura ambiente, después se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 4 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavó la pastilla con etanol al 75% y se centrifugó a 6000 rpm por 4 min, una vez realizado este proceso se desechó el sobrenadante y se solubilizó la pastilla en buffer TE (Tris 10 mM, pH 8.0 - EDTA 1 mM), para luego cuantificar la concentración de DNA por espectrofotometría a 260 nm de longitud de onda, utilizando el equipo NanoDrop (Thermo).

6.4 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se incubaron 1 µg de RNA total de ápice de raíz de *P. vulgaris* (disponible en laboratorio) y 1 µL de DNasa libre de RNAasas en un volumen de 10 µL a 37°C por 15 min y posteriormente se incubó a 65°C por 10 min.

Después se agregaron 500 ng de oligonucleótido (dT) y la mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min, luego se agregaron 8 µL de una mezcla preparada con 1 µL de dNTP's 10 mM, 3 µL de H₂O tetradestilada estéril y 4 µl de buffer de reacción 5X y se incubó a 42 °C durante 2 min. En seguida, se agregaron 1 µL de la enzima comercial Maxima Reverse Transcriptase (200 U/µL, Thermo Scientific Maxima Reverse Transcriptase) y se continuó la incubación a 50 °C durante 30 min. Por último, se inactivó la enzima a 70°C durante 10 min. El cDNA se utilizó para la amplificación de las secuencias codificantes y se conservó a -80 °C.

6.5 Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de PCR para amplificar las secuencias promotoras o codificantes, se hicieron utilizando como molde 100 ng de DNAg o cDNA, respectivamente, pares de oligonucleótidos secuencia-específicos, DNA polimerasa de alta fidelidad PhusionTM (ThermoScientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las condiciones de la reacción de amplificación consistieron en: 1 ciclo a 98°C por 3 min, y 30 ciclos a 98°C por 10 seg, 55°C por 50 seg y 72°C con tiempo de extensión de 1 min por kb a amplificar. El tamaño de los fragmentos amplificados fue determinada por electroforesis horizontal en gel de agarosa, mientras que la identidad de secuencia fue confirmada por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM.

6.6 Reacción de clonación en pENTR™/D-TOPO

La reacción de clonación de productos de amplificación por PCR se llevó a cabo conforme a las especificaciones del protocolo en línea (https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFSAssets%2FSLG%2Fmanuals%2Fpentr_dtopo_man.pdf) pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits (Invitrogen). En general, se procedió de la siguiente manera: la mezcla de reacción de clonación se hace con una relación molar pENTR™/D-TOPO: inserto de 1:2, en un volumen final de 6 µL (ajustados con H₂O tetradestilada) y se incubó a 23 °C durante 1 hr.

Para la transformación en *E.coli*, se transfirieron 4 µL de la mezcla de clonación a un tubo Eppendorf de 1.5 mL que contenía una alícuota de 50 µL de bacterias *E.coli* TOP10 quimiocompetentes y se dejó en hielo durante 30 min, para posteriormente dar un choque térmico a 42°C por 45 seg. Las bacterias se resuspendieron en 800 µL de medio LB (Luria Bertani) y se incubaron a 37 °C durante 60 min. Se inocularon 100 µL de la suspensión bacteriana en medio LB sólido con kanamicina 50 µg/mL y las placas se incubaron a 37 °C durante 16 hrs.

6.7 Reacción de recombinación en pEarleyGate104 o pBGWFS7

La reacción de recombinación se llevó a cabo conforme a las especificaciones del protocolo en línea en la sección “Gateway Recombination Cloning Technology” (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pentrdualselectionvectors_man.pdf).

Brevemente, la mezcla de reacción de recombinación se hizo con una relación molar vector de entrada: vector destino de 1:0.5, en un volumen final de 8 µL (ajustados con buffer TE) y se incubó a 65 °C durante 5 min, después se añadieron 2 µL de la enzima LR Clonase II (Invitrogen) y se incubó la reacción a 25°C por 1 hr. Posteriormente, se añadió 1 µL de

proteinasas K y se incubó a 37°C por 10 min. Por último, la mezcla de recombinación se transformó en *E. coli* TOP10, como se describió en inciso 6.6 y las colonias que portan el vector con el inserto de interés recombinado fueron seleccionadas por PCR en colonia como está descrito en inciso 6.10.

El vector destino pBGWFS7 está diseñado para la clonación y caracterización de la secuencia promotora del gen de interés en fusión transcripcional con la secuencia que codifica para la proteína quimérica reportera, GFP-GUS

El vector pEarleyGate104 que permite la clonación de la secuencia codificante de interés en fusión traduccional en el extremo C terminal de la secuencia codificante (cds) YFP (Yellow Fluorescent Protein) para su expresión bajo el promotor constitutivo 35S.

6.8 Reacciones con enzimas de restricción, fosfatasa y ligasa

Para las etapas de escisión de fragmentos y subsecuente reacción de clonación según corresponda, se utilizaron enzimas de restricción de la gama FastDigest (ThermoScientific) y la fosfatasa alcalina FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, ThermoScientific), cuyas condiciones de incubación son compatibles (buffer FastDigest y temperatura; ThermoScientific). Para la etapa de ligación, se utilizó el sistema comercial Rapid DNA Ligation Kit (ThermoScientific). Para la mezcla de ligación se utiliza una relación molar 3:1 (inserto:vector) en un volumen final de 20 µL y un tiempo de reacción de 5 min a 22°C. Se toman 5-10 µL de mezcla de ligación para transformar en *E. coli* TOP 10 quimiocompetentes. La identificación de clones de interés se realiza por ensayos de PCR en colonia.

6.9 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

La extracción de fragmentos de DNA se realizó utilizando el sistema Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, la

muestra de interés se sometió a electroforesis horizontal en gel de agarosa. Posteriormente, se identificó y cortó la banda del gel que corresponde al tamaño del DNA de interés, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se pesó. Se le agregó buffer ADB (Agarose Dissolving Buffer) en una relación 1:3 (peso:volumen) y se incubó a 55 °C hasta que se disolvió la agarosa. En seguida, la suspensión se transfirió a la columna (Zymo-Spin™ Column), se centrifugó a 14000 rpm durante 60 seg, y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 µL del buffer de lavado (DNA Wash Buffer) a la columna y centrifugó a 14000 rpm durante 30 seg, para luego desechar el efluente (este paso se repitió una vez más). Finalmente, se agregaron 6 µL de H₂O tetradestilada a 55°C a la columna, para luego centrifugar a 14000 rpm durante 60 seg. El efluente contiene el DNA de interés.

6.10 PCR de colonia

Este método permitió identificar qué colonias bacterianas portan el plásmido con el inserto de interés. Se procedió de la siguiente manera: se resuspendió una asada de la colonia bacteriana a analizar, en un volumen de 50 µL de H₂O tetradestilada estéril contenida en un tubo Eppendorf, posteriormente, se lisan las bacterias mediante tres ciclos de congelación (-80 °C) y ebullición (100 °C). El lisado se centrifuga (14000 rpm durante 1 min) y se utiliza 1.5 µL del sobrenadante como templado en una reacción de PCR en 20 µL. La mezcla de PCR contiene: buffer comercial Taq con KCl 10X (2 µl), MgCl₂ 25 mM (1.6 µl), dNTP's 10 mM (0.5 µl), par de oligonucleótidos gene-específicos y 2 µL de la enzima Taq DNA Polymerase LC recombinante (1U/µl, Thermo Scientific). Las condiciones generales de la reacción fueron: un ciclo a 94 °C/3 min, 40 ciclos a 94 °C/20 seg, 55 °C/30 seg, 72 °C/1 min/Kb y 1 ciclo a 72 °C/7 min. La muestra de control positivo dependió del diseño del

experimento. Finalmente, se analizan 10 μ L de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

6.11 Transformación en *Agrobacterium rhizogenes* K599 electrocompetentes

Para transformar *A. rhizogenes* K599, se mezclaron 100 ng de plásmido (basado en pBGWFS7 o pEarleyGate104) con 50 μ l de bacterias K599. La mezcla se dejó 10 min en hielo, en seguida se pasó a la celda de electroporación y se sometió a un campo eléctrico de (1.8 kV) utilizando un electroporador Bio-Rad®. Posteriormente se pasaron las bacterias a 900 μ l de medio LB y se incuban a 30°C con agitación por 2 hrs, para luego plaquear la suspensión en medio LB sólido con espectinomicina 200 μ g/ml o kanamicina 50 μ g/mL, según el plásmido sea derivado de pBGWFS7 o pEarleyGate104, respectivamente, e incubar a 30°C durante 48 hrs. La identificación de clonas positivas se hizo por PCR en colonia. Las clonas a partir de las cuales se amplifica un producto del tamaño esperado (clonas positivas) fueron preservadas en glicerol al 40% a -70 °C.

6.12 Preparación de *A. rhizogenes* K599 electrocompetentes

Se parte de un precultivo de 30 mL en medio LB líquido (sin antibiótico) inoculado con una asada de *A. rhizogenes* K599 e incubando por aprox 16 h a 30°C con agitación. Se toman 3 mL del precultivo para inocular 30 mL de medio LB líquido (sin antibiótico) y se incubó a 30°C con agitación hasta obtener una DO_{600 nm} de 0.5-0.6. Se pasaron 1.4 mL de cultivo a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se centrifugó a 9,000 rpm durante 1 min a 24°C. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 1mL de H₂O tetradestilada estéril (a 24°C). La suspensión bacteriana se centrifugó a 9,000 rpm durante 1 min a 24°C . Este paso se repitió una vez. Por último, las bacterias se resuspendieron suavemente en 50 μ L de glicerol al 10% estéril (a 24°C), se etiquetó el tubo y se preservó a -70°C.

6.13 Desinfección y germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa).

Las semillas se lavaron con agua de la llave, este paso se repitió de 5 a 8 veces, hasta que las semillas de frijol quedaron limpias (libres de polvo). Posteriormente, en campana de flujo laminar, las semillas se esterilizaron con alcohol etílico al 100 % por un min, se realizaron aproximadamente tres lavados con agua destilada estéril hasta eliminar el olor a etanol. Después se incubaron en cloro al 20 % durante 5 min, se hicieron 5 lavados con agua destilada estéril. La germinación se realizó en una charola estéril sobre un papel absorbente humedecido con medio Fåhræus líquido estéril (el cual contiene CaCl₂, 90 mM; MgSO₄, 58.8 mM; KH₂PO₄, 73 mM; Na₂HPO₄, 1.08 mM; FeC₆H₅O₇, 204 mM y trazas Gibson: MnSO₄, 120 µM; ZnSO₄, 76.5 nM; H₃BO₃, 460 µM; CuSO₄, 32 nM y H₂MoO₄, 38.8 nM), e incubación a 28 °C durante 48 h en oscuridad a 28°C.

6.14 Generación de raíces transgénicas de frijol

La generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris* se basa en el método de transformación mediada por *A. rhizogenes* K599, el cual permite la inserción aleatoria de una secuencia exógena en el genoma de la planta; la metodología se basa en la generación de una herida en el hipocotilo de plántulas de frijol 48 hpg, en la cual se inoculó la clona de *A. rhizogenes* K599, que porta el plásmido de interés. Posteriormente, la planta se colocó en un tubo de boca ancha con medio Fåhræus y se incubaron en cuarto de crecimiento a 28°C, en luz, hasta la formación de raíces pilosas (“hairy roots”), las cuales surgen 15-20 días posteriores a la inoculación. La identificación de de raíces pilosas que portan la construcción de interés (raíces transgénicas) se realizó mediante actividad histoquímica de GUS o por estereomicroscopía de epifluorescencia para visualizar GFP/YFP, según corresponda.

6.15 Inoculación de las raíces transgénicas de frijol con *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604 o *R. etli* CE3 pMP604

Se preparó un inóculo de *R. etli* CE3-DsRed pMP604 o *R. etli* CE3 pMP604 (según sea el caso) en medio PY e incubó a 30°C durante 15 horas con agitación (300 rpm). Una vez que el inóculo tenga una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.4-0.6, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 6° C, y la pastilla se resuspendió en 4 mL de $MgSO_4$ 10 mM, la suspensión se centrifuga nuevamente y la pastilla se resuspendió en 4 mL de medio Fåhraeus y se midió la $DO_{600\text{ nm}}$ de la suspensión. Por último se diluyó el inóculo en medio Fåhraeus para obtener una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.05 unidades arbitrarias, se añadió el inóculo a las raíces transgénicas de *P. vulgaris* y se incubaron a 28°C. El tiempo de recolección de las plantas inoculadas se hizo a 7, 14 y 21 días post inoculación, para proceder según corresponda al experimento.

6.16 Actividad histoquímica de GUS

La actividad del promotor del gen fue revelada a través de la reacción enzimática de GUS en presencia del sustrato cromogénico X-Gluc, que al hidrolizarse produce ácido glucorónico e indoxilo el cual al dimerizarse por oxidación forma un precipitado insoluble de color azul. Para la reacción se usó el siguiente protocolo:

- Las raíces se lavaron con la solución de lavado I (Na_2HPO_4 , 50 mM; NaH_2PO_4 , 50 mM; $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 mM; $K_4Fe(CN)_6$, 0.5 mM, concentración final) por 5 min.
- Posteriormente se lavaron con solución de lavado II (solución de lavado I, EDTA 2 mM, Tritón X100 0.1%) por 5 min.
- La actividad de GUS se reveló en solución III (solución II con 15 mM X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucorónico, sal de ciclohexilamonio) a 37°C hasta la aparición del precipitado de color azul.

- La reacción se detuvo mediante lavados de las raíces con H₂O estéril, desgasificación durante 5-10 min y las raíces se aclararon en solución de hipoclorito de sodio comercial diluido al 0.6%.

*Las raíces se conservaron en glicerol 30% DMSO 2% y se capturaron imágenes de las zonas de la raíz donde se observó el color azul.

6.17 Estereomicroscopía y microscopía confocal

La observación, selección y documentación de las raíces transgénicas con actividad de GUS se realizó en un estereomicroscopio (Olympus MVX10) equipado con fuente de iluminación de epifluorescencia y acoplado a una cámara multicromática bajo control del software Image-ProPlus. El análisis de la citolocalización se hizo por microscopía confocal, con el microscopio confocal multifotónico invertido FV1000 (Confocal Olympus FV1000 Invertido), usando el objetivo 20X/0.75, con una longitud de excitación/emisión de 488/543 nm. La reconstrucción 2D de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, así como la edición de las imágenes capturadas por el estereomicroscopio fueron editadas con el software Image J/Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de secuencia de los genes *PvMYB200* y *PvMYB700*

7.1.1 Secuencias de factores de transcripción MYB-R3 en el genoma de *P. vulgaris*

De acuerdo con la plataforma en línea PlantTFDB v5.0, en el genoma de *P. vulgaris* hay 181 genes que codifican para factores de transcripción de tipo MYB, cuya lista está disponible en la liga <http://planttfdb.gao-lab.org/family.php?sp=Pvu&fam=MYB>. En esta lista se encuentran los genes Phvul.001G061200 y Phvul.009g106700, identificados previamente (Bucarey-Ruiz 2021) los cuales son tema de estudio en este proyecto. Por razones prácticas la nomenclatura de estos genes se ajustó a *PvMYB200* y *PvMYB700*, respectivamente.

7.1.2 Análisis de la posible ortología de los genes *PvMYB200* y *PvMYB700* con respecto a *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*

Al realizar análisis tipo BLASTp en el proteoma de *P. vulgaris* (*Phaseolus vulgaris* v2.1) reportado en la plataforma Phytozome v2.1, utilizando para consulta la secuencia peptídica de las proteínas del subgrupo MYB-R3, *AtMYB3R1* (AT4G32730.2) y *AtMYB3R4* (AT5G11510.1), se obtuvo que las secuencias de Phvul.001G061200 (*PvMYB200*) y Phvul.009G106700 (*PvMYB700*), previamente identificadas (Bucarey-Ruiz, 2021), fueron las que tuvieron el mejor puntaje con una cobertura entre el 98 y 100% (Figura 6).

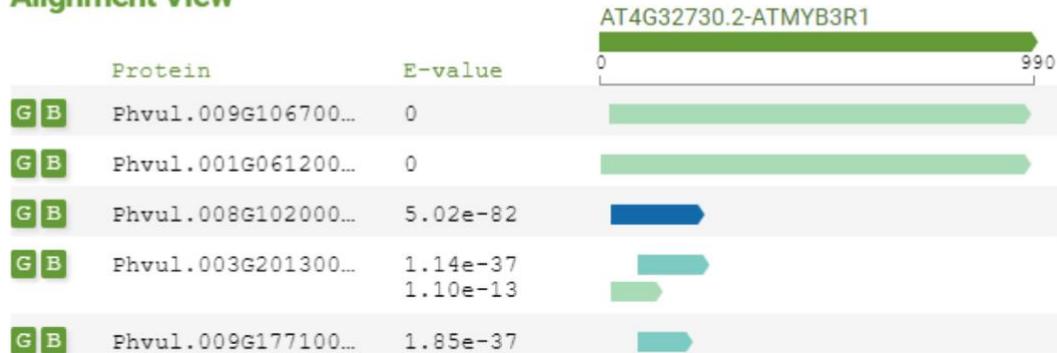
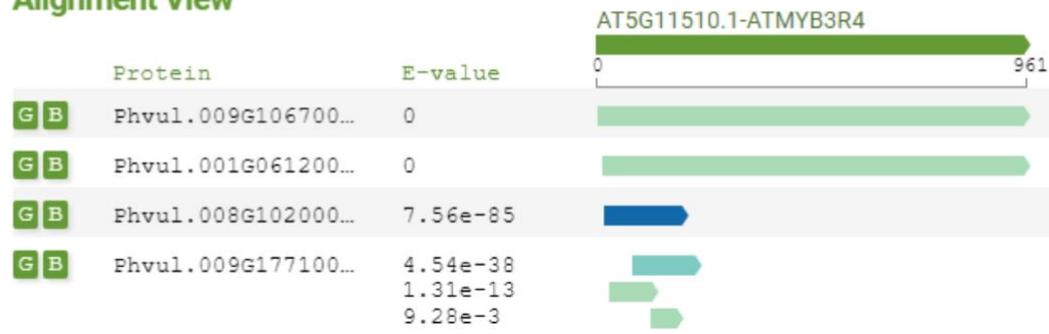
A**Alignment View****B****Alignment View**

Figura 6. Resultado de la búsqueda de tipo BLASTp utilizando las secuencias peptídicas de las proteínas (A) *AtMYB3R1* (AT4G32730.2) y (B) *AtMYB3R4* (AT5G11510.1) en la plataforma de NCBI, se muestran los resultados obtenidos.

Cabe mencionar que al hacer el análisis inverso, es decir, la búsqueda tipo BLASTp en el proteoma de *A. thaliana* (*A. thaliana* TAIR10), utilizando las secuencias peptídicas de *PvMYB200* o *PvMYB700* como consulta, se obtiene que las proteínas con mayor puntaje son *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*.

Un segundo punto a tomar en cuenta al analizar la posible ortología entre *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*, se basa en análisis filogenéticos de los genes del subgrupo MYB-R3 de algas, musgos, gimnospermas, *Amborella trichopoda* (la angiosperma

más primitiva), monocotiledóneas y eucotiledóneas (Ito y cols., 2005; Feng y cols., 2017). Los autores de estos análisis proponen la diversificación de los genes MYB-R3 en los grupos A, B y C. De acuerdo a Feng y colaboradores (2017), tanto los genes de *P. vulgaris* *PvMYB200* y *PvMYB700*, como *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*, se ubican en la rama del grupo A. Mientras que en la rama del grupo B se localiza el gen AT4G00540 (*AtMYB3R2*), sin representación de genes de *P. vulgaris*. En la rama C se encuentran los genes AT3G09370 (*AtMYB3R3*), AT5G02320 (*AtMYB3R5*), Phvul.010G012500 y Phvul.1008G102000.

7.1.3 Análisis comparativo del tamaño e identidad de secuencia de las proteínas *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*

Un tercer punto a considerar en términos de una posible ortología es el largo de las secuencias peptídicas, siendo muy similar en *PvMYB200* y *PvMYB700* (961 y 995 residuos, respectivamente), en relación a *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* (1004 y 988 residuos, respectivamente). El largo de estas proteínas contrasta con los otros MYB-R3 de *A. thaliana*: *AtMYB3R2* (437 aa), *AtMYB3R3* (510 aa) y *AtMYB3R5* (548 aa), y de *P. vulgaris*: Phvul.008G102000 (561 aa) y Phvul.010G012500 (563 aa).

Otro parámetro a analizar fue el porcentaje de identidad de secuencia entre las proteínas *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*, estimado por alineamiento de pares de secuencia utilizando la herramienta BLASTp. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos, los cuales indican que el porcentaje de identidad entre *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* es de 39.5%, mientras que *PvMYB200* y *PvMYB700* tienen mayor identidad entre sí (59.7%). Así mismo, en el análisis comparativo entre las proteínas de *A. thaliana* y las de *P. vulgaris*, se encontraron porcentajes de identidad en el rango de 37 y 43% , por lo que se concluye que el parámetro de porcentaje de identidad entre pares de secuencias no permite inferir la posible

ortología de *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* respecto a *PvMYB200* y *PvMYB700*. En cuanto al porcentaje de identidad entre cada MYB-R3, es de 41% entre *AtMYB3R1* y *PvMYB200* y de 43.61% entre *AtMYB3R1* y *PvMYB700*; así como de 37.64% entre *AtMYB3R4* y *PvMYB200* y de 39.81% entre *AtMYB3R4* y *PvMYB700*. En su conjunto estos datos no dan información significativa que permita discernir cuál de estos MYB-R3 de *P. vulgaris* es el posible ortólogo de *AtMYB3R1* o *AtMYB3R4*; sin embargo, los alineamientos múltiples permiten definir que las regiones que tienen mayor porcentaje de identidad son las que corresponden al extremo N-terminal, donde se encuentran las secuencias R (ver Anexos Figura 1).

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las proteínas *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*

	<i>AtMYB3R1</i>	<i>AtMYB3R4</i>	<i>PvMYB200</i>	<i>PvMYB700</i>
<i>AtMYB3R1</i>	100.00%	43.26%	41.09%	40.86%
<i>AtMYB3R4</i>	43.26%	100.00%	43.08%	43.71%
<i>PvMYB200</i>	41.09%	43.08%	100.00%	49.39%
<i>PvMYB700</i>	40.86%	43.71%	49.39%	100.00%

7.1.4 Distribución de motivos en la secuencia de los transcritos primarios de *PvMYB200* y *PvMYB700*.

Otro punto interesante es el grado de conservación en la distribución de las secuencias codificantes de los repetidos R1, R2, R3 (ver Anexos Figura 1), y motivos 1, 2 y 4 (ver Anexos Figura 2) identificados por métodos bioinformáticos, respecto al patrón de exones/intrones en los transcritos primarios (pre-mRNA) de los MYB-R3 del grupo A en angiospermas (Feng y cols., 2017). De acuerdo con estos autores, estos transcritos MYB-R3 están organizados en 11 intrones y 12 exones. La secuencia 5'UTR está repartida entre el exón 1 y parte del exón 2, a su vez el 3'UTR está codificado por el extremo 3' del exón 12. En la figura 7 se esquematiza la organización de los exones 1-12 representativa de genes MYB-R3 del grupo A en angiospermas, así como la de *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*, e incluye la localización de las secuencias que codifican los repetidos R y motivos 1, 2 y 4. La identificación de las secuencias peptídicas de los repetidos y motivos se ilustra en Anexos Figuras 1 y 2. Si bien los pre-mRNA de *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* presentan una organización similar, el tamaño de los pre-mRNAs es diferente, siendo los de *PvMYB200* y *PvMYB700* de 8,745 y 6,968 nucleótidos, respectivamente. Mientras que los de *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* son más cortos (5,510 y 5,070 nucleótidos, respectivamente). Las diferencias en tamaño son debidas a una variabilidad en el largo de las secuencias intrónicas. En cambio, el tamaño de los exones equivalentes es muy conservado, así como la distribución exónica de las secuencias que codifican para los repetidos R y motivos 1, 2 y 4 (Figura 7).

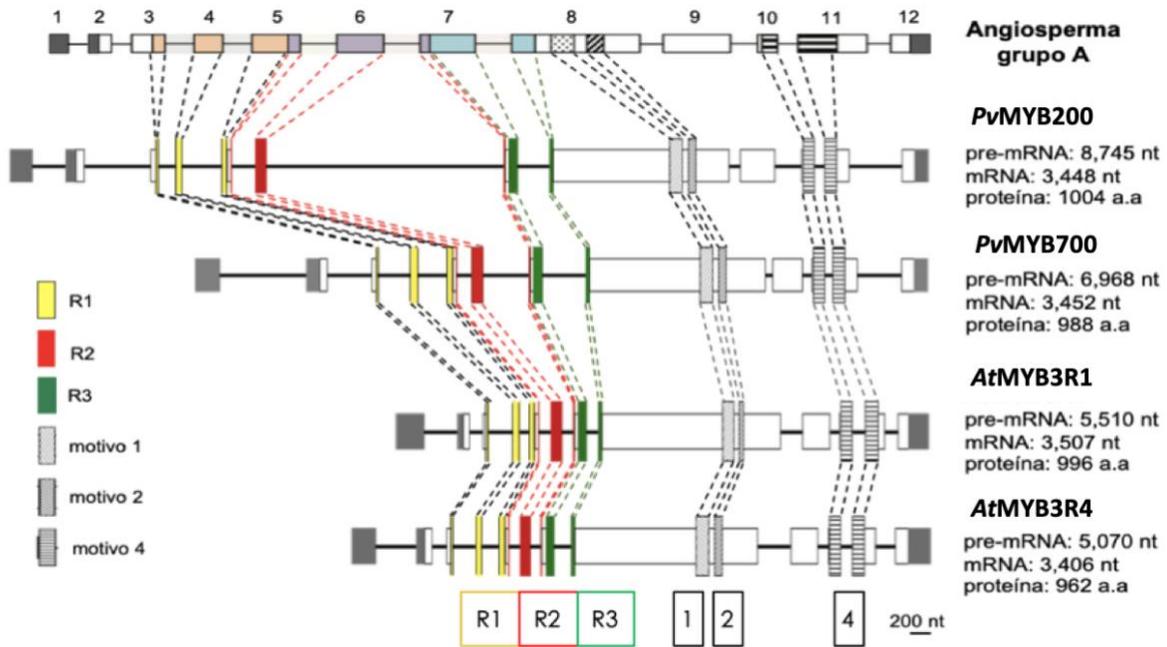


Figura 7. Esquema de la organización de los 12 exones y 11 intrones que constituyen los transcritos primarios (pre-mRNA) de los MYB-R3 del grupo A y localización de los repetidos R y motivos 1, 2 y 4. Intrones: líneas negras. Exones: rectángulos. Repetidos R1 (en amarillo), R2 (en rojo), R3 (en verde), motivo 1 (rectángulo punteado en gris, 1), motivo 2 (rectángulo con líneas en diagonal, 2) y motivo 4 (rectángulo con líneas horizontales, 4). Las secuencias de los repetidos y los motivos se muestran en los alineamientos ilustrados en Anexos Figuras 1 y 2. Los esquemas de genes *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* respetan la escala de 200 nt anotada como una barra. El esquema Angiosperma grupo A no está a escala y es una versión modificada de Feng y colaboradores (2017).

7.1.5 Identificación de señales de localización nuclear en la secuencia peptídica de *PvMYB200* y *PvMYB700*.

Considerando que las proteínas en estudio son FT, y por lo tanto deben ser importadas a núcleo, se consideró relevante buscar si en las secuencias peptídicas de *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* existe una secuencia tipo señal de localización nuclear o NLS (por las siglas en inglés de Nuclear Localization Signal). La búsqueda se realizó en 3 plataformas dirigidas a predecir sitios NLS específicas de la vía importinas α/β ,

de tipo monopartitas o bipartitas. Sólo la plataforma NLS Mapper reportó la identificación de las señales NLS monopartita PSILKKRHRD, posiciones 629-639 y 644-654 en *PvMYB200* y *AtMYB3R1* respectivamente, y bipartita LKKRHRDLLSVLDRRKDKKLLK, posiciones 644-672 en *AtMYB3R1* (Figura 8). Es de notar que los residuos LKKRHRD están presentes tanto en la predicción NLS monopartita como en la bipartita (Figura 8A). También es de llamar la atención que, aunque las secuencias NLS monopartitas QSILRKTRD y PSILKKRHRD están presentes en las secuencias peptídicas de *AtMYB3R4* y *PvMYB700*, respectivamente (Figura 8B), la plataforma NLS Mapper no las reporta como una predicción de NLS. Otro aspecto a resaltar es que las secuencias Q/PSILR/KKR, identificadas como NLS monopartitas, corresponden al extremo C-terminal del motivo 2 presente en los 4 FT MYB-R3 analizados (Figura 8).

A

*Pv*MYB200

*At*MYB3R1

Predicted NLSs in query sequence	
MDGERSMPAPSYGQVDGAQVKALHGRITGPTRRSTKQWTL EEDDILRT	50
AVEKFKGKNNKIAECFKERTDVQCLHRWQKVLNPELVKGPNSKEEDDII	100
IELVKNKGAKKWSLARHLPGRIGKQCRERWVNHLDPTIKKEAWTQEEL	150
ALIHYYHIYGNKWAELSKYIPGRTDNAIKNHNSVKKKLD SYLTSGLVN	200
QFEPVPHVGNQSTRQLQCSGDDNCSKRMGEVEVSESSQGSANAVRFP	250
RGMGSAELQTGEPVCRPNEECNLKRDHSPSRASCSEPPYVSI DDICPEI	300
SHQEAQTSQFTEQHSHEPGNSISGDCHFNLSL PNISSMVLGQDSSQLQR	350
DCVASSEICDMVNPAPFTSEGLGVSTSMGPASLDSLKPEHVLISDDECCR	400
VLFSDSMNDGCFPPVDYIKGEDTVEFSGCTSFPCQSCNIQMAETGGTSTP	450
QLTCPRCSNNYQGTSSSLFPPVLSACDDREGPTANGNHLFGTNGHQLVS	500
RAPANFTYVNVVSSPCVDDMGTAVMEEARDILNGTSEEKTNVHTEKEDS	550
GSLCYEPPRPFSLDIPFFSCDLVQSGVDMQEFSP LGIRQFMSSMNCLT	600
PFRLWDSPHGSDPDALLKSAAKFTGTG PSILKKRHRD LLSPLSKRIDK	650
KLETDMTKNISSLDVMFGDNETQEADMP SFKKQSSACVDDNKENCQA	700
YKPIKYAIFDEKNSLKD TVDNSKSNVKQQQLKIEASAAAMEQEPGVLVE	750
HVDNDLTLSSPDQVGLKSNRGLGSSTKSPKSMNRSLEAVPNQNSHLKLS	800
KIPRSRINS SPCVRAKEHEKLSVAVTRVQAPGDN SGEQTRKDGGEFACS	850
IFGGTPFRKGL ESPSAWSPWFNTFLCSPRLGTEITVEDFGLYMSPGDR	900
SYDAIGLLKQISEQTAAATYANAKEVLGNETPKAASRKDASGNEEDKYHGS	950
PNQPGNDSQLASNALIERRTLDFSECGSPSKVDDNKSSAISFPSPSYLL	1000
KGCR	1004

Predicted NLSs in query sequence	
MKREMKAPTTPLESLQGD LKGGKQGR TSGPARRSTKQWTFEDEVLC	50
ERFQGNKWKIAECFKDR TDVQCLHRWQKVLNPELVKGPNSKEEDNTI	100
LVEKYGPKKWTISQHLPGRIGKQCRERWVNHLDPTIKKEAWTQEEL	150
IRAHQIYGNKWAELMKFLPGRSDNSIKNHNSVKKKLD SYYASGLLDQ	200
QSSPLIALQNKSIASSSWMHNSGDEGSSRPGVDAE ESECQASTVFSQS	250
TNDLQDEVQRGNEY YMPFHSIGTEQGISNAASHAEPPYSPFKDVKIVVP	300
EITSCETECSKKFQNLNCSHELRTTTATEDQLPGVSNDAKQDRG LLELTHN	350
MDNGGKNQALQQDFQSSVRLSDQPF LSNSDTPEAQLITDEECCRVLP	400
DNMKDSSTS SGEQGRNMVDPQNGKSLCSQAETHAHETGKVPALPHNPS	450
SSEGLAGHNCVPLLDSDLKDSL LPRNDSNAPIQGCR LFGATELECKTDTN	500
DGFIDTYGHVTS HGNDDNGFPEQQGLSYIPKDSLKLVLPLNSFSSSRVN	550
KIYFPIIDDKPAEKD KALCYEPPRFP SADI PFFSCDLVPSNSDLRQEYSP	600
FGIRQLMISMMNCTTPLRLWDS PCHDRSPDVM LNDTAKFSFGAP PSILKKR	650
HRDLLSPVLD RRKDKL KRAATSSLANDFSRLDVM LDEGDCCMTRSPSES	700
PEDKNICASPSIARDNRNCASARLYQEMIPIDE EEPKETLESGGVTSMQNE	750
NGCNDGGASAKNDQETS GFFELRLCSPGNTRARPDNKNVNASAKDLSNQH	800
KISLGDFTPEEMSSEPLCTVDSIPLSAIDKNTAETSFDIENFI NFDGTP	850
FRKLLDTPSPHKSPLLFGSFLQSPKLPPEIT FEDIGCFMSPGERSYDAIG	900
LMKHLSEHSATAYADALEVLGNDTPESILK KRQLNKS IQGKENQHQP HDQ	950
LGNRSQVECRALDFSDCGTPGKAKVPSASPGGYS SPSYLL	990

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
629	PSILKKRHRD	7

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
644	PSILKKRHRD	7

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
647	LKKRHRDLLSPVLD RRRKDKLKL	5.5

B

AT5G11510.1-ATMYB3R4	---KKT LVGAOSILRKRTRDLLTPLSEKRS DKKLEIDIAASLAKDFSR LDVMFDETENR	668
AT4G32730.2-ATMYB3R1	LNDTAKSFSGAP PSILKKR IRDLLSPVLD RRRKDKL KRAATSSLANDFSRLDVM LDEGDCC	692
Phvul.001G061200.1	LKSAAKFTGT PSILKKR IRDLLSPLSDKRIDK KLETDMT ---KNISSLDVMFGDNETQ	674
Phvul.009G106700.1	LKSAAKTFKGT PSILKKR IRDLLSPLSEKRIDK KLEIEMTSTLKNFSRLDVMFDDNETL	658

Figura 8. Posición de potenciales secuencias NLS monopartitas y bipartita predichas por NLS Mapper en las proteínas *Pv*MYB200 y *At*MYB3R1. A, secuencias peptídicas de *Pv*MYB200 y *At*MYB3R1 en las que las secuencias identificadas como posibles señales NLS se resaltan en rojo. En la parte inferior, en formato de tabla, se indica la posición del primer residuo de las secuencias NLS monopartita y bipartita identificadas. B, sección del alineamiento múltiple ilustrado en Anexos Figura 2.

7.1.6 Búsqueda de regiones intrínsecamente desordenadas en las secuencias peptídicas *PvMYB200* y *PvMYB700*.

De acuerdo a la reciente descripción de la identificación de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR, por las siglas en inglés de Intrinsically Disordered Regions) en MYB-R2 de *A. thaliana* (Millard y cols., 2019), las regiones IDR se encuentran localizadas en las secuencias denominadas non-MYB, es decir, no incluidas en los repetidos R. Estas predicciones se hicieron utilizando las plataformas PONDR VSL2, DISOPRED3 y IUPred2. Por lo que se consideró sería interesante investigar si las secuencias peptídicas de los FT MYB-R3, *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* presentan IDRs. La figura 9 presenta los resultados preliminares del análisis de *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* utilizando la plataforma PONDR VSL2. De acuerdo al algoritmo de predicción de esta plataforma, un valor de PONDR score de 0.5 corresponde al umbral de propensión al desorden. Valores menores a 0.5 predicen una región ordenada, mientras que un valor mayor a 0.5 se considera una posible IDR. En la figura 9 se observa que los repetidos R1, R2, R3 y los motivos 1, 2 y 4 se ubican en las regiones ordenadas en *PvMYB200*, *PvMYB700* y *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*. Los resultados obtenidos predicen que inmediatamente después del motivo R3 se encuentra un IDR en los FT *PvMYB200*, *PvMYB700* y *AtMYB3R1*, mientras que en *AtMYB3R4* un posible IDR se encuentra más distante. Un posible segundo IDR se localiza en un fragmento entre el motivo 2 y el motivo 4 (Figura 9) en los cuatro FT MYB-R3 analizados. Igualmente, el algoritmo predice que hay una tercera IDR que sobrelapa el extremo del motivo 4 en *PvMYB700* (Figura 9). Sin duda, estas predicciones de IDRs requieren ser validadas mediante un análisis experimental.

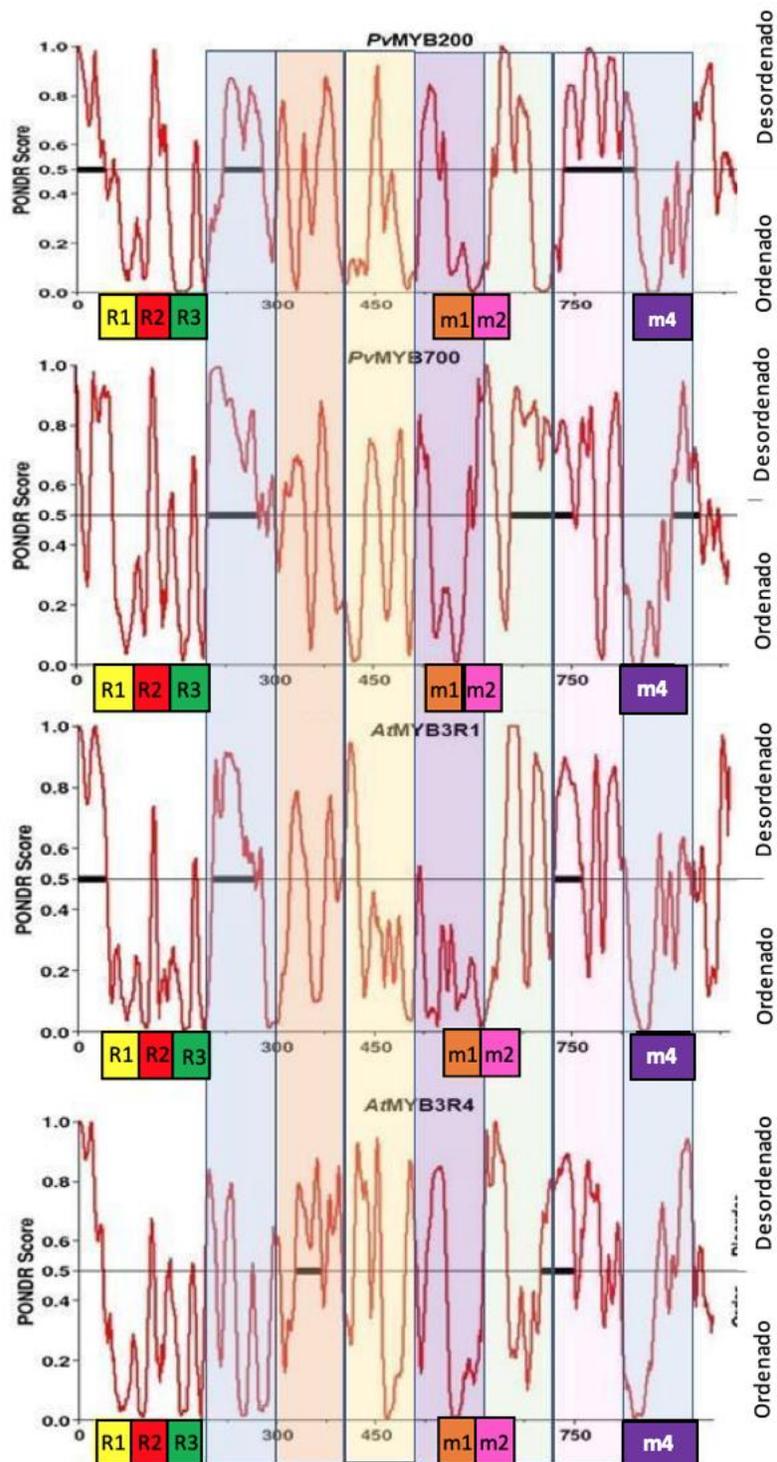


Figura 9. Predicción de posibles IDRs en *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* utilizando la plataforma PONDR (<http://www.pondr.com>). Para mejorar la visualización del análisis

se añadieron colores y se indican los motivos R1, R2, R3, así como los motivos 1, 2 y 4 (m1, m2 y m4, respectivamente). Barra negra indica las secuencias IDRs encontradas por la plataforma.

7.2 Construcción de cassettes de expresión para evaluar la actividad de los promotores de *PvMYB200* y *PvMYB700*

7.2.1 Organización de los fragmentos designados como *promPvMYB200* y *promPvMYB700*.

El análisis de la secuencia del 5'UTR de *PvMYB200* y *PvMYB700* anotada en la plataforma Phytozome, encontró que la secuencia 5'UTR contiene un intrón de 321 y 827 pb, respectivamente. La presencia de intrones en el 5'UTR fue reportada en un análisis bioinformático del genoma de *A. thaliana* donde encontraron que de 18,812 secuencias 5'UTR analizadas, 3,738 de estas contienen un intrón, localizado próximo al codón de inicio y cuya longitud promedio es de 316 pb y pudiera contener elementos de regulación de la tasa de transcripción (Chung y cols., 2006). Por lo que en este trabajo se decidió analizar la actividad de promotor de los fragmentos de 2,627 pb y 3,193 pb, constituidos por 2000 pb río arriba del TSS y la secuencia 5'UTR genes *PvMYB200* y *PvMYB700*, respectivamente, designados como *promPvMYB200* y *promPvMYB700* (Figura 10).

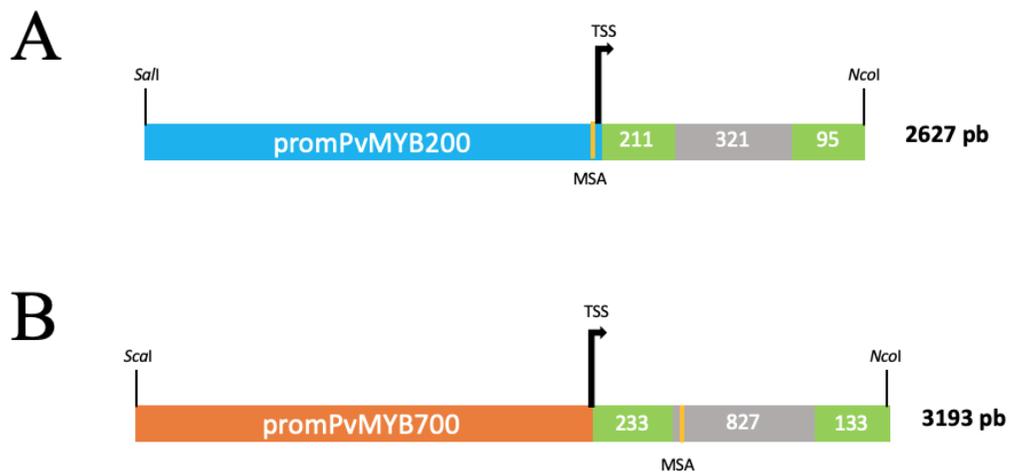


Figura 10. Esquemas de las secuencias designadas como promotor *PvMYB200* (A, *promPvMYB200* de 2627 pb) y promotor *PvMYB700* (B, *promPvMYB700* de 3193 pb). Las secuencias designadas como promotores están constituidas por las secuencias de aproximadamente 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el 5'UTR del gen. La secuencia del 5'UTR de *PvMYB200* y *PvMY700* comprende secuencias exónicas (en verde) e intrónicas (en gris). El 5' UTR está conformado por las secuencias de: A) exón 1 (211 pb), intrón 1 (321 pb) y parte del exón 2 (95 nt de los 627 nt que lo conforman); B) exón 1 (233 pb), intrón (827 pb) y exón 2 (133 pb). El motivo MSA identificado en la secuencia de los promotores está indicado por una barra amarilla, en la posición -112 (*promPvMYB200*) y +246 (*promPvMYB700*, a 12 pb río abajo la unión entre el exón 1 y el intrón 1). Los sitios de las enzimas de restricción *NcoI*, *SalI* y *ScaI* fueron introducidos en el extremo 5' de los pares de oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación por PCR de las secuencias promotoras (ver Anexos Tabla 1).

El análisis de las secuencias *promPvMYB200* y *promPvMYB700* en las plataformas MEME Suite y PlantCARE identificó la presencia de un motivo MSA localizado en las posiciones -112 y +246, respectivamente, tomando en cuenta el TSS anotado en la base de datos del genoma de *P. vulgaris* en la plataforma Phytozome v2.1 (Figura 10; Bucarey-Ruiz, 2021). En el caso de *promPvMYB700*, el MSA está a 12 pb río abajo de la posición de unión entre el exón 1 y el intrón 1 (Figura 10; Bucarey-Ruiz, 2021).

7.2.2 Clonación de las secuencias *promPvMYB200* y *promPvMYB700* en pBGWFS7

Debido a las dificultades para amplificar y clonar las secuencias de los promotores, se diseñó una estrategia basada en seccionar la secuencia promotora en dos fragmentos, para lo cual se les introdujo un sitio *XbaI* para su posterior ensamblaje mediante ligación (Figura 11A). Esta estrategia involucró varias etapas de amplificación por PCR con oligonucleótidos promotor-específicos, cuyos extremos incluyen la secuencia de los correspondientes sitios de restricción utilizados (ver Anexos Tabla 1 y 2; Figura 11B) y la clonación de los productos de PCR en pENTR™/D-TOPO de manera independiente.. La nomenclatura de los plásmidos que portan los fragmentos de *promPvMYB700* generados es la siguiente: pENTR-

promPvMYB700 *ScaI-XbaI* (porta 1570 pb del extremo 5' de promPvMYB700) y pENTR-promPvMYB700 *XbaI-NcoI* (porta 1498 pb del extremo 3' de promPvMYB700). La secuenciación de estos plásmidos confirmó su identidad.

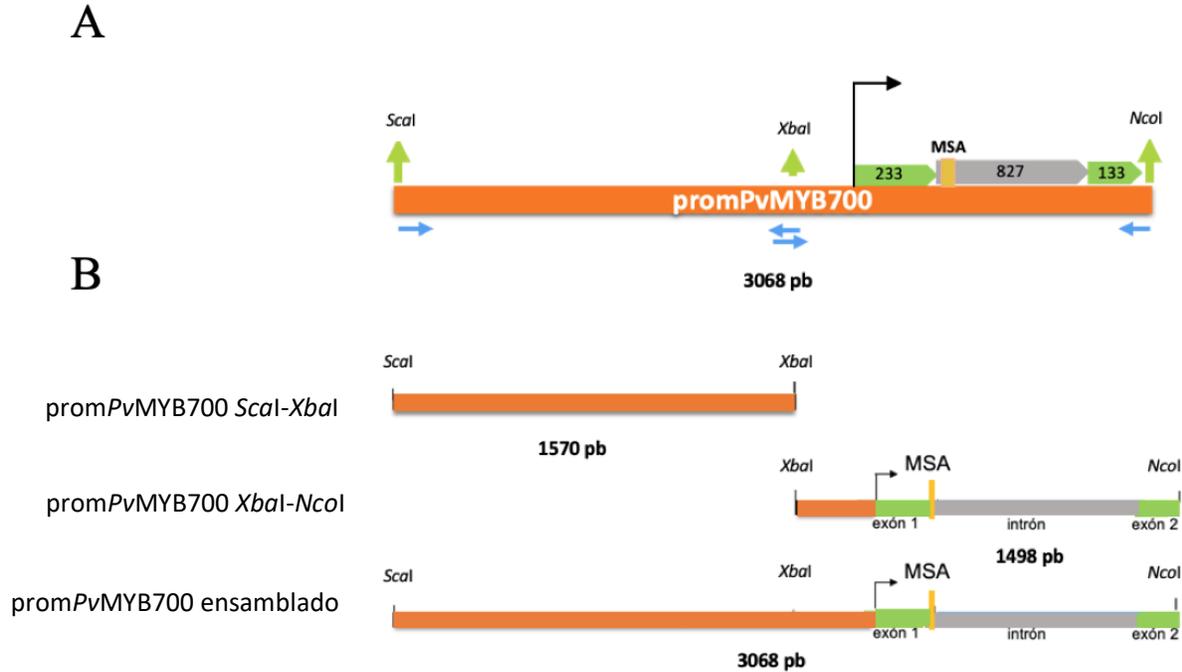


Figura 11. Representación esquemática del ensamblaje de promPvMYB700. A) Esquema de promPvMYB700, donde se indica la posición del sitio *XbaI* utilizado en la estrategia de ensamblaje (en rojo, -308 pb río arriba del TSS), así como la posición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de promPvMYB700. B) Fragmentos de promPvMYB700 generados por PCR: promPvMYB700 *ScaI-XbaI*, que corresponde a 1570 pb del extremo 5' de promPvMYB700; promPvMYB700 *XbaI-NcoI*, que corresponde a 1498 pb del extremo 3' de promPvMYB700; y promPvMYB700 ensamblado, que corresponde a la ligación de los fragmentos promPvMYB700 *ScaI-XbaI* y promPvMYB700 *XbaI-NcoI* previamente digeridos con *XbaI*. Se indica la posición de los sitios *ScaI*, *NcoI* y *XbaI* introducidos en los extremos 5' de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR según corresponda. Oligonucleótidos utilizados, flechas en azul; TSS, flecha en negro; motivos MSA en amarillo; pb, tamaño de los fragmentos esquematizados; todos los esquemas están a la misma escala.

El alineamiento entre las secuencias promPvMYB700 *ScaI-XbaI* y Phvul.009g106700, reveló que en promPvMYB700 *ScaI-XbaI* hay una secuencia de 59 pb (5'-

ATTTTTGTAAATTAAATTATTATATTTTTTAAAGTTTAATCTTATTTTATTGAAGTT
TTTT-3'; posiciones 1112 y 1171 con respecto al sitio *ScaI*; ver Anexos Figura 3) no presente en la secuencia Phvul.009g106700; así mismo, en la posición 828 de *promPvMYB700 ScaI-XbaI* faltan 140 pb que están presentes en la secuencia Phvul.009g106700 (5'-GGATGGTTTGAAAAATAGTGCATAATCAATTATGAAGTTACAGACAAAAAGTT
AATAATCGATTATGGATGATTATGTATGAAAAATTAAGGAAAATTGTATAATTT
TTAAGTTGTAAAATGTAATCTCCCCTAAATCTT-3'; ver Anexos Figura 3).

El ensamblaje de los fragmentos *promPvMYB700 ScaI-XbaI* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI*, se hizo por la digestión de pENTR-*promPvMYB700 ScaI-XbaI* y pENTR-*promPvMYB700 XbaI-NcoI* (clonas 4 y 2, respectivamente) con los pares de enzimas *ScaI - XbaI*, y *XbaI - NcoI*- fosfatasa alcalina FastAP, respectivamente (Figura 12). Posteriormente se purificaron los fragmentos de DNA de 1.5-1.6 kb correspondientes y la posterior defosforilación del fragmento *promPvMYB700 XbaI-NcoI* con la fosfatasa alcalina FastAP.

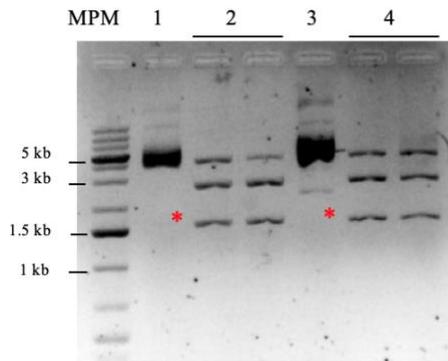


Figura 12. Análisis electroforético de plásmidos pENTR-*promPvMYB700 ScaI-XbaI* y pENTR-*promPvMYB700 XbaI-NcoI* digeridos con enzimas de restricción. Carriles: 1 y 2, pENTR-*promPvMYB700 ScaI-XbaI*, sin digerir (1) y digerido con *ScaI* y *XbaI* (2). Carriles 3 y 4, pENTR-*promPvMYB700 XbaI-NcoI* sin digerir (3) y digerido con *XbaI* y *NcoI* (4). En carriles 2 y 4, las bandas de aproximadamente 5.0 kb, 3.0 kb y 1.5-1.6 kb corresponden a los plásmidos linealizados (digestión parcial), al fragmento de plásmido al que se le escindió el fragmento de interés, e insertos de interés, *promPvMYB700 ScaI-XbaI* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (marcados con asterisco en

rojo en carriles 2 y 4), respectivamente. Las digestiones se realizaron a 37°C por 15 min, con inactivación a 75°C por 20 min. MPM, marcador de peso molecular (GeneRuler™1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

Posteriormente se montó una reacción de ligación de los fragmentos *promPvMYB700 ScaI-XbaI* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI*, cuyo producto fue utilizado como templado en una reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos *pPvMYB700 Fw ScaI* y *pPvMYB700 Rv NcoI* (ver Anexos Tabla 1), para amplificar el producto de la ligación. Como se muestra en la figura 13, el tamaño del fragmento amplificado (de aproximadamente 3 kb) corresponde al de *promPvMYB700* ensamblado, por lo que se procedió a su clonación en *pENTR™/D-TOPO* y transformación en *E. coli*. La secuenciación del plásmido *pENTR-promPvMYB700*, extraído de la clona 12, confirmó la identidad de secuencia del inserto.

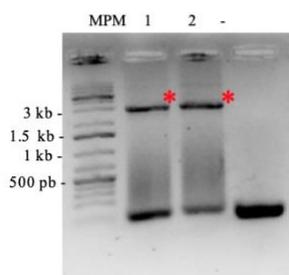


Figura 13. Análisis electroforético de productos de la amplificación por PCR usando como templado la mezcla de ligación de *promPvMYB700 ScaI-XbaI* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (*promPvMYB700* ensamblado). En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos *pPvMYB700 Fw ScaI* y *pPvMYB700 Rv NcoI*, la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase y 5 µL (carril 1) o 10 µL (carril 2) de la reacción de ligación. Carril -, control negativo (reacción sin templado). El tamaño del producto de PCR esperado es de 3 kb. Las condiciones de PCR fueron: 98°C/2 min, 98°C/10 segundos, 55°C/30 segundos y 72°C/3 min (30 ciclos). MPM, marcador de peso molecular (GeneRuler™1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

Por otro lado, el disponer del plásmido *pENTR-promPvMYB700 XbaI-NcoI*, cuyo inserto es una versión corta (1498 pb del extremo 3' de *promPvMYB700*, Figura 11) del promotor

*Pv*MYB700 (3068 pb), brindó la oportunidad de realizar un análisis comparativo entre la actividad de *promPv*MYB700 y *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I, por lo que ambos promotores fueron clonados por recombinación en el vector de expresión en plantas pBGWFS7. Los plásmidos resultantes fueron designados como pBGWFS7-*promPv*MYB700 (clonas 1-3) y pBGWFS7-*promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I (clonas 3-6), respectivamente, y posteriormente electroporados en la cepa *Agrobacterium rhizogenes* K599 para la generación de raíces pilosas en *P. vulgaris*. La técnica de PCR en colonia se utilizó para la identificación y selección de clonas *A. rhizogenes* K599 que portan pBGWFS7- *promPv*MYB700 (clonas 1.7-1.9 y 1.11-1.15) o pBGWFS7- *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I (clonas 3.7-3.10).

Respecto a la secuencia *promPv*MYB200, es importante precisar que aunque se logró amplificar y clonar el fragmento *promPv*MYB200 *Xba*I-*Nco*I en pENTR™/D-TOPO (ver Anexos Figura 4), no se logró amplificar el fragmento *promPv*MYB200 *Sa*II-*Xba*I, correspondiente al extremo 5' de *promPv*MYB200. Por ende, la caracterización de la actividad de *promPv*MYB200 será realizada en el contexto de un proyecto independiente a esta tesis. Por lo que a partir de este punto, sólo se reportarán los resultados que corresponden a la caracterización de la actividad de *promPv*MYB700 y *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I.

7.3 Evaluación de la actividad de *promPv*MYB700 y *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris*

Para determinar la eficiencia de las clonas de *A. rhizogenes* K599 que portan las versiones de *promPv*MYB700 para generar raíces pilosas (“hairy roots”), se inocularon lotes de 5 plántulas de *P. vulgaris* con cada clona. A los 12-15 días post-inoculación (dpi), se encontró que sólo una clona (3.7) de *A. rhizogenes* K599 pBGWFS7-*promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I fue capaz de generar raíces pilosas de manera reproducible. Mientras que la eficiencia de las clonas 1.7-1.9, 1.11 y 1.13 de *A. rhizogenes* K599 pBGWFS7-*promPv*MYB700 en la

generación de raíces pilosas no fue reproducible, lo que posiblemente se debe a una inestabilidad de las clonas de *A. rhizogenes* K599 que portan esta construcción. Por tal razón, para los ensayos posteriores se optó por inocular raíces con clonas de *A. rhizogenes* K599 pBGWFS7-promPvMYB700 provenientes de nuevos eventos de electroporación y selección por PCR en colonia.

La actividad de ambos promotores en raíces transgénicas de *P. vulgaris* se visualizó por la técnica histoquímica de actividad GUS (véase Materiales y Métodos), lo cual permitió el análisis de la expresión espacio-temporal del promotor. El desarrollo del precipitado azul, resultante de la actividad GUS, fue monitoreado a diferentes tiempos por observación de las raíces por estereomicroscopía, lo que facilitó que la reacción fuera detenida de manera oportuna, para de inmediato proceder al aclarado de las raíces y posteriormente captura de imágenes.

Para la interpretación de las imágenes de las raíces de *P. vulgaris* con actividad de GUS, se utilizó como referencia la descripción anatómica de la raíz de la planta modelo *A. thaliana* (Figura 14; Benfey y cols., 2010), en la que se identifican 4 zonas: el meristememo apical de la raíz, que se define como una región de constante proliferación celular; la zona de transición, en la que hay una menor probabilidad de encontrar células en división porque las células comienzan a elongarse; la zona de elongación, en la cual las células aumentan su longitud entre 10 a 20 veces (Ivanov & Dubrovsky, 2013); y la zona de diferenciación, donde las células adquieren características específicas, como la formación de pelos radicales y de raíces laterales (Svolacchia y cols., 2020).

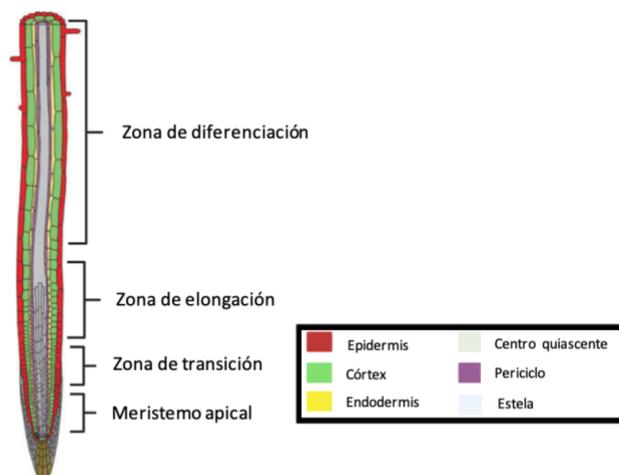


Figura 14. Esquema ilustrativo de la anatomía de la raíz en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se ilustran las zonas que corresponden al meristemo apical de la raíz, la zona de elongación, zona de diferenciación, así como los tejidos que conforman la raíz. En el recuadro se indica el código de colores utilizado. Tomada de Benfey y cols., 2010.

El análisis de las raíces transgénicas de *P. vulgaris* reveló que *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* presentan una actividad similar. Ambos son activos en el meristemo apical de la raíz y, aparentemente, en la zona de transición, sin que se detecte actividad en la zona de elongación de la raíz, ni en la zona de la vasculatura de la raíz (Figura 15).

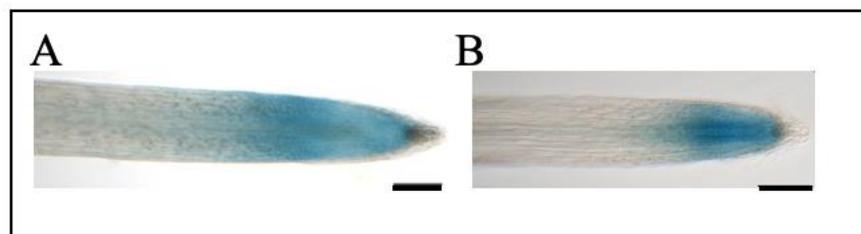


Figura 15. Análisis de la actividad de GUS en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* que expresan los cassettes *promPvMYB700* (A) y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (B). Imágenes de esteromicroscopía representativas de la actividad de estos promotores en las que se observa que ambos promotores son activos en el meristemo apical de la raíz y, potencialmente, en la zona de transición (Figura 14). Las barras corresponden a 100 μ m.

En la zona de diferenciación de la raíz transgénica de *P. vulgaris*, la actividad espacio-temporal de *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* se detecta asociada a etapas del desarrollo de un primordio de raíz lateral (LRP por las siglas en inglés de Lateral Root Primordium; Figura 16). Si bien el proceso de formación del LRP en esta leguminosa aún no ha sido descrito de manera detallada, las características anatómicas previamente descritas en el grupo de trabajo (Monroy-Morales y cols., 2022; Dávila-Delgado y cols., 2023) sugieren que, en términos generales, el desarrollo de raíces laterales en *P. vulgaris*, es similar al descrito en la planta modelo *A. thaliana* y en raíces de otras angiospermas (Malamy & Benfey, 1997; Torres-Martínez y cols., 2019). La formación de un LRP en *A. thaliana* es un proceso que involucra una serie de eventos de división celular (Figura 16E), que comienzan con la reactivación del ciclo celular de las células del periciclo, conocidas como células fundadoras, para dar lugar a una división anticlinal (etapa I). Desafortunadamente, el grosor de la raíz de *P. vulgaris* impide distinguir si las células del periciclo en división presentan actividad de *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI*.

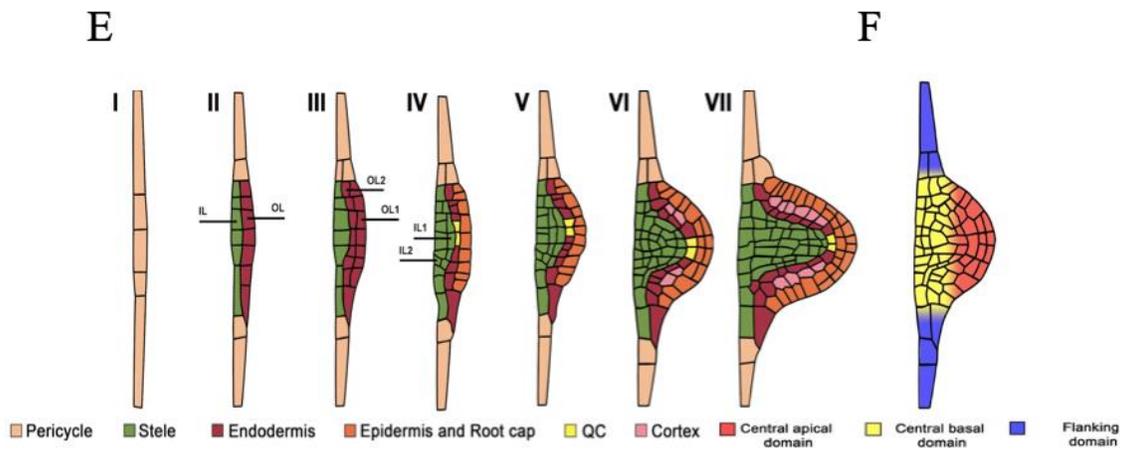
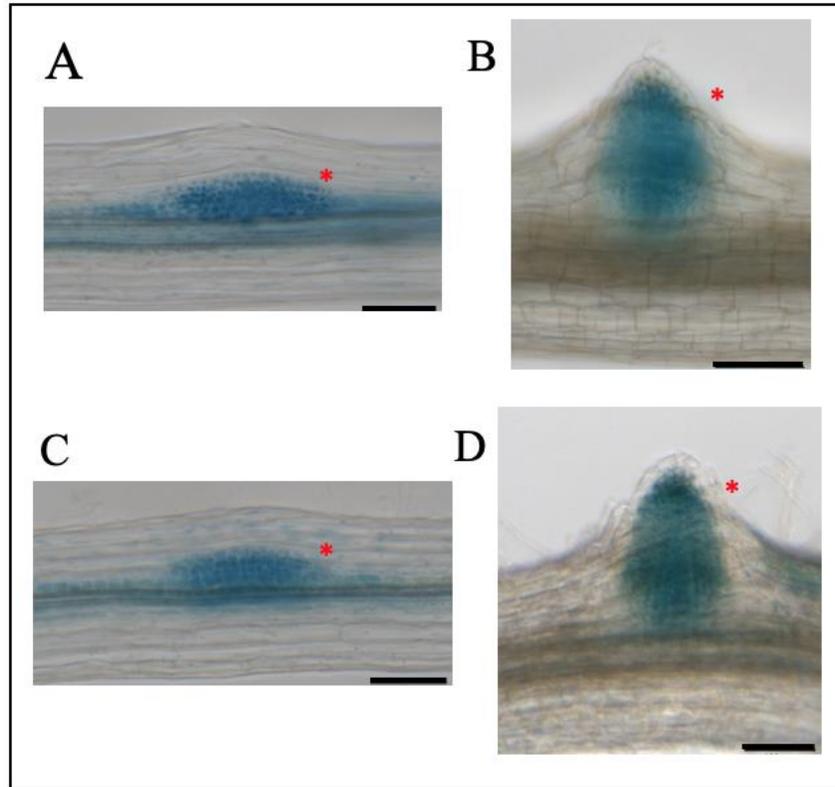


Figura 16. Análisis de la actividad espacio-temporal de *promPvMYB700* (A y B) y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (C y D) en la formación de raíces transgénicas laterales de *P. vulgaris*. Imágenes representativas de la actividad de los promotores en las que se observa que ambos promotores son activos en las células del primordio de raíz lateral (LRP) en formación (indicado con *), tentativamente en las etapas IV-V (A y C) y VI-VII (B y D), respecto a lo descrito en raíces de *Arabidopsis thaliana* (E). Esquema de los dominios central basal y central apical del LRP de *A. thaliana* (F). OL e IL, siglas en inglés de Outer Layer e Innner Layer, respectivamente. E, esquema tomado de Torres-Martínez y cols., 2019 (basado en la descripción de Benfey y Malamy, 1997). F,

modificado de Torres-Martínez y cols., 2019. Imágenes capturadas con estereomicroscopio (Olympus MVX10). Las barras corresponden a 100 μ m.

En la formación del LRP en *A. thaliana*, la segunda ronda de división es periclinal y genera una estructura de dos capas celulares, interna y externa (IL y OL, siglas del inglés Outer Layer e Inner Layer, respectivamente; etapa II). Las subsecuentes rondas de divisiones, anticlinales o periclinales, favorecen que el LRP naciente tenga una forma de domo, en el que se distinguen mas de cuatro capas celulares (etapas III-V; Figura 16E). En las figuras 16A y 16 C se observa actividad histoquímica de GUS en las cuatro o cinco capas celulares en división, lo que indica que en las raíces de *P. vulgaris* los promotores *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* son activos en las células de primordios de LRP (etapas III-V). Durante las etapas VI y VII de la formación del LRP en *A. thaliana*, se generan nuevas capas celulares internas y el primordio pasa a tener una organización tisular en la que se distinguen los dominios central apical y central basal (Figura 16F; Malamy & Benfey, 1997; Dubrovsky y cols., 2000; Torres-Martínez y cols., 2019). Por último, el LRP emerge de la raíz y la zona apical del LRP se activa para constituir el meristemo apical de la raíz lateral en crecimiento (Vilches-Barro & Maizel, 2015). Ambas versiones del promotor *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* son activos en las células que conforman los dominios central apical y central basal del LRP de *P. vulgaris* (Figuras 16B y 16D) cuyo desarrollo equivale a las etapas VI o VII ilustradas en la figura 16F.

En la raíz lateral en desarrollo (Figura 17), ambos promotores *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* se encuentran activos en el ápice de la raíz en formación, así como en lo que tentativamente es la provasculatura de la raíz lateral naciente.

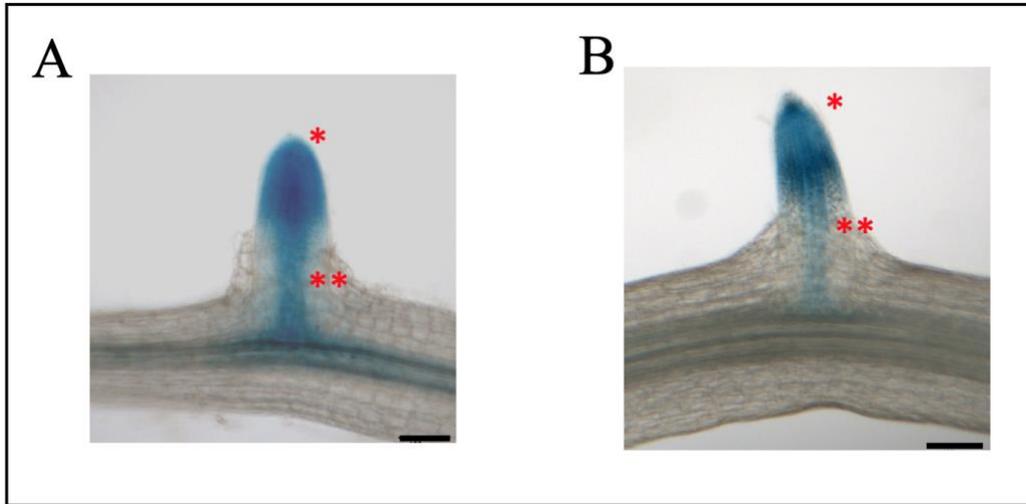


Figura 17. Análisis de la actividad espacio-temporal de *promPvMYB700* (A y B) y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (C y D) en raíces laterales de *P. vulgaris* en desarrollo. Imágenes representativas de la actividad de estos promotores en las que se observa que ambos promotores son activos en el ápice de la raíz lateral emergente (indicado con *), así como en la futura vasculatura (indicado con **). Imágenes capturadas con estereomicroscopio (Olympus MVX10). La barra corresponde a 100 μm .

7.4 Evaluación de la actividad de *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *R. etli* CE3 pMP604.

Para analizar la actividad de las versiones completa (*promPvMYB700*) y corta (*promPvMYB700 XbaI-NcoI*) del promotor del gen *PvMYB700* durante el proceso de nodulación, las raíces transgénicas de *P. vulgaris* que portan una u otra versión del promotor, fueron inoculadas con la cepa *R. etli* CE3 pMP604 (Dávila-Delgado y cols., 2020), cosechándose muestras a diferentes días post-inoculación (7, 14 y 21 dpi).

Como ya se mencionó, los nódulos que se forman en *P. vulgaris* son determinados y su formación tiene origen en la reactivación del ciclo celular en las células corticales subepidermales, adyacentes al sitio de infección (Ferguson y cols., 2010, Monroy-Morales y cols., 2022). Como se observa en la figura 18, ambas versiones del promotor son activos en las células en proliferación, es decir, desde las primeras rondas de división celular (Figura

18A y D) y en las células que conforman el primordio de nódulo (Figura 18B y E), así como en la zona del tejido central y la provascularura del nódulo joven (Figura 18C y F).

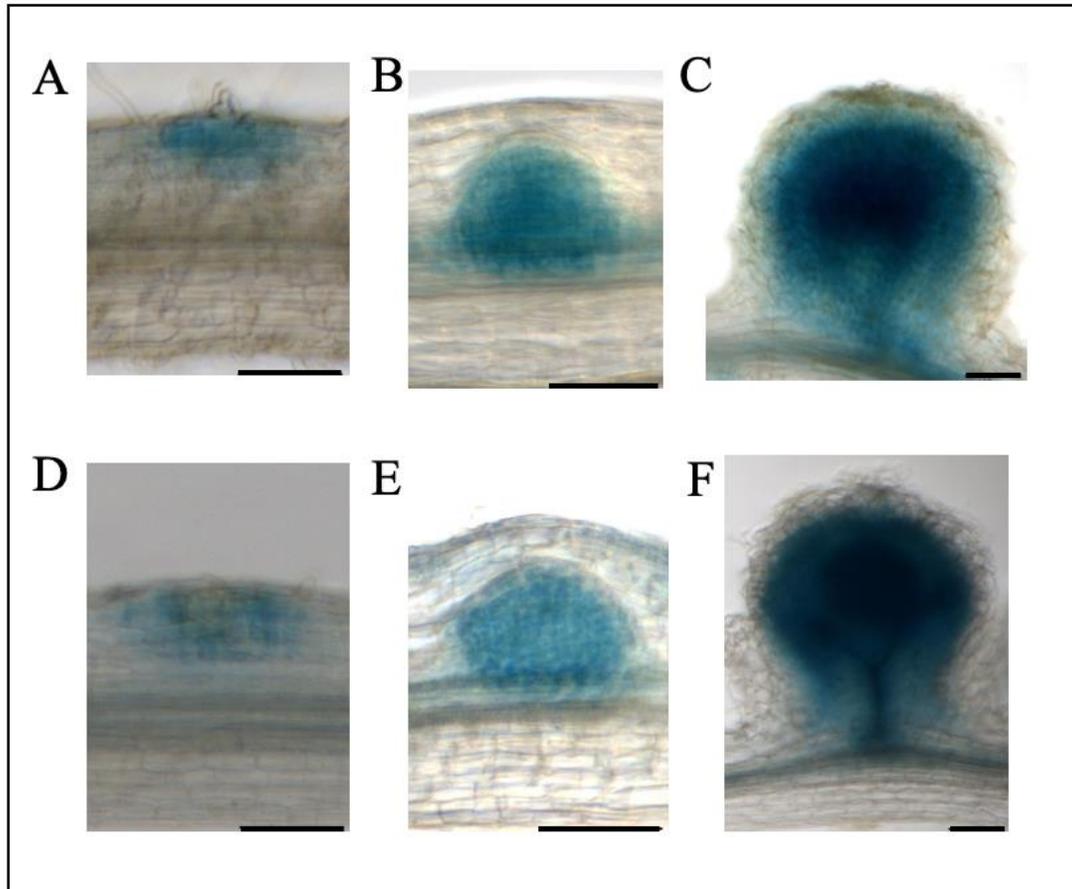


Figura 18. Análisis de la actividad espacio-temporal de *promPvMYB700* (A, B y C) y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (D, E y F) en raíces de *P. vulgaris* inoculadas con *R. etli*. Imágenes representativas de la actividad de estos promotores. En los paneles B y E se observa la actividad promotora durante la formación del primordio de nódulo, mientras que en los paneles C y F se muestra la actividad promotora se observa en el nódulo joven y lo que parece ser tejido central de este. Las barras corresponden a 100 μm .

En los nódulos maduros, la actividad de ambos promotores se limita a la vasculatura del nódulo (Figuras 19A y D). No se observa actividad de estos promotores en el tejido central (Figura 19), el cual está constituido, principalmente, por células no proliferativas, en su mayoría células infectadas, intercaladas por algunas células no infectadas (Sánchez-López y cols., 2011).

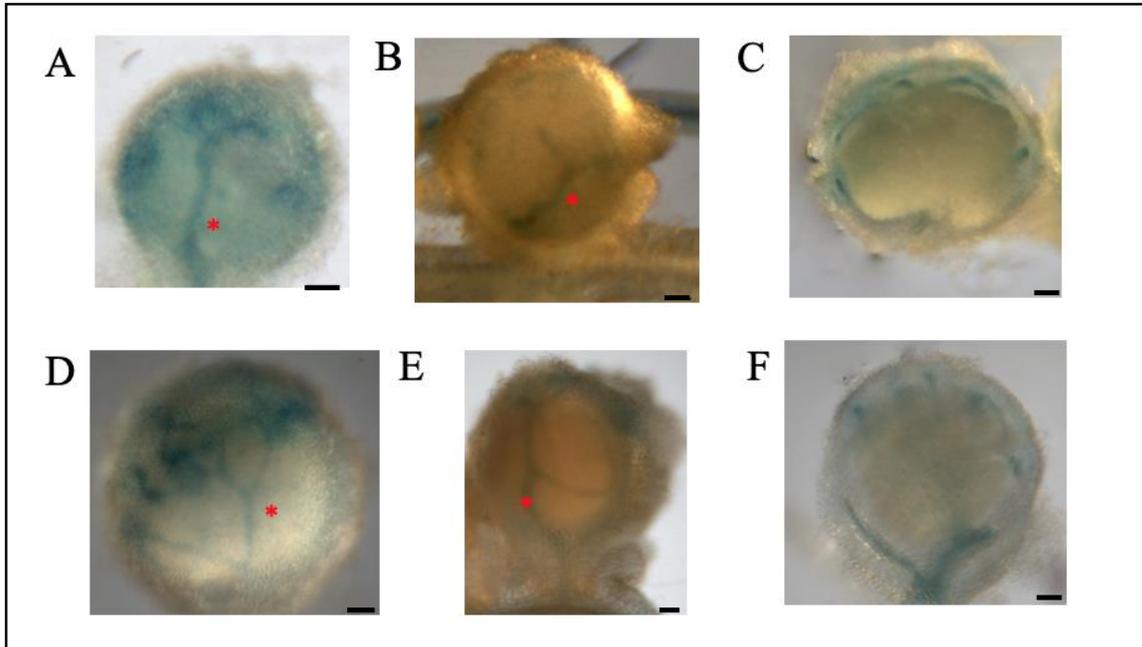


Figura 19. Análisis de la actividad espacio-temporal de *promPvMYB700* (A, B y C) y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* (D, E y F) en nódulos de *P. vulgaris* de 21 dpi. C y F, corte longitudinal de nódulos donde se observa el tejido central. Imágenes representativas de la actividad de estos promotores en las que se observa que su actividad promotora se limita a la vasculatura del nódulo (indicado con *). Las barras corresponden a 100 μm.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el promotor del gen *PvMYB700* y su versión corta (*promPvMYB700 XbaI-NcoI*) presentan la misma actividad espacio-temporal, específica de las células mitóticas del LRP y el ápice de raíz de *P. vulgaris*, así como en las etapas de formación del primordio de nódulo y en la vasculatura del nódulo. Y resalta que *promPvMYB700 XbaI-NcoI* es suficiente para conferir tal especificidad en la actividad espacio-temporal.

7.5 Análisis de la citolocalización de YFP-*Pv*MYB700 en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris*.

En el contexto del análisis de la citolocalización de las proteínas MYB-R3 en *A. thaliana* y *N. benthamina*, se utilizaron vectores de expresión de quimeras en las que la proteína reportera fluorescente estaba fusionada a la región N- o C-terminal del MYB-R3 de interés (Cai y cols., 2011; Tominaga-Wada & Wada, 2016; Wang y cols., 2018; Okumura y cols., 2021; Gao y cols., 2022; Zhu y cols., 2023). En esta tesis se decidió fusionar la proteína YFP al extremo N-terminal de la secuencia codificante *Pv*MYB700 para generar YFP-*Pv*MYB700 cuya expresión queda bajo la regulación de *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I.

7.5.1 Construcción del vector de expresión *promPv*MYB700 *Xba*I-*Nco*I::YFP-*Pv*MYB700.

La generación de esta construcción implicó varias etapas (Figura 20), incluyendo la amplificación por PCR de los 2967 pb de secuencia codificante del gen *Pv*MYB700 (*Pv*MYB700 cds; Figura 20A), utilizando como templado cDNA total de ápice de raíz de *P. vulgaris* y los pares de oligonucleótidos específicos *Pv*MYB700 Fw 2 y *Pv*MYB700 Rv (ver Anexos Tabla 3). El producto de PCR fue clonado en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO y, posteriormente, recombinado en el vector de expresión en plantas pEarleyGate 104, que permite la fusión traduccional entre la secuencia codificante de la proteína fluorescente YFP (siglas en inglés de Yellow Fluorescent Protein) y una proteína de interés, que en este caso *Pv*MYB700, para generar el plásmido pEarleyGate 104-YFP-*Pv*MYB700 (Figura 20B). La secuenciación de las clonas (12) confirmó la identidad del inserto recombinado, por lo que fue utilizada para los siguientes pasos de clonación. En esta construcción, la expresión

de la proteína YFP-*PvMYB700* quedó bajo el control del promotor de expresión constitutiva *prom35S* del virus del mosaico de la coliflor (CMV, por sus siglas en inglés; Bhullar y cols., 2007). La sustitución de *prom35S* por *promPvMYB700 XbaI-NcoI* requirió de etapas adicionales de clonación para generar la construcción *promPvMYB700 XbaI-NcoI::YFP-PvMYB700*, como se ilustra en la figura 20B. La posición de los oligonucleótidos utilizados para confirmar la identidad de insertos en cada paso de clonación se indica en la figura 20A.

A



B

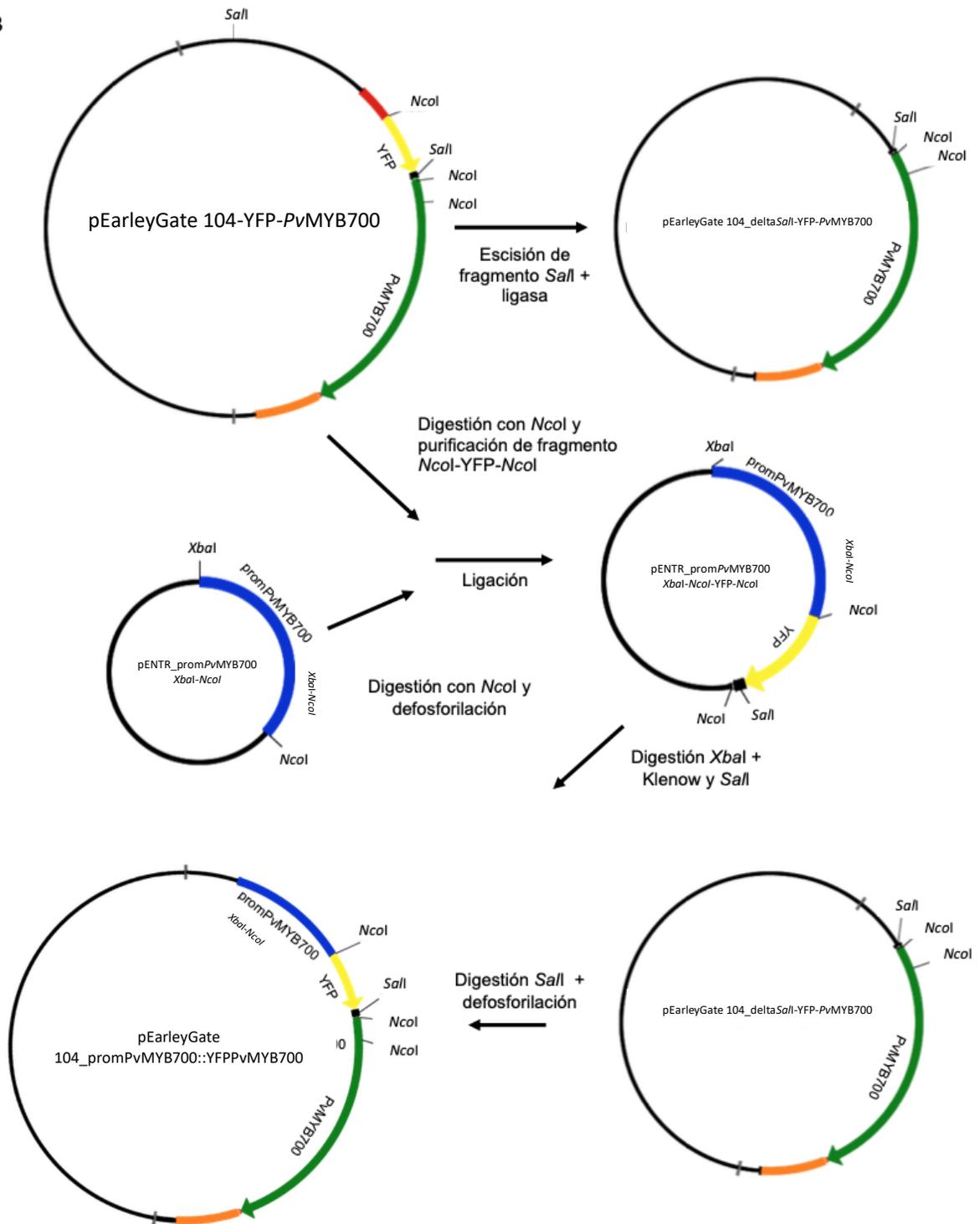


Figura 20. Estrategia para la construcción de *prom700XbaI-NcoI::YFP-PvMYB700*. A) Representación de la cds del gen *PvMYB700*. Se indica la posición y direccionalidad de los oligonucleótidos cDNA-específicos utilizados para amplificar por PCR la secuencia codificante de 2967 pb y para la secuenciación de plásmidos generados en las diferentes etapas de construcción. La secuencia de los oligonucleótidos está descrita en Anexos, Tabla 1, con la siguiente nomenclatura: Fw2, *PvMYB700* Fw 2; Fw3, *PvMYB700* Fw3 cds; Fw4 *PvMYB700* Fw4 cds; Rv, *PvMYB700* Rv; Rv2, *PvMYB700* Rv2; Rv3, *PvMYB700* Rv3 cds. B) Descripción de las diferentes etapas de clonación para substituir el promotor 35S presente en el vector pEarleyGate 104-YFP-*PvMYB700* por la secuencia de *promPvMYB700 XbaI-NcoI* para generar la construcción pEarleyGate 104 *promPv700XbaI-NcoI::YFP-PvMYB700*. Se indica la posición de los sitios de restricción *SalI*, *XbaI* y *NcoI* en los diferentes plásmidos.

7.5.2 Análisis de la citolocalización de YFP-*PvMYB700* expresada en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* bajo la regulación de *promPvMYB700XbaI-NcoI*.

Las raíces pilosas, generadas por transformación mediada por clonas de *A. rhizogenes* K599 que portan pEarleyGate 104 *promPv700XbaI-NcoI::YFP-PvMYB700*, fueron preseleccionadas por epifluorescencia, para luego ser analizadas por microscopía confocal. Las imágenes preliminares muestran la detección de fluorescencia en diferentes células de la zona de alta proliferación del meristemo apical de la raíz (Figura 21).

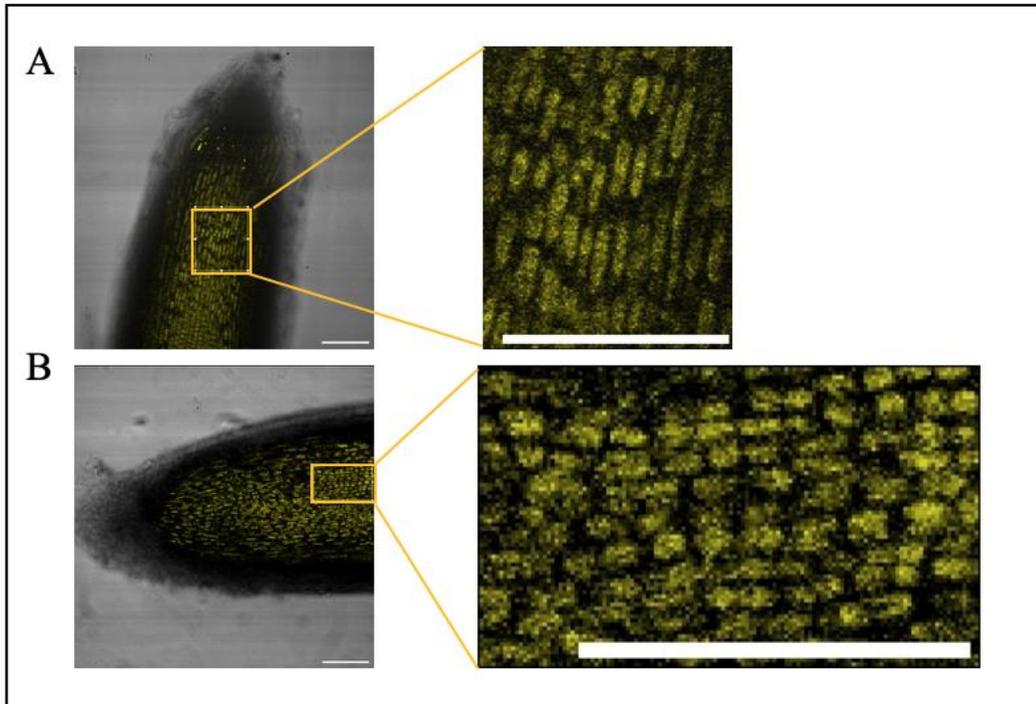


Figura 21. Imágenes representativas del análisis de la expresión de YFP-*PvMYB700* por microscopía confocal *in vivo* de 2 raíces transgénicas independientes de *P. vulgaris*. Las imágenes (A y B) corresponden a cortes ópticos capturados con el microscopio confocal Olympus FV100 invertido del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada en el Instituto de Biotecnología-UNAM, con el objetivo 20X0.75 y utilizando un zoom digital 2X. Los recuadros corresponden a una magnificación digital de la zona la zona delimitada con rectángulo en naranja. Las barras corresponden a 100 μm .

Por otro lado, aún cuando las imágenes obtenidas no tienen la resolución suficiente para determinar con precisión la localización subcelular, la señal de YFP-*PvMYB700* parece estar distribuida en citoplasma y, aparentemente en diferentes organelos. La determinación precisa de su distribución corresponderá a un futuro proyecto, en el que se optimizarán las condiciones de microscopía confocal que brinden imágenes de mayor resolución y reproducibilidad, así como el uso de marcadores de núcleo.

8. DISCUSIÓN

En eucariotes, el ciclo celular es un programa finamente coordinado por una serie de mecanismos moleculares que median la progresión, unidireccional, entre las etapas o fases que lo conforman (G1, S, G2, M y citocinesis). Este programa está regulado por la actividad etapa-específica de cinasas dependientes de ciclinas, su unión a la ciclina blanco, la expresión y activación de una gama de factores de transcripción, la expresión temporal de genes específicos de cada etapa y eventos de fosforilación, entre otras (Carneiro y cols., 2021; Fischer y cols., 2022; Sablowski & Gutiérrez, 2022).

Estos mecanismos también están presentes en plantas, por ejemplo, en la transición G1/S, la activación del complejo formado por RBR, factores de transcripción E2F (a y b) y DP (RBR/E2Fa/b-DP; Qi & Zhang, 2020), está mediada por la fosforilación e inactivación de RBR (RBR-P) por el complejo CDKA/CYCD, en consecuencia, el complejo transcripcional E2Fa/b-DP se activa y promueve la transición hacia la fase S, activando genes asociados a la regulación del ciclo celular, replicación del DNA y a la dinámica de la cromatina (Desvoves y cols., 2014); en el caso de la fase G2/M la expresión está regulada por CDKA, CDKB, CYCB y factores de transcripción de tipo MYB-R3 (Ito y cols., 1998; Ito y cols., 2001).

Con el propósito de caracterizar los genes de *P. vulgaris* tipo MYB-R3 en la división celular en las etapas iniciales de la nodulación en *P. vulgaris*, en este trabajo se planteó el análisis de la actividad promotora de dos genes MYB-R3, *PvMYB200* y *PvMYB700*, identificados en el genoma de esta leguminosa (Figuras 15-17), así como la descripción de sus características estructurales (Figuras 7-9) y un análisis preliminar de la distribución subcelular de YFP- *PvMYB700* (Figura 21).

La estrategia inicial para la identificación de genes etapa-específica del ciclo celular en plantas se basó en un estudio de células de *A. thaliana* en cultivo, cosechadas a diferentes tiempos post-sincronización con afidicolina (Menges y cols., 2005). En la fase G1 se acumulan los transcritos de ciclinas de tipo D, en la etapa S se acumulan los mRNA de ciclinas de tipo A, mientras que en la transición de las fase G2/M fueron 82 los transcritos identificados, incluyendo los genes FT MYB-R3 (Menges y cols., 2005). El conjunto de genes G2/M se caracteriza por la presencia de elementos reguladores en *cis* denominados MSA (Ito y cols., 1998; Menges y cols., 2005). Los potenciales ortólogos de los genes G2/M en *P. vulgaris* también portan motivos MSA (Bucarey-Ruiz, 2021). El papel de los FT MYB-R3 se ha dilucidado a partir del estudio de mutantes en *A.thaliana*; el análisis de la doble mutantes *myb3r1/myb3r4*, resultó en la disminución de transcritos de genes asociados a fase G2/M, como los son: *CYCA1;1*, *CYCB2;1*, *CYCB1;2*, *CYCB1;4*, *CDC20.1* y *KNOLLE*, así como un fenotipo de citocinesis defectuosa; mientras que la mutante simple *myb3r4* presenta un fenotipo similar, si bien menos acentuado. En contraste, la mutante simple *myb3r1* no presenta aparentemente alteración en el nivel de transcritos de genes mitóticos, ni de la citocinesis, (Haga y cols., 2007). Por otro lado, la doble mutante *myb3r3/myb3r5*, aunque presenta un aumento en los niveles del transcrito de los genes *CYCB1;1*, *CYCB1;2*, *CDC20.1* y PLEIADE (PLE/MAP65-3; proteína asociada a microtúbulos), la citocinesis no se ve alterada, pero presenta un fenotipo de células alargadas, con raíces, hojas, semillas y embriones de un mayor tamaño; la triple mutante *myb3r1/myb3r3/myb3r5* presenta un fenotipo similar al de *myb3r3/myb3r5*, pero con una mayor acumulación de los niveles de transcritos de los genes G2/M (Kobayashi y cols., 2015). En el mismo estudio, se indica que el nivel de transcritos de genes mitóticos no se altera en la triple mutante

myb3r4/myb3r3/myb3r5 (Kobayashi y cols., 2015). Los autores de estos trabajos sugieren que *AtMYB3R4* es un regulador positivo de genes mitóticos, *AtMYB3R3* y *AtMYB3R5* reguladores negativos y *AtMYB3R1* presenta un actividad dual.

Por otro lado, ensayos de tipo "one yeast hybrid" y EMSA han demostrado la interacción de los MYB-R3, *NtmybA1*, *NtmybA1*, *NtmybB*, *MtMY3BR1* (Medtr3g110028) y *OsMYB3R2* con los elementos de regulación en *cis* MSA presentes en los promotores *NtNACK1*, *CatroCYCB*, *AtCDC2A*, *OsCYCB1.1* y el promotor sintético 3xRT1 (Ito y cols., 1998, Ito y cols., 2001; Kato y cols., 2009; Ma y cols., 2009; Gao y cols., 2022).

De acuerdo a Feng y cols. (2017), son cinco los genes MYB-R3 en *A. thaliana*, seis en *N. tabacum*, tres, cuatro y cinco en las leguminosas *L. japonicus*, *P. vulgaris* y *M. truncatula*, respectivamente, los cuales han sido subdivididos en los grupos A, B y C en función de la presencia o ausencia de los motivos 1-4 en el extremo C-terminal (Feng y cols., 2017). De donde, *AtMYB3R1*, *AtMYB3R4*, *PvMYB200*, *PvMYB700* (Figura 6, Anexos Figura 1), *MtMYB3R1* y *Mtedtr1g026870*, que contienen los motivos 1, 2 y 4, pertenecen al subgrupo A, mientras que el subgrupo B está representado por *AtMYB3R2* y *Medtr5g010650*, ya que sólo portan el motivo 2. Las secuencias de *AtMYB3R3*, *AtMYB3R5*, *Phvul010G012500*, *Phvul008G102000*, *Medtr7g061330* y *Medtr7g461410*, que incluyen los motivos 2 y 3, pertenecen al subgrupo C. Las MYB-R3 de las angiospermas contienen los motivos 1-4, mientras que la del musgo *Physcomitrella patens* porta sólo el motivo 2, y las algas carecen de estos motivos (Feng y cols., 2017). La función de los motivos 1-4 aún no ha sido descrita pero no se descarta la posibilidad de que estén involucrados en la unión a complejos de regulación transcripcional. Otra característica distintiva de las MYB-R3 del subgrupo A es

que son proteínas de aproximadamente 110 KDa, mientras que las de los subgrupos B y C, son mas pequeñas (50-62 KDa).

Las proteínas *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* tienen un porcentaje de identidad de 40%, un valor muy similar encontrado al compararlas con *PvMYB200* y *PvMYB700* (38-44%) y llama la atención que entre estas proteínas de *P.vulgaris* hay una identidad de 60% (Tabla 2). El análisis preliminar de búsqueda de potenciales regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) en *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4*, utilizando la herramienta PONDR VSL2 permitió postular la presencia de dos IDR, localizadas en zonas non-MYB, entre el repetido R3 y el motivo 1, y entre los motivos 2 y 4, respectivamente (Figura 9). Por definición, las IDR no presentan una estructura terciaria, sin embargo, se considera que son regiones funcionales con la capacidad de estructurarse al unirse a moléculas blanco (Ahmed y cols., 2022). El uso de algoritmos de este tipo ha permitido revelar que hay un elevado porcentaje de proteínas que presentan IDRs, por ejemplo, el análisis de 6,872 secuencias de FTs con la herramienta PONDR VSL2 reveló que el 84.18% contiene IDRs (Liu y cols., 2006). Por otro lado, utilizando la plataforma de búsqueda de IDRs “DISOPRED2”, se encontró que el 51% de las proteínas en eucariotes contienen regiones desordenadas (Deiana y cols., 2019; Ahmed y cols., 2022); es importante resaltar que estas predicciones *in silico* requieren ser validadas por métodos experimentales, tales como cristalografía de rayos X, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la dispersión de rayos X de ángulo pequeño, el dicroísmo circular y FRET, entre otros (Necci y cols., 2021).

Con respecto a la participación del MYB-R3 *PvMYB700* durante la división celular, la actividad del promotor *PvMYB700*, en sus versiones larga y corta, indican una especificidad en el RAM, así como en las zonas que presentan una raíz lateral en desarrollo y en las

diferentes etapas de la organogénesis del nódulo (Figuras 15-19). Es de resaltar que la versión corta de *promPvMYB700* (*promPvMYB700 XbaI-NcoI*; Figura 11) es suficiente para conferir tal especificidad (Figuras 15-19). El patrón de actividad de ambos promotores indica que la participación del gen MYB-R3 *PvMYB700*, inicia desde las primeras divisiones celulares, las cuales están coordinadas con la infección rizobial epidermal al inicio de la nodulación (Figura 18). La actividad de *PvMYB700* se sostiene durante la formación del primordio de nódulo, del nódulo joven y el desarrollo de la pro-vasculatura del nódulo. La actividad de los promotores de *promPvMYB700* y *promPvMYB700 XbaI-NcoI* fue indetectable en las células no proliferativas del nódulo (células epidermales, corticales y del tejido central del nódulo maduro) confirma la especificidad espacio-temporal de estos promotores en células en división (Figura 18 y 19). Es de mencionar que la actividad del promotor del gen *MtMYB3R1* presenta un patrón semejante al de *PvMYB700* (Gao y cols., 2022).

Un aspecto que refuerza la hipótesis de que *PvMYB700* es específico de ciclo celular, potencialmente, de la transición G2/M y mitosis, es la similitud entre la actividad espacio-temporal de los promotores de los genes *promPvMYB700* y *promPvKNOLLE* (Monroy-Morales y cols., 2022). *KNOLLE* se transcribe en G2/M y es esencial para la formación de la placa celular que inicia en anafase y concluye al final de la citocinesis (Mayer y cols., 1991; Seguí-Simarro y cols., 2004; Touihri y cols., 2011). Si bien, es necesario confirmar que los genes *PvMYB700* y *MtMYB3R1* se transcriben en G2/M, es de considerar que el patrón de actividad de sus promotores es similar al de los genes SYMRK, DMI3/CaCMK, y los factores de transcripción CYCLOPS, ERF, NIN, STY, PLTs, NSP1 y NSP2 entre otros, involucrados en la infección y organogénesis del nódulo (Yano y cols., 2008; Soyano y cols., 2013; Soyano

& Hayashi, 2014; Franssen y cols., 2015; Cerri y cols., 2017; Roy y cols., 2020; Batzenschlager y cols., 2023; Dávila y cols., 2023; Gao y cols., 2024). Varios de estos FTs participan en redes transcripcionales que regulan la nodulación, entre las cuales se encuentran, SHR-SCR-LBD16, MYB-AUR1-MAP65 (Dong y cols., 2021; Gao y cols., 2024), lo que permite plantear la posibilidad de que los genes MYB-R3 pudieran tener una función en estas redes transcripcionales, es decir, en la activación de genes que regulan la maquinaria de transcripción de los genes CaCMK, CYCLOPS, ERF, NIN y STY, entre otros, al inicio de la nodulación.

Otro aspecto que también resulta plausible considerar, es el uso de *promPvMYB700*, en particular *promPvMYB700 XbaI-NcoI*, para expresar RNAi o proteínas involucradas en más de una etapa de la nodulación, por ejemplo en la infección y división celular, entre los que se encuentran SYMRK, NIN, DMI3/CaCMK. Con esta estrategia podría abordarse el análisis funcional de estas proteínas en el contexto de la división celular.

Por su función de factor de transcripción, se hipotetiza que *PvMYB700* tiene una citolocalización nuclear. Los ensayos de citolocalización de YFP-*PvMYB700*, expresada bajo el control de *promPvMYB700 XbaI-NcoI*, aportan información preliminar en esa dirección (Figura 21). El análisis se centró en la zona apical de raíces transgénicas de *P. vulgaris* y, si bien la señal de YFP-*PvMYB700* mostró una baja intensidad, fue posible determinar una localización específica en células proliferativas. Sin embargo, no fue posible confirmar la citolocalización de YFP-*PvMYB700* en núcleo. Es de mencionar que la citolocalización de *MtMYB3R1* y *MYB3R1* de *Triticum aestivum* L fue analizada en hoja de *N. benthamiana* y epidermis de cebolla, respectivamente (Cai y cols., 2011; Gao y cols., 2022), mientras que la demostración de la citolocalización nuclear de *AtMYB3R1* en un

tejido tan complejo como el ápice de raíz demandó el uso del cassette gMYB3R1-NLS-3xeGFP (Wang y cols., 2018). De dónde, la coexpresión de una quimera tipo 3xYFP-*PvMYB700* y un marcador nuclear tipo NLS-GFP pudiera brindar la posibilidad de confirmar la citolocalización nuclear de *PvMYB700* en raíces de *P. vulgaris* pre- y post-inoculadas con rizobia. Otro aspecto importante a tomar en cuenta, es la temporalidad de la expresión de *PvMYB700* ya que la síntesis y degradación de los FT que regulan el ciclo celular se restringen a una fase-específica del ciclo celular (Desterro y cols., 2000).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo son una contribución al conocimiento de la maquinaria que participa en la regulación de la división celular al inicio y durante la organogénesis del nódulo, y durante la formación del primordio de raíz lateral. Las principales aportaciones de este trabajo se recapitulan de la siguiente manera:

1. El genoma de *P. vulgaris* contiene dos genes homólogos (*PvMYB200* y *PvMYB700*) a los factores de transcripción *AtMYB3R1* y *AtMYB3R4* de *A. thaliana*, que codifican para proteínas asociadas a la regulación de ciclo celular.
2. El análisis *in silico* de las secuencias *PvMYB200* y *PvMYB700*, demostró que ambas presentan las características que definen a un factor de transcripción tipo MYB-R3, es decir, tres repetidos R en el extremo N-terminal y los motivos 1, 2 y 4 en el extremo C-terminal, que caracterizan a los miembros del grupo A de la clasificación de los FT MYB-R3 de Angiospermas.
3. Los genes *PvMYB200* y *PvMYB700* están organizados en 12 exones, los repetidos R y los motivos 1, 2 y 4, están codificados en los exones 3-8 y 8-11, respectivamente.
4. El análisis la expresión espacio-temporal de la actividad del promotor *PvMYB700* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* demostró actividad específica en células en división, en el meristemo apical de la raíz, primordio de raíz lateral, ápice de la raíz lateral en desarrollo y pro-vasculatura. La versión corta del promotor (*PvMYB700 XbaI-NcoI*) es suficiente para conferir esta especificidad lo que abre la posibilidad de utilizarlo para dirigir la expresión de proteínas de interés durante el ciclo celular.

5. El análisis preliminar de citolocalización de YFP-*PvMY700* no resultó concluyente, sin embargo, corroboró la funcionalidad de la construcción YFP-*PvMY700*, así como que la proteína se localiza específicamente en zonas proliferativas del RAM, y puso en manifiesto la necesidad de utilizar marcadores que permitan validar su presencia en núcleo.

10. PERSPECTIVAS

- Analizar la citolocalización de YFP-*PvMYB700* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* y determinar si la inoculación con *R. etli* modifica su distribución subcelular
- Investigar cuales son los genes blanco de *PvMYB700* al inicio de la nodulación mediante análisis tipo ChiP-Seq.
- Realizar un análisis comparativo entre la actividad de *promPvMYB700* y *promPvMYB200*.

11. REFERENCIAS

Ahmed, S. S., Rifat, Z. T., Lohia, R., Campbell, A. J., Dunker, A. K., Rahman, M. S., & Iqbal, S. (2022). Characterization of intrinsically disordered regions in proteins informed by human genetic diversity. *PLoS Computational Biology*, 18(3), e1009911. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009911>

Ayala-Guzmán E. (2016). Análisis espacio-temporal de la actividad del promotor del gen *PvKNOLLE* en raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* durante la nodulación. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

Azimzadeh, J., & Bornens, M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *Journal of Cell Science*, 120(13), 2139-2142. <https://doi.org/10.1242/jcs.00523>

Batzenschlager, M., Lace, B., Zhang, N., Su, C., Egli, S., Krohn, P., Salfeld, J., Anicet Ditengou, F., Laux, T., & Ott, T. (2023). Competence for transcellular infection in the root cortex involves a post-replicative, cell-cycle exit decision in *Medicago truncatula*. *eLife*12:RP88588. <https://doi.org/10.7554/eLife.88588.1>

Benfey, P. N., Bennett, M., & Schiefelbein, J. (2010). Getting to the root of plant biology: Impact of the Arabidopsis genome sequence on root research. *The Plant Journal*, 61(6), 992–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04129.x>

Bhullar, S., Datta, S., Advani, S., Chakravarthy, S., Gautam, T., Pental, D., & Burma, P. K. (2007). Functional analysis of cauliflower mosaic virus 35S promoter: Re-evaluation of the role of subdomains B5, B4 and B2 in promoter activity. *Plant Biotechnology Journal*, 5(6), 696–708. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00274.x>

Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A. E., & Klempnauer, K. H. (1988). Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature*, 335(6193), 835–837. <https://doi.org/10.1038/335835a0>

Brewin, N. J. (1991). Development of the Legume Root Nodule. *Annual Review of Cell Biology*, 7(1), 191–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.001203>

Bucarey-Ruiz F. (2021) Caracterización de la actividad espacio-temporal de promotor sintético prom35S-MSA en raíces transgénicas *Phaseolus vulgaris* inoculados con rizobia. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.

Butler, J. E., & Kadonaga, J. T. (2001). Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes & Development*, 15(19), 2515–2519. <https://doi.org/10.1101/gad.924301>

Cai, H., Tian, S., Liu, C., & Dong, H. (2011). Identification of a MYB3R gene involved in drought, salt and cold stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Gene*, 485(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.026>

Carneiro, A. K., Da Fonseca Montessoro, P., Fusaro, A. F., Araújo, B. G., & Hemerly, A. S. (2021). Plant CDKs—Driving the Cell Cycle through Climate Change. *Plants*, 10(9), 1804. <https://doi.org/10.3390/plants10091804>

Cazzonelli, C. I., & Pogson, B. J. (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 15(5), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>

Cerri, M. R., Wang, Q., Stolz, P., Folgmann, J., Frances, L., Katzer, K., Li, X., Heckmann, A. B., Wang, T. L., Downie, J. A., Klingl, A., de Carvalho-Niebel, F., Xie, F., & Parniske, M. (2017). The ERN1 transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *New Phytologist*, 215(1), 323–337. <https://doi.org/10.1111/nph.14547>

Chabouté, M., & Schmit, A. (2016). Unique Characteristics of Cell Division in Vascular Plants. *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–8). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001686.pub3>

Cheeseman, I. M., & Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 33–46. <https://doi.org/10.1038/nrm231>

Chen, R. (2012). Nuclear Envelope Assembly and Disassembly During the Cell Cycle. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022532>

Chen, S., Niu, X., Guan, Y., & Li, H. (2017). Genome-wide analysis and expression profiles of the MYB genes in brachypodium distachyon. *Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1777–1788. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx115>

Chung, B. Y. W., Simons, C., Firth, A. E., Brown, C. M., & Hellens, R. P. (2006). Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 7 (1), 120 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-120>

Conaway, J. W., Bradsher, J. N., & Conaway, R. C. (1992). Mechanism of assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. Transcription factors delta and epsilon promote stable binding of the transcription apparatus to the initiator element. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (14), 10142–10148. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50211-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50211-3)

Dávila-Delgado, R., Bañuelos-Vazquez, L. A., Monroy-Morales, E., & Sánchez-López, R. (2020). *Rhizobium etli* CE3-DsRed pMP604: a useful biological tool to study initial

infection steps in *Phaseolus vulgaris* nodulation. *Planta*, 252(4), 69. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03479-y>

Dávila-Delgado, R., Flores-Canúl, K., Juárez-Verdayes, M. A., & Sánchez-López, R. (2023). Rhizobia induce SYMRK endocytosis in *Phaseolus vulgaris* root hair cells. *Planta*, 257(4), 83. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04116-0>

Deiana, A., Forcelloni, S., Porrello, A., & Giansanti, A. (2019). Intrinsically disordered proteins and structured proteins with intrinsically disordered regions have different functional roles in the cell. *PLoS One*, 14(8), e0217889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217889>

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., & Hay, R. T. (2000). Regulation of transcription factors by protein degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(8-9), 1207–1219. <https://doi.org/10.1007/pl00000760>

Desvoyes, B., de Mendoza, A., Ruiz-Trillo, I., & Gutierrez, C. (2014). Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2657–2666. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert411>

Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., & Maiti, I. B. (2015). Synthetic promoters in planta. *Planta*, 242(5), 1077–1094. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2377-2>

Dong, W., Zhu, Y., Chang, H., Wang, C., Yang, J., Shi, J., Gao, J., Yang, W., Lan, L., Wang, Y., Zhang, X., Dai, H., Miao, Y., Xu, L., He, Z., Song, C., Wu, S., Wang, D., Yu, N., & Wang, E. (2021). An SHR–SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation. *Nature*, 589(7843), 586–590. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3016-z>

Du, H., Liang, Z., Zhao, S., Nan, M. G., Tran, L. S. P., Lu, K., Huang, Y. B., & Li, J. N. (2015). The evolutionary history of R2R3-myb proteins across 50 eukaryotes: New insights into subfamily classification and expansion. *Scientific Reports*, 5(1), 11037. <https://doi.org/10.1038/srep11037>

Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>

Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colón-Carmona, A., & Rost, T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124(4), 1648–1657. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1648>

Emami, K. H., Burke, T. W., & Smale, S. T. (1998). Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID. *Nucleic Acids Research*, 26(3), 839–846. <https://doi.org/10.1093/nar/26.3.839>

Ernst, D., & Aarts, M. (2004). cis Elements and Transcription Factors Regulating Gene Promoters in Response to Environmental Stress. In H. Sandermann (Ed.), *Molecular Ecotoxicology of Plants, Ecological Studies* 179. Springer Berlin, pp. 151–176. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08818-0_6

Feng, G., Burleigh, J. G., Braun, E. L., Mei, W., & Barbazuk, W. B. (2017). Evolution of the 3R-MYB gene family in plants. *Genome Biology and Evolution*, 9(4), 1013–1029. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx056>

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>

Fischer, M., Schade, A. E., Branigan, T. B., Müller, G. A., & DeCaprio, J. A. (2022). Coordinating gene expression during the cell cycle. *Trends in Biochemical Sciences*, 47(12), 1009–1022. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.06.007>

Franssen, H. J., Xiao, T. T., Kulikova, O., Wan, X., Bisseling, T., Scheres, B., & Heidstra, R. (2015). Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. *Development*, 142(17), 2941–2950. <https://doi.org/10.1242/dev.120774>

Gao, J.-P., Jiang, S., Su, Y., Xu, P., Wang, J., Liang, W., Liu, C.-W., Murray, J. D., & Kondorosi, E. (2022). Intracellular infection by symbiotic bacteria requires the mitotic kinase AURORA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(43), e2202606119. <https://doi.org/10.1073/pnas>

Gao, J.-P., Liang, W., Liu, C.-W., Xie, F., & Murray, J. D. (2024). Unraveling the rhizobial infection thread. *Journal of Experimental Botany*, erae017. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae017>

Gonda, T. J., & Bishop, J. M. (1983). Structure and transcription of the cellular homolog (c-myb) of the avian myeloblastosis virus transforming gene (v-myb). *Journal of Virology*, 46(1), 212–220. <https://doi.org/10.1128/jvi.46.1.212-220.1983>

González-Guerrero, M., Matthiadis, A., Sáez, Á., & Long, T. A. (2014). Fixating on metals: New insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Frontiers in Plant Science*, 5, 45. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00045>

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>

Gresshoff, P. M., Krotzky, A., Mathews, A., Day, D. A., Schuller, K. A., Olsson, J., Delves, A. C., & Carroll, B. J. (1988). Suppression of the Symbiotic Supernodulation

Symptoms of Soybean. *Journal of Plant Physiology*, 132(4), 417–423. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80055-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80055-5)

Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B., & Peterson, T. (1994). The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 76(3), 543–553. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90117-1)

Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voß, U., Jürgens, G., & Ito, M. (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 134(6), 1101–1110. <https://doi.org/10.1242/dev.02801>

Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jurgens, G., & Ito, M. (2011). Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157(2), 706–717. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180836>

Heese, M., Gansel, X., Sticher, L., Wick, P., Grebe, M., Granier, F., & Jürgens, G. (2001). Functional characterization of the KNOLLE-interacting t-SNARE AtSNAP33 and its role in plant cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 155(2), 239–249. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107126>

Hotta, T., & Hashimoto, T. (2014). Microtubule nucleation. *Plant Cell Biology* (pp. 1-11). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7881-2_16-1

Howe, K. M., Reakes, C. F., & Watson, R. J. (1990). Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myb protein with DNA. *The EMBO Journal*, 9(1), 161–169. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08092.x>

Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J. H., & Watanabe, A. (2001). G2/M-Phase-Specific Transcription during the Plant Cell Cycle Is Mediated by c-Myb-Like Transcription Factors. *The Plant Cell*, 13(8), 1891-1905. <https://doi.org/10.1105/TPC.010102>

Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavisse, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., & Watanabe, A. (1998). A Novel cis-Acting Element in Promoters of Plant B-Type Cyclin Genes Activates M Phase-Specific Transcription. *The Plant Cell*, 10(3), 331-341. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.3.331>

Ivanov, V. B., & Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science*, 18(5), 237–243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.002>

Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7(3), 106–111. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02223-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02223-3)

Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2017). PlantTFDB 4.0: Toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D1040–D1045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw982>

Job, D., Valiron, O., & Oakley, B. (2003). Microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology* Vol. 15, Issue 1, pp. 111–117. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00003-0)

Kato, K., Gális, I., Suzuki, S., Araki, S., Demura, T., Criqui, M.-C., Potuschak, T., Genschik, P., Fukuda, H., Matsuoka, K., & Ito, M. (2009). Preferential Up-Regulation of G2/M Phase-Specific Genes by Overexpression of the Hyperactive Form of NtmybA2 Lacking Its Negative Regulation Domain in Tobacco BY-2 Cells. *Plant Physiology*, 149(4), 1945–1957. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135582>

Klempnauer, K. H., & Bishop, J. M. (1983). Transduction of c-myc into avian myeloblastosis virus: locating points of recombination within the cellular gene. *Journal of Virology*, 48(3), 565–572. <https://doi.org/10.1128/JVI.48.3.565-572.1983>

Kobayashi, K., Suzuki, T., Iwata, E., Nakamichi, N., Suzuki, T., Chen, P., Ohtani, M., Ishida, T., Hosoya, H., Müller, S., Leviczky, T., Pettkó-Szandtner, A., Darula, Z., Iwamoto, A., Nomoto, M., Tada, Y., Higashiyama, T., Demura, T., Doonan, J. H., Ito, M. (2015). Transcriptional repression by MYB 3R proteins regulates plant organ growth. *The EMBO Journal*, 34(15), 1992–2007. <https://doi.org/10.15252/embj.201490899>

Komaki, S., & Sugimoto, K. (2012). Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. *Plant and Cell Physiology*, 53(6), 953–964. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs070>

Leppek, K., Das, R., & Barna, M. (2018). Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 19(3), 158–174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>

Lipsick, J. S. (2010). The C-MYB story - Is it definitive? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17067–17068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012402107>

Liu, B., & Lee, Y.-R. J. (2022). Spindle Assembly and Mitosis in Plants. *Annual Review of Cell Biology*, 73, 227–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070721>

Liu J, Perumal NB, Oldfield CJ, Su EW, Uversky VN, Dunker AK. (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry*, 45(22):6873-6888. doi: 10.1021/bi0602718. PMID: 16734424; PMCID: PMC2538555.

Lüscher, B., & Eisenman, R. N. (1990). New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes & Development*, 4(12B), 2235–2241. <https://doi.org/10.1101/gad.4.12b.2235>

Ma, Q., Dai, X., Xu, Y., Guo, J., Liu, Y., Chen, N., Xiao, J., Zhang, D., Xu, Z., Zhang, X., & Chong, K. (2009). Enhanced tolerance to chilling stress in OsMYB3R-2 transgenic rice is mediated by alteration in cell cycle and ectopic expression of stress genes. *Plant Physiology*, 150(1), 244–256. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133454>

Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.124.1.33>

Mayer, U., Ruiz, R. A. T., Berleth, T., Miséra, S., & Jürgens, G. (1991). Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature*, 353(6343), 402–407. <https://doi.org/10.1038/353402a0>

Menges, M., de Jager, S. M., Gruissem, W., & Murray, J. A. H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*, 41(4), 546–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02319.x>

Millard, P. S., Kragelund, B. B., & Burow, M. (2019). R2R3 MYB Transcription Factors Functions outside the DNA-Binding Domain. *Trends in Plant Science*, 24(10), 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.07.003>

Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-Debuen, A., & Sánchez-López, R. (2022). Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5267. <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>

Monroy-Morales E. (2024). Análisis del avance del hilo de infección y la dinámica de la citocinesis en el sitio de infección en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Rhizobium etli*. Tesis de Doctorado, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

Motta, M. R., & Schnittger, A. (2021). A microtubule perspective on plant cell division. *Current Biology*, 31(10), R547–R552. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.087>

Nayeri, F. D. (2014). Identification of transcription factors linked to cell cycle regulation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 9(11), e972864. <https://doi.org/10.4161/15592316.2014.972864>

Necci, M., Piovesan, D., Hoque, M. T., Walsh, I., Iqbal, S., Vendruscolo, M., Sormanni, P., Wang, C., Raimondi, D., Sharma, R., Zhou, Y., Litfin, T., Galzitskaya, O. V., Lobanov,

M. Y., Vranken, W., Wallner, B., Mirabello, C., Malhis, N., Dosztányi, Z., ... Tosatto, S. C. E. (2021). Critical assessment of protein intrinsic disorder prediction. *Nature Methods*, 18(5), 472–481. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01117-3>

Ogata, K., Hojo, H., Aimoto, S., Nakai, T., Nakamura, H., Sarai, A., Ishii, S., & Nishimura, Y. (1992). Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), 6428–6432. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6428>

Okumura, T., Nomoto, Y., Kobayashi, K., Suzuki, T., Takatsuka, H., & Ito, M. (2021). MYB3R-mediated active repression of cell cycle and growth under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 134(2), 261–277. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01250-8>

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>

Polyak, K., & Meyerson, M. (2003). Overview: Gene Structure: Vol. Volume 2 (6th edition). Donald W Kufe, MD, Raphael E Pollock, MD, PhD, Ralph R Weichselbaum, MD, Robert C Bast, Jr, MD, Ted S Gansler, MD, MBA, James F Holland, MD, ScD (hc), and Emil Frei, III, MD. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12983/>

Popp, C., & Ott, T. (2011). Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.016>

Pinson, B., Sagot, I., Borne, F., Gabrielsen, O. S., & Daignan-Fornier, B. (1998). Mutations in the yeast Myb-like protein Bas1p resulting in discrimination between promoters in vivo but not in vitro. *Nucleic Acids Research*, 26(17), 3977–3985. <https://doi.org/10.1093/nar/26.17.3977>

Pugh, B. F., & Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Development*, 5(11), 1935–1945. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.1935>

Qi, F., & Zhang, F. (2020). Cell Cycle Regulation in the Plant Response to Stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1765. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01765>

Rosinski, J. A., & Atchley, W. R. (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *Journal of Molecular Evolution*, 46(1), 74–83. <https://doi.org/10.1007/pl00006285>

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>

Sablowski, R., & Gutierrez, C. (2022). Cycling in a crowd: Coordination of plant cell division, growth, and cell fate. *The Plant Cell*, 34 (1), 193–208. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab222>

Sánchez-López, R., Jáuregui, D., Nava, N., Alvarado-Affantranger, X., Montiel, J., Santana, O., Sanchez, F., & Quinto, C. (2011). Down-regulation of SymRK correlates with a deficiency in vascular bundle development in *Phaseolus vulgaris* nodules. *Plant, Cell and Environment*, 34(12), 2109–2121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02408.x>

Seguí-Simarro, J. M., Austin, J. R., White, E. A., & Staehelin, L. A. (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of arabidopsis preserved by high-pressure freezing. *The Plant Cell*, 16(4), 836–856. <https://doi.org/10.1105/tpc.017749>

Shaul, O. (2017). How introns enhance gene expression. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 91, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.016>

Soyano, T., & Hayashi, M. (2014). Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.010>

Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., & Hayashi, M. (2013). NODULE INCEPTION Directly Targets NF-Y Subunit Genes to Regulate Essential Processes of Root Nodule Development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genetics*, 9(3), e1003352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003352>

Stegmaier, P., Kel, A. E., & Wingender, E. (2004). Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors. *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics*, 15(2), 276–286. https://doi.org/10.11234/gi1990.15.2_276

Svolacchia, N., Salvi, E., & Sabatini, S. (2020). Arabidopsis primary root growth: let it grow, can't hold it back anymore! *Current Opinion in Plant Biology*, 57, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.08.005>

Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., & Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends in Plant Science*, 17 (10), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.001>

Thompson, M. A., & Ramsay, R. G. (1995). Myb: an old oncoprotein with new roles. *BioEssays*, 17(4), 341–350. <https://doi.org/10.1002/bies.950170410>

Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Jin, J., & Gao, G. (2020). PlantRegMap: Charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D1104–D1113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1020>

Tominaga-Wada, R., & Wada, T. (2016). The ectopic localization of CAPRICE LIKE MYB3 protein in Arabidopsis root epidermis. *Journal of Plant Physiology*, 199, 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.014>

Torres-Martínez, H. H., Rodríguez-Alonso, G., Shishkova, S., & Dubrovsky, J. G. (2019). Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms. *Frontiers in Plant Science*, 10, 206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00206>

Touihri, S., Knöll, C., Stierhof, Y. D., Müller, I., Mayer, U., & Jürgens, G. (2011). Functional anatomy of the Arabidopsis cytokinesis-specific syntaxin KNOLLE. *The Plant Journal*, 68(5), 755–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04736.x>

Tsyganova, A.V., Brewin, N. J., & Tsyganov, V. E. (2021). Structure and development of the legume-rhizobial symbiotic interface in infection threads. *Cells*, 10(5), 1050 <https://doi.org/10.3390/cells10051050>

Vilches-Barro, A., & Maizel, A. (2015). Talking through walls: Mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 31–38. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.10.005>

Villao-Uzho, L., Chávez-Navarrete, T., Pacheco-Coello, R., Sánchez-Timm, E., & Santos-Ordóñez, E. (2023). Plant Promoters: Their Identification, Characterization, and Role in Gene Regulation. *Genes*, 14 (6),1226. <https://doi.org/10.3390/genes14061226>

Wang, W., Sijacic, P., Xu, P., Lian, H., & Liu, Z. (2018). Arabidopsis TSO1 and MYB3R1 form a regulatory module to coordinate cell proliferation with differentiation in shoot and root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(13), E3045–E3054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715903115>

Wang, Z. (2021). Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, 10 (12), 3227. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>

Willems, A., & de Veylder, L. (2022). The Plant Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 6 (38), 25-48 <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120420-092421>

Wong, J. E. M. M., Nadzieja, M., Madsen, L. H., Bücherl, C. A., Dam, S., Sandal, N. N., Couto, D., Derbyshire, P., Uldum-Berentsen, M., Schroeder, S., Schwämmle, V., Nogueira, F. C. S., Asmussen, M. H., Thirup, S., Radutoiu, S., Blaise, M., Andersen, K. R., Menke, F. L. H., Zipfel, C., & Stougaard, J. (2019). A Lotus japonicus cytoplasmic kinase connects Nod factor perception by the NFR5 LysM receptor to nodulation. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 116(28), 14339–14348.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1815425116>

Wu, J., Chen, B., Liu, Y., Ma, L., Huang, W., & Lin, Y. (2022). Modulating gene regulation function by chemically controlled transcription factor clustering. *Nature Communications*, 13(1), 2363. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30397-2>

Yabuuchi, T., Nakai, T., Sonobe, S., Yamauchi, D., & Mineyuki, Y. (2015). Preprophase band formation and cortical division zone establishment: RanGAP behaves differently from microtubules during their band formation. *Plant Signaling and Behavior*, 10(9), e1060385 <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1060385>.

Yang, W., Cortijo, S., Korsbo, N., Roszak, P., Schiessl, K., Gurzadyan, A., Wightman, R., Jönsson, H., & Meyerowitz, E. (2021). Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis*. *Science*, 371(6536), 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.abe2305>

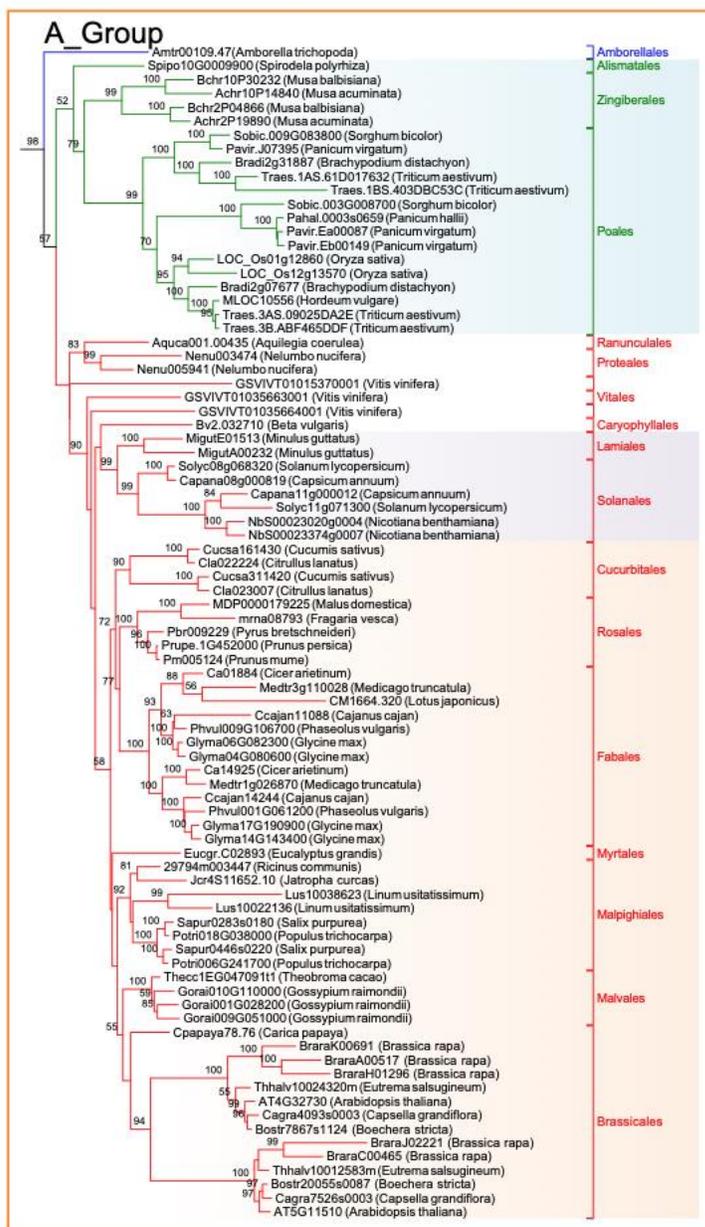
Yano, K., Yoshida, S., Müller B, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T. L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., & Parniske, M. (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20540-20545. DOI: 10.1073/pnas.0806858105

Yu, H. G., Dawe, R. K., Hiatt, E. N., & Dawe, R. K. (2000). The plant kinetochore. *Trends in Plant Science*, 5(12), 543–547. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01789-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01789-1)

Zhu, N., Duan, B., Zheng, H., Mu, R., Zhao, Y., Ke, L., & Sun, Y. (2023). An R2R3 MYB gene GhMYB3 functions in drought stress by negatively regulating stomata movement and ROS accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 197, 107648. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107648>

ANEXOS

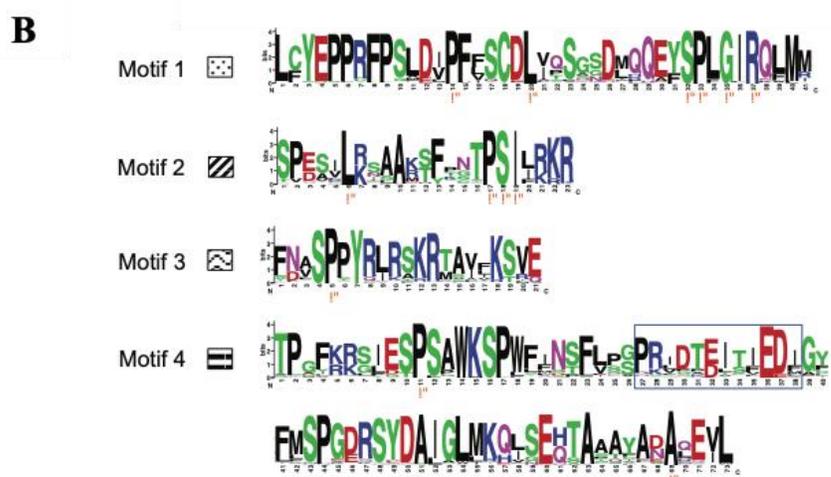
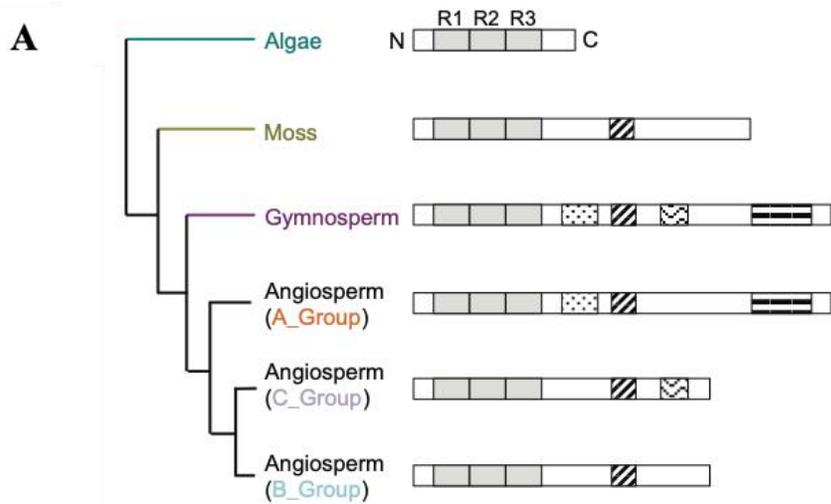
A



B



Figura 1. Clasificación de las secuencias *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYBR4* en el grupo A de los MYB-3R de plantas e identificación de los motivos R. A, árbol filogenético de proteínas grupo A. B, consenso de motivos R1, R2 y R3 en proteínas MYB-3R grupo A y alineamiento múltiple de secuencias peptídicas del extremo N-terminal de *PvMYB200* (235 aa), *PvMYB700* (239 aa), *AtMYB3R1* (238 aa) y *AtMYBR4* (231 aa), utilizando la herramienta Clustal W. Se enmarcan las secuencias de los motivos R1 (recuadros en amarillo), R2 (recuadros en rojo) y R3 (recuadros en verde). Los números de acceso Phvu1.001G061200 y Phvu1.009G106700 corresponden a *PvMYB200* y *PvMYB700*, respectivamente. Imágenes están basadas en Figuras Suplementarias en Feng y cols., 2017.



C

AT5G11510.1-ATMYB3R4 AT4G32730.2-ATMYB3R1 Phvu1.001G061200.1 Phvu1.009G106700.1	EGTNNSEEDQSYHVNDPKLVPVNFASLAEDRPHSLPKHE-PNMTNEQHEDMGASS NGG-FPEQQGLSYIPKDSLKLVPLNSFSSPSRVNKIYFPIDDKPF---AEKDKGALCYEP DMG-TAVMEEARDIILNGTS-----EETKNVHTEKEDSGSLCYEP RID-NTEMHEPSDVKDDSKLVVNNFVGGSDAKSTSYPTDENSENMH-TEQNTGALCYEP	559 572 557 538	Motivo 1
AT5G11510.1-ATMYB3R4 AT4G32730.2-ATMYB3R1 Phvu1.001G061200.1 Phvu1.009G106700.1	LGEPSDLPVENCIDLQSKNDPLHDYSPLGIRKLLMSTMTCMSPLRLWESPTG----- PRFPSADIPFFSCDLVPSNSDLRQEYSPFGIRQLMSSMNCTTPLRLWDSPOCHD SPDVM PRFPSLDIPFFSCDLVQSGVDMQEQEFSPFGIRQFMSSMNCLTPFRLWDSPSHGL SPDAL PRFPSLDIPFLSCDLVQSGGDMQEQEFSPFGIRQFMSSMNCLTPFRLWDSPSRDI SPDAL	612 632 617 598	Motivo 2
AT5G11510.1-ATMYB3R4 AT4G32730.2-ATMYB3R1 Phvu1.001G061200.1 Phvu1.009G106700.1	----KTLVGAQSIILRKRTRDLLTPLSEKRSDDKLEIDIAASLAKDFSRLDVMFDETENR LNDTAKSFSGAPSILKKRIRDLLSPVLDLRRKDKLKRATSSLANDFSRLDVMLDEGDCC LKSAAKTFTGTSPILKKRIRDLLSPLSDKRIDKLETDMTT---KNISSLDVMFGDNETQ LKSAAKTFKGTSPILKKRIRDLLSPLSEKRIDKLEIEMTSTLIKNSRLDVMFDDNETL	668 692 674 658	
AT5G11510.1-ATMYB3R4 AT4G32730.2-ATMYB3R1 Phvu1.001G061200.1 Phvu1.009G106700.1	NSPSRARNKEGHLVDNGTSNENFSIFCITPFRRGLESPSAWKSPFYINSLLPSPRFDTDL IPLSAID--KNTAETSFDIENFNIFDTPFRKLLDTPSPWKSPLLFGSFLQSPKLPPEI --VQAPGDNSGEQTRKDGGEFACISIFGTPFRKLGLESPSAWKSPWFNTFLCSPRLGTEI VSTSGPGENSGDHTGNDGGLTCSIFGTPFRKSIESPASAWKSPWFINTFLSSPRIDTEI	866 880 886 868	Motivo 4
AT5G11510.1-ATMYB3R4 AT4G32730.2-ATMYB3R1 Phvu1.001G061200.1 Phvu1.009G106700.1	TIEDMGYIFSPGERSYESIGVMTQINEHTSAFAAFADAMEVSSPTNDDARQKKELD-- TFEDIGCFMSPGERSYDAIGLMKHLSEHSATA--YADALEVLNDTPESILKRRQLNK-- TVEDFGYLMSPGDRSYDAIGLLKQISEQTAAT--YANAKEVLNETPKAASRKDAS--GN TIEDFGYFMSPGDRSYDAIGLMKQINEQTAQAQ--YASAHAILNETPKALPRGKSRNDGD	923 936 942 926	

Figura 2. Identificación de los motivos 1, 2 y 4 en las secuencias *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYBR4*. A, filogenia y representación esquemática de la estructura primaria de proteínas MYB-R3 de alga, musgo, gimnosperma y angiosperma (grupos A, B y C). B, secuencia consenso de motivos 1, 2, 3 y 4 presentes en las proteínas MYB-3R plantas, localizados según se indica en A. C, alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del extremo C-terminal de *PvMYB200*, *PvMYB700*, *AtMYB3R1* y *AtMYBR4*, realizado utilizando la herramienta Clustal W. Se enmarcan las secuencias de los motivos 1 (recuadros en azul), 2 (recuadros en amarillo) y 4 (recuadros en rosa). Los números de acceso Phvul.001G061200 y Phvul.009G106700 corresponden a *PvMYB200* y *PvMYB700*, respectivamente. A y B fueron tomados de Feng y colaboradores, 2017.

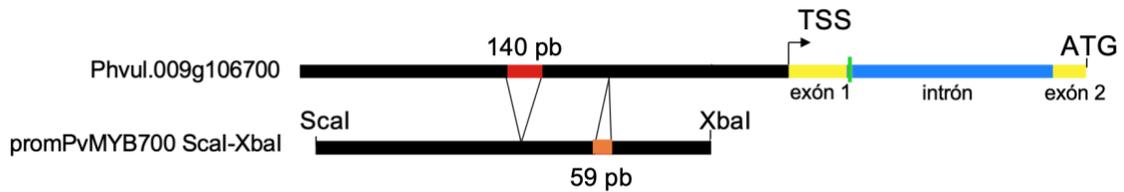


Figura 3. Representación esquemática de Phvul.009g106700 y prom*PvMYB700* *ScaI-XbaI*. Esquema de Phvul.009g106700 que corresponde a: 3,147 pb río arriba del codón de inicio (ATG) y se indican las posiciones del sitio de inicio de la transcripción (TSS, flecha en negro) del motivo MSA (en verde; a 12 pb río abajo de la posición de unión entre el exón 1 y el intrón) y el fragmento de 140 pb (rojo) no presente en prom*PvMYB700* *ScaI-XbaI*. Esquema de prom*PvMYB700* *ScaI-XbaI* que corresponde a: 1,570 pb del extremo 5' del promotor *PvMYB700* y se indica la posición del fragmento de 59 pb (en naranja), así como los sitios de restricción *ScaI* y *XbaI*.

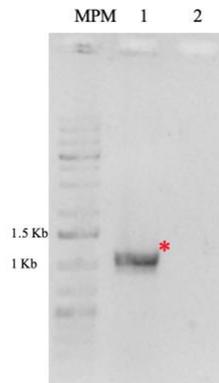


Figura 4. Análisis electroforético del producto de amplificación del fragmento 3' de prom*PvMYB200*. Carril 1, producto de reacción de PCR con los oligonucleótidos p*PvMYB200* Fw2 *XbaI* y p*PvMYB200* Rv *NcoI*, DNAg de raíz digerido con *PvuII* y la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase. El producto esperado es de 1060 pb. Carril 2, control negativo sin templado. Las condiciones de PCR son las que se mencionan: 98°C/3 min; 98°C/10 segundos; 55°C/50 segundos;

72°C/1 min (30 ciclos). MPM, marcador de peso molecular (GeneRuler™1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific).

Tabla 1. Oligonucleótidos gen-específicos diseñados para la amplificación por PCR de las secuencias prom*Pv*MYB200 y prom*Pv*MYB700

Nombre	Tm *	Longitud (nt)	% G-C	Secuencia
p <i>Pv</i> MYB200 Fw <i>Sa</i> I	62 °C	31	52%	5'-CACCGTCGACGGAGCATATGGATGIGTTTGA-3'
p <i>Pv</i> MYB200 Rv <i>Nco</i> I	62 °C	32	43%	5'CCATGGATTCTAAGTGGATTGCTACTCTTTTC-3'
p <i>Pv</i> MYB700 Fw <i>Sca</i> I	62 °C	32	44%	5'- CACCAGTACTTGGGTTGATTACGTAAACAGG-3'
p <i>Pv</i> MYB700 Rv <i>Nco</i> I	63 °C	33	33%	5'-CCATGGAGTTTGTGGCAGATAACTAAAATAGC-3'

*, Tm de la secuencia gen-específica en los oligonucleótidos (subrayada), se excluyen las secuencias de sitio de restricción y la secuencia CACC requerida para la clonación en pENTR/D-TOPO®.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para amplificar fragmentos de las secuencias promotoras *Pv*MYB200 y *Pv*MYB700.

Nombre	Tm	Longitud (nt)	% G-C	Secuencia *
p <i>Pv</i> MYB200 Fw2 <i>Xba</i> I	64 °C	33	36%	5'- CACCCGCTTACTCTAGACTTTTCTTAAATGTAA - 3'
p <i>Pv</i> MYB200 Rv2 <i>Xba</i> I	67 °C	33	36%	5'- GTGTTACATTTAAGAAAAGTCTAGAGTAAGCCG- 3'
p <i>Pv</i> MYB700 Fw2 <i>Xba</i> I	61 °C	34	38%	5'-CACCTCTAGAGCCTTAAGTACATTGACTTGATG -3'
p <i>Pv</i> MYB700 Rv2 <i>Xba</i> I	64°C	28	36%	5'-AAGATGGATTAATCTAGATTGGTGCGG-3'

* En negritas se resaltan los nucleótidos substituidos en los oligonucleótidos para introducir sitio de restricción *Xba*I (secuencia subrayada)

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos de las secuencias codificantes *Pv*MYB200 y *Pv*MYB700.

Nombre	Tm *	Longitud (nt)	% de G+C	Secuencia
<i>Pv</i> MYB200 Fw 2	62 °C	22	38%	5'- CACCATGGACGGTGAACGGAGC-3'
<i>Pv</i> MYB200 Fw3 cds	68 °C	20	60%	5'- GAGTCCAGCCAAGGTTTCAGC -3'
<i>Pv</i> MYB200 Fw4 cds	66 °C	21	52%	5'- CTCCTGTGTTTCGTGCAAAGG -3'

<i>PvMYB200 Rv3 cds</i>	66 °C	19	58%	5'- CACATGCACTGCTGCTCTG-3'
<i>PvMYB200 Rv</i>	66 °C	30	40%	5'- CAACTTATCTACAGCCCTTCAACAAATACG-3'
<i>PvMYB700 Fw 2</i>	64°C	27	53%	5'- CACCATGGAAGGTGAGAGGACAATCCC-3'
<i>PvMYB700 Rv</i>	64°C	30	40%	5'-CAACTTATCTACAGCCCTTCAACAAATACG-3'
<i>PvMYB700 Fw3 cds</i>	62°C	22	50%	5'-GTTTGGGCAGGAATCATCACAG-3'
<i>PvMYB700 Rv3 cds</i>	61°C	21	52%	5'- CAGACATCAACACGTGTTCCG -3'
<i>PvMYB700 Rv4 cds</i>	61°C	21	48%	5'-AGACGGTTGTTGCACAATCTC-3'
<i>PvMYB700 Fw4 cds</i>	62°C	21	57°C	5'-CTGTCAGTACATCAGGCCAG-3'

*, Tm de la secuencia gen-específica en los oligonucleótidos, se la secuencia CACC requerida para la clonación en pENTR/D-TOPO®.