



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD  
LEÓN**

**Análisis funcional del gen AGAMOUS-LIKE 8 durante la  
simbiosis de la raíz en *Phaseolus vulgaris***

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**SALMA SARAÍ MELÉNDEZ GONZÁLEZ**



**Tutor: Dr. Manojkumar Arthikala  
Asesora: Dra. Kalpana Nanjareddy**

**ENES UNAM**  
UNIDAD LEÓN

**LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO**

**2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

Quiero comenzar expresando mi gratitud a mi familia, quienes siempre mostraron su apoyo a lo largo de mi vida estudiantil y confiaron en que lograría mis metas. Gracias, papá por todo tu cariño y tus consejos. Gracias, mamá por todo. Gracias, mis pequeños hermanos. Gracias a mi abuelita, siempre fuiste mi inspiración.

También quiero agradecer enormemente a mis compañeros del laboratorio interdisciplinario de la ENES (Gabriel, Emmanuel, Caro) por hacerme la vida más alegre, por las risas, por acompañarnos en las largas jornadas en el laboratorio y porque siempre estuvieron ahí para darme ánimos. Especialmente, gracias Caro por ser mi compañera de aventuras, por escucharme siempre, por tus buenos consejos y por estar ahí siempre conmigo tanto en el ámbito académico como en el personal.

Un agradecimiento especial a Sabino, gracias, por tanto, por tu apoyo, comprensión, por impulsarme a seguir mis sueños y creer en mí. Te amo.

Gracias también al Dr. Manoj por haberme aceptado en su grupo de investigación y por sus enseñanzas a lo largo de este proyecto, por su paciencia y tiempo dedicado. Gracias también a la Dra. Kalpana por su apoyo en el laboratorio y gracias a todos los profesores de Agrogenómicas, tienen siempre toda mi admiración.

También gracias a la ENES León y a todo el personal que conforma esta institución.

Agradezco el apoyo con beca de DGAPA-PAPIIT clave: IN213221 al Dr. Manojkumar Arthikala. Y por apoyar parcialmente el trabajo de CONACYT Ciencia de Frontera clave: 316538 a Dr. Manojkumar Arthikala, DGAPA-PAPIIT clave: IN216321 a la Dra. Kalpana Nanjareddy.

De igual forma agradezco el apoyo del laboratorio nacional PLANTECC y SGC-LII para el uso de equipos e instalaciones.

## Contenido

<b>1. Resumen</b> .....	5
<b>2. Introducción</b> .....	6
2.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	6
2.2 Simbiosis entre rizobios y <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	7
2.3 <i>Rhizobium tropici</i> .....	9
2.4 Proceso de desarrollo nodular .....	10
2.5 Factores de transcripción .....	11
2.6 La familia MADS-box.....	12
2.7 El gen AGAMOUS tipo 8 o FRUITFULL.....	13
2.8 Biotecnología en <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	14
2.9 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	15
2.10 Análisis funcional de genes por promotores génicos.....	16
2.11 Análisis de localización proteica.....	16
2.12 Análisis funcional de un gen a través de la sobreexpresión.....	17
2.13 La familia MADS-box en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosas .....	17
<b>3. Antecedentes</b> .....	18
<b>4. Justificación</b> .....	19
<b>5. Hipótesis</b> .....	20
<b>6. Objetivo general:</b> .....	20
<b>7. Métodos</b> .....	21
7.1 Selección del gen AGL8 .....	21
7.2 Aislamiento de ADN de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	21
7.3 Análisis fenográfico de la familia AGAMOUS.....	21
7.4 Diseño de oligos específicos para promotor AGL8 y localización subcelular .....	22
7.5 Amplificación de fragmento del promotor del gen AGL8 .....	22
7.6 Introducción de fragmento a vector binario pENTR .....	23
7.7 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> TOP10.....	24
7.8 Introducción de vector pBGWFS7.0 a <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	24
7.9 Crecimiento de plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> , producción de raíces peludas e inoculación.....	25
7.10 Ensayo tipo GUS .....	26
7.11 Análisis de localización subcelular.....	26

7.12 Inoculación con <i>Rhizobium</i> .....	26
7.13 Análisis de sobreexpresión en raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> . .....	26
<b>8. Resultados</b> .....	27
8.1 La familia génica de AGL8 en <i>Phaseolus vulgaris</i> está compuesta por dos subfamilias.....	27
8.2 Análisis estructural de la familia de genes MADS-box: .....	28
8.2.1 AGL8 es regulado al alza durante el desarrollo de nódulos en frijol.....	29
8.3 El gen AGL8 se expresa en nódulos y raíces de frijol. ....	36
8.4 Clonación del promotor AGL8 en vector pENTR.....	38
8.5 Introducción del promotor de AGL8 en vector de salida pBGWSF7.0 e introducción a <i>A. rhizogenes</i> .....	38
8.5.1 El promotor de AGL8 tiene actividad en células meristemáticas en condiciones simbióticas con <i>Rhizobium</i> . .....	39
8.5.2 El promotor de AGL8 tiene actividad en los nódulos maduros formados en las raíces de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	41
8.6 Clonación del gen AGL8 en las raíces del frijol. ....	41
8.6.1 Introducción del gen AGL8 en vector de salida pEarleyGate104 e introducción a <i>A. rhizogenes</i> .....	45
8.6.2 AGL8 se localiza en el núcleo celular. ....	45
8.7 Aislamiento y clonación del gen AGL8 en vector binario para estudios de sobreexpresión. ....	47
8.8 La construcción pEARLY104/AGL8 sobreexpresa el gen AGL8 en raíces peludas de frijol. ....	47
8.8.1 La sobreexpresión de AGL8 en frijol promueve el desarrollo de nódulos.....	48
<b>9. Discusión:</b> .....	51
9.1 AGL8 en la familia MADS-box .....	51
9.2 Detección de actividad del promotor de AGL8 durante distintas etapas del desarrollo nodular .....	53
9.3 Localización subcelular de AGL8 en raíces de <i>P. vulgaris</i> .....	53
9.4 Efectos en la nodulación ante la sobreexpresión del gen AGL8.....	53
<b>10. Conclusiones</b> .....	54
<b>11. Material suplementario</b> .....	55
<b>12. Referencias</b> .....	55

## 1. Resumen

Los factores de transcripción MADS-box son los reguladores clave de varios procesos de desarrollo en las plantas, como el desarrollo de las flores, la formación de los meristemas, la expansión, diferenciación celular y la arquitectura del tejido vegetal. A diferencia de otras plantas, las leguminosas tienen actividad meristemática de corta duración mientras desarrollan los nódulos de la raíz. La contribución de los genes MADS-box durante la interacción simbiótica leguminosas-rizobios no se comprende claramente por lo que estudiarlos es relevante para llenar los vacíos de conocimiento en la vía simbiótica de las leguminosas. Aquí, hemos identificado dos subfamilias (tipo M y MICK) de los genes MADS-box similares a *Agamous* de *Phaseolus vulgaris*. Se identificaron un total de 49 miembros del tipo M y 43 miembros de las subfamilias MICK. El árbol fenográfico revela 3 grupos en cada subfamilia. El análisis de la estructura de los genes MADS-box muestra un mínimo de 1 exón y un máximo de 8 exones, además el análisis de dominio reveló el dominio SRF conservado en todos los miembros de la familia. A nivel subcelular, la proteína AGL8 revela localización nuclear en raíces transgénicas de frijol. A continuación, se sobreexpresó *AGL8* en raíces peludas de frijol y, en condiciones de nodulación, las raíces 35S-*AGL8* muestran un fenotipo de hipernodulación. Estas observaciones fueron confirmadas además por análisis de promotores. Todo lo anterior sugiere que *AGL8* juega un papel clave en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis de nódulos de raíz en frijol común.

## 2. Introducción

La asociación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios es un fenómeno complejo tanto a nivel molecular como bioquímico. Desde la última década, la formación y el desarrollo de nódulos leguminosos-rizobios se han estudiado ampliamente, se han identificado y caracterizado varios genes de señalización y factores de transcripción específicos de la nodulación en diferentes leguminosas modelo. Los rápidos avances en las herramientas de edición del genoma nos permiten dilucidar información sobre genes nuevos y su función. El presente proyecto propuso mostrar el papel del factor de transcripción AGAMOUS-Like8 durante la formación y desarrollo de nódulos en cultivos de la leguminosa *Phaseolus vulgaris*. Este trabajo utiliza técnicas para analizar la sobreexpresión de genes, la localización subcelular y el estudio del promotor del gen.

### 2.1 *Phaseolus vulgaris*

*Phaseolus vulgaris* o frijol común es una planta leguminosa herbácea de la familia *Fabaceae*. Crece a temperaturas que oscilen entre los 10 y 27 °C, temperaturas a las que alcanza su máximo tamaño que es entre 50 y 70 cm. El frijol es la leguminosa de mayor consumo humano, siendo aún más relevante su siembra y uso en el continente americano (Schwartz et al. 1989). Este cultivo se puede dividir según su diversidad genética de poblaciones silvestres en dos grupos: Mesoamericano y el Andino. Hay coincidencia entre varios estudios que sitúan al centro y occidente de México como el centro de origen de esta leguminosa, aunque sitúan a Perú como centro de domesticación (Hernández-López et al., 2013). La cantidad de proteínas, fibra, vitaminas y minerales que contiene el frijol hace que sea un elemento muy importante en la dieta de muchas culturas (Frassinetti et al. 2015). Sus principales aportaciones a la dieta son el nitrógeno y aminoácidos como la lisina (Bressani et al. 1955) Como fuente de fibra aporta entre 14 y 19 % de cada 100 g de alimento crudo en forma de pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa y lignina (Ulloa et al. 2011). En México se estima que el consumo anual *per cápita* es de 9.9 kg y el consumo nacional anual es de 1.22 millones de toneladas (SAGARPA 2017).

Desde hace siglos, los campesinos en zonas de Latinoamérica, principalmente en México solían sembrar el frijol, maíz y calabaza como parte de un sistema de policultivo llamado milpa. La palabra milpa viene del náhuatl *milli* (campo) y *pan* (encima) y servía como un método de cultivo que permitía la producción de alimentos básicos en la alimentación mesoamericana (Santillán 2014). Esto lo hacían principalmente por los beneficios que cada uno de estos elementos brindaba al rendimiento de la cosecha total. En el caso del frijol, el papel que cumple es el de fijar nitrógeno y proveerlo a las plantas aledañas (Ebel et al., 2017). Hoy en día se sabe que esta interesante cualidad del frijol y las leguminosas se debe a la simbiosis existente con microorganismos como las rizobias (Salinas 2015).

A pesar de su importancia, el estudio biotecnológico en esta planta ha sido retrasado debido al carácter recalcitrante de *Phaseolus* sp. para la transformación genética estable, es decir, muestra resistencia a la transformación genética, así como a la regeneración *in vitro* (Hnatuszko-Konka et al., 2014). Sin embargo, los sistemas de transformación transitoria sirven como una alternativa para estudios rápidos de caracterización funcional de genes.

## 2.2 Simbiosis entre rizobios y *Phaseolus vulgaris*

En la naturaleza, las asociaciones colaborativas entre organismos de distintos reinos son comunes como parte de la lucha diaria por la supervivencia como especie. A este fenómeno le conocemos como simbiosis. Existen relaciones simbióticas en las que sólo uno de los organismos involucrados se ve beneficiado, tal es el caso del comensalismo y el parasitismo (Ewald 1987). Sin embargo, existe también la simbiosis en la que ambos organismos obtienen beneficios y recibe el nombre de mutualismo. En esta clasificación encontramos a la relación que mantienen las bacterias de tipo *Rhizobium* con plantas leguminosas como *Phaseolus vulgaris* o frijol común. Esta asociación simbiótica es particularmente interesante debido a que la planta se ve beneficiada del proceso de fijación de nitrógeno. El nitrógeno es un elemento que se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, principalmente en su forma gaseosa ( $N_2$ ,  $NO_2$ ), sin embargo, esta no es una forma aprovechable por las plantas. Por esta razón, en el ciclo del nitrógeno



son requeridas bacterias fijadoras, las cuales son capaces de recoger el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), el cual posteriormente es oxidado para dar lugar al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), proceso conocido como fijación de nitrógeno (Mylona, Pawlowski, and Bisseling. 1995). Sin embargo, este proceso puede no llevarse a cabo de forma eficiente en grandes extensiones de cultivo. Es por ello que gran parte de los cultivos agrícolas necesitan que se les proporcione nitrógeno de forma externa a través de fertilizantes (Zahran, 1999).

La relación simbiótica entre plantas leguminosas y rizobios es altamente selectiva: especies o cepas de rizobios particulares (bacteroides) establecen una simbiosis eficaz con sólo un conjunto limitado de especies de leguminosas ( Perret et al. 2000; Wang et al. 2017). En la mayoría de las leguminosas, la morfogénesis de los nódulos y la infección bacteriana están mediadas por el reconocimiento específico del hospedador de los lipoquitooligosacáridos rizobiales conocidos como factores de nodulación (NOD). Los factores NOD poseen varias características químicas específicas de la especie, y esta variación estructural define la base de la especificidad huésped-simbionte, particularmente a nivel de especie (Bras et al. 2000; Wang et al., 2017). Las bacterias *Rhizobium* son un grupo de bacterias gram-negativas que inducen el desarrollo de nódulos en las raíces de leguminosas. En estos nódulos comienza el proceso de fijación de nitrógeno, del cual se ven ampliamente beneficiadas las plantas leguminosas y motivo por el cual son ampliamente estudiadas (Long, 1996). De este fenómeno, resulta especialmente interesante el proceso de fijación del nitrógeno debido a el grado de especialización que tienen ambos organismos. Quienes se encargan de mandar la primer señal son las plantas mediante exudados de metabolitos secundarios hacia la rizósfera, tales como umbeliferona, ácido p-hidroxibenzoico, flavononas, isoflavonas, entre otros fenoles (Bhattacharya et al., 2010). Estos funcionan como quimio-atrayentes que al entrar en contacto con los rizobios objetivo, activan en ellas la producción de factores de nodulación (Oldroyd and Downie 2008). Estos factores ingresan a las células de las raíces de la planta huésped y desencadenan una serie de reacciones necesarias para el comienzo de la formación del órgano nódulo (Maróti and Kondorosi, 2014). Este nódulo puede ser de tipo determinado o indeterminado.

Para el caso de *Phaseolus vulgaris*, se formará un nódulo determinado. Los nódulos indeterminados cumplen con las características de ser originados de divisiones celulares que comienzan en la corteza de la raíz, no poseen un meristemo constante y forman una esfera, por lo que contienen una zona de fijación del nitrógeno homogénea (Terpolilli et al., 2012). Otra característica es que el número de células de estos nódulos no es distinto a través del tiempo, sino que una vez que el nódulo alcanza su mayor tamaño, las células de éste crecerán para alojar a las bacterias una vez que estén en su etapa de división. La vida del nódulo termina con el proceso de senescencia que comienza al centro del nódulo y se extiende al exterior hasta causar su deterioro total (Maunoury et al., 2008). Esto como parte del envejecimiento natural del nódulo donde se pierde actividad de la nitrogenasa que es la enzima que confiere la capacidad fijadora de nitrógeno a las bacterias.

La forma de reconocer un nódulo que se encuentra en etapa senescente es visible a simple vista: cambio de color (de rosa a verde) y pérdida de turgencia (Müller et al., 2001). Al morir el nódulo determinado, las bacterias que se encontraban dentro mueren irremediablemente. La senescencia nodular está ampliamente relacionada a procesos de desarrollo en la planta, como la floración, llenado de vainas, senescencia de raíces, senescencia de la planta completa o bien, estrés biótico o abiótico. A nivel celular se pueden observar alteraciones estructurales en organelos, tales como agrupación de mitocondrias, pérdida de la capa externa de peroxisoma, decremento en la cantidad de ribosomas y mayor producción de endoproteasas (Fernández-Luqueño & Espinosa-Victoria, 2008)

### *2.3 Rhizobium tropici*

Si bien todas las leguminosas tienen la capacidad de formar relaciones simbióticas con bacterias rizobios, cada hospedero tiene una estirpe de bacterias específicas.

Para *Phaseolus vulgaris* se conocen 3 estirpes inductoras de nodulación, estas son *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* y *Rhizobium tropici*. Esta última está presente en suelos de América, Europa y África y se caracteriza por crecer bien en suelos de tipo arenosos y ácidos (Guasch Vidal.

2011). Para estas bacterias inductoras de nodulación existen dos clasificaciones que se conocen como tipo A y tipo CIAT899. La CIAT899 es capaz de relacionarse con plantas de frijol, alcanza su mejor crecimiento a 37 °C y es bastante tolerante al estrés abiótico. De hecho, se ha visto que es capaz de continuar la producción de factores nodulación bajo condiciones adversas como la alta acidez o grandes concentraciones de sal (del Cerro et al., 2017). También cumple con la característica de ser genéticamente más estable que otros rizobios, lo que la hace ideal como cepa inoculante comercial al conservar su capacidad inoculante a pesar de ser sometida a condiciones adversas (Hungria et al., 2000).

#### 2.4 Proceso de desarrollo nodular

En las leguminosas, la morfogénesis de los nódulos y la infección bacteriana están mediadas por el reconocimiento específico del hospedero de los lipoquitooligosacáridos rizobiales conocidos como factores de nodulación (NOD) (Cooper 2007). Los factores NOD comparten una estructura básica entre todos los rizobios y consiste en un esqueleto de quitina de entre 2 y 6 residuos de N-acetil-D glucosamina unidos por puentes  $\beta$ -1,4 (Oldroyd and Downie 2008). Sin embargo, la saturación de la cadena de acilos o los cambios en las unidades terminales de azúcar con grupos acetilo, metilo, carbonilo o glicósido son características químicas específicas de la especie, y esta variación estructural define la base de la especificidad huésped-simbionte, particularmente a nivel de especie (Bras et al. 2000; Liu et al., 2017).

Los factores NOD son reconocidos por la planta huésped, específicamente por receptores de quinazinas con dominio LysM (Limpen et al. 2003). Esto inicia una cascada de señalización que comenzarán en la raíz el proceso de la nodulación. Justo después de que la planta reconoce a las bacterias que son compatibles, induce el inicio de división celular cortical para comenzar la formación de primordios nodulares. Al mismo tiempo, las bacterias se encargan de empezar la infección. Los rizobios son capaces de secretar sustancias que les ayudarán a penetrar más fácilmente las células del huésped, tales como enzimas que degradan la pared celular. Así como también serán capaces de inducir a la planta a producir factores para la degradación localizada de la pared celular, tales como las pectoliasas, metil

esterasas y poliogogalacturonasas (Xie et al. 2012). Seguirán penetrando a través de un pelo radical colonizado formando un hilo de infección que atravesará las células de la capa epidérmica y penetrará progresivamente hasta llegar a las células del primordio (Jones et al., 2008).

Una vez que las bacterias colonizan las células del nódulo comienza un proceso de endocitosis. Dentro de las células, las bacterias se alojan en una estructura similar a un organelo llamado simbiosoma y es aquí donde ellas se diferencian en bacteroides fijadores de nitrógeno (Wang et al., 2018). Los bacteroides muestran cambios importantes en su transcriptoma, estructura celular y actividades metabólicas lo que les permite adaptarse mejor a su nuevo medio que es la célula y comenzar la fijación de nitrógeno. Para este punto, el nódulo continúa desarrollándose por medio del agrandamiento de sus células y no por replicación celular. Esto hasta llegar a la maduración, donde el nódulo alcanza su tamaño máximo. En cuanto a la forma de regulación, sabemos que las leguminosas tienen un sistema regulatorio sistémico llamado autorregulación de la nodulación (AUT), que implica la comunicación de los brotes y las raíces a través de dos señales presuntivas de larga distancia. Una de ellas derivada de la raíz y otra derivada del brote. La señal derivada de la raíz se genera en respuesta a los rizobios y se traslada al brote, mientras que la señal derivada del brote se traslada a la raíz para restringir la nodulación adicional (Indrasumunar and Gresshoff, 2010). Cada gen codifica una quinasa similar a un receptor que contiene 21 repeticiones ricas en leucina en el dominio extracelular (Berger et al., 2019).

### 2.5 Factores de transcripción

El desarrollo de cualquier órgano en una planta (hojas, raíces, nódulos) es orquestado por grupos de genes que encienden a otros en el momento y cantidad necesaria para la formación. En el caso de los nódulos, se conocen genes que comienzan a expresarse durante la formación y desarrollo del nódulo (Soyano and Hayashi, 2014). Algunos de estos genes pertenecen a una clasificación conocida como factores de transcripción. Los factores de transcripción son reguladores de la expresión génica. Estos tienen la capacidad de estimular la transcripción de uno o cientos de genes ya sea de forma positiva o negativa.

En su estructura poseen regiones de unión específicas a determinadas zonas del ADN en las que se especializan. Usando tales sitios de unión podemos identificarlos y clasificarlos en distintas familias (Latchman, 1997). También se sabe que la mayoría de los genes están controlados por uno o más factores de transcripción. Los sitios de unión de factores de transcripción dependen en parte del posicionamiento y arreglo de los nucleosomas, así como de eventos postraduccionales tales como la fosforilación y procesamiento de proteínas (Hobert 2008). En las plantas cumplen un papel muy importante como parte de la complejidad de la regulación transcripcional, tal es así que las leguminosas codifican más de 2000 factores de transcripción, dedicando hasta el 7 % de su secuencia codificante en ellos. Algunas familias de factores de transcripción que han sido caracterizadas en leguminosas y que cumplen un papel activo en el desarrollo de los nódulos son NIN, GRAS, bZIP, C2H2 y HD (Udvardi et al., 2007). Una de las grandes familias de factores de transcripción en eucariotas y por lo tanto en las leguminosas, es la familia MADS-box.

### 2.6 La familia MADS-box

La palabra MADS-box proviene del acrónimo formado con el nombre de grupos de genes pertenecientes a esta familia y que se descubrieron en distintos organismos: M de MCM1, A de AGAMOUS, D de DEFICIENS y S de SRF (De Bodt et al., 2003).

MADS-box comprende un conjunto de genes de características similares como un tamaño de secuencia de dominio de aproximadamente de 180 pb y codificación de dominio MADS 58 aminoácidos conservado (Kofuji et al. 2003). Si bien este dominio se encuentra conservado entre organismos como levaduras y humanos, en las plantas se le ha denominado MADS-box. En las plantas juegan un papel importante y son ampliamente conocidos por estar involucrados en procesos de desarrollo siendo su participación en la organogénesis floral su función más ampliamente estudiada (Pařenicová et al. 2003). A pesar de ello, estos factores de transcripción también se expresan en distintos órganos y tejidos, en distintas etapas del desarrollo de la planta, por ejemplo, en el endospermo, polen, parénquima, tricomas y raíces, donde desempeñan funciones específicas y que no en todos los casos han sido del ampliamente estudiadas (Garay-Arroyo et al., 2013). Una característica que

podemos encontrar como distintiva entre las proteínas reguladoras de esta familia es que funcionan como respuesta a señales ambientales, externas y fisiológicas (Heard and Dunn 1995). Se tiene reporte de que genes pertenecientes a esta familia se ven afectados por la restricción medioambiental de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y azufre, así como también modifican su expresión ante estrés osmótico y tratamientos con hormonas vegetales (Tapia-López et al. 2008; Garay-Arroyo et al., 2013).

Pocos genes de esta familia han sido estudiados durante el desarrollo de órganos vegetativos, sin embargo, hay estudios de tipo asociación de genoma completo que indican que gran parte de los genes de esta familia se expresan en distintos estadios de crecimiento y desarrollo de la planta, así como en varios órganos no solo en los reproductivos (Kofuji et al. 2003). Existen datos de la presencia de esta familia génica en órganos reproductivos de plantas de *P. vulgaris*, es decir en flores y carpelos, así como en su desarrollo vegetativo, aunque la información de su expresión en raíces aún es limitada.

Tampoco se tiene información sobre cómo esta familia génica puede estar involucrada en procesos de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium*. Este grupo de bacterias tienen la capacidad de inducir el crecimiento de nódulos en la parte radicular de la planta que es el lugar donde estas se alojarán. En un transcriptoma publicado por Nanjareddy et al. (2017) se muestran resultados que parecen indicar una expresión diferencial de ciertos genes de esta familia durante el proceso de nodulación. Uno de estos genes es el *AGAMOUS-like 8*, lo que implica que podría tener una participación durante la simbiosis entre *Rhizobium* y *P. vulgaris*.

### 2.7 El gen AGAMOUS tipo 8 o FRUITFULL

La expresión del gen *AGL8* (FRUITFULL) se ha encontrado durante fases de transición entre crecimiento vegetativo y desarrollo reproductivo en el ápice del brote. Esto es principalmente en la transición a floración y sugiere su actuación en mantenimiento de identidad del meristemo de la inflorescencia (Mandel and Yanofsky, 1995). También se tienen datos sobre este factor de transcripción de

unión al ADN en funciones importantes como la regulación de patrones de división celular, diferenciación celular, desarrollo de fruto, desarrollo de flores y mantenimiento de la identidad de meristemo de inflorescencia (Gu et al. 1998; Uniprot 2018).

La base de datos del recurso de información de *Arabidopsis* TAIR (Berardini et al., 2015) no muestra asociaciones previas del gen *AGL8* a procesos de desarrollo de raíz. Sin embargo, en la plataforma Phytozome 12 (Goodstein et al. 2011) se menciona una expresión baja en nódulos. En la misma plataforma existen datos del gen y de acuerdo con la plataforma Phytozome 12, el gen *AGL8* presenta una región codificante de 744 pb, así como una región promotora de 1000 pb. La secuencia codificante se encuentra dentro del cromosoma 9 (Bras et al., 2000).

### 2.8 Biotecnología en *Phaseolus vulgaris*

La búsqueda de alternativas al uso desmedido de fertilizantes nitrogenados nos lleva al uso de herramientas como la biotecnología. El uso de la biotecnología nos permite hacer estudios sobre cómo funcionan en la naturaleza las relaciones simbióticas y si es posible hacer estas relaciones más eficientes y quizá hasta trasladar estas ventajas a otras plantas no leguminosas. Las técnicas biotecnológicas implementadas para el mejoramiento de frijol han mejorado durante los años recientes. Una de las herramientas que ha avanzado enormemente en otros cultivos es la ingeniería genética pues esta permite sobrepasar los límites del mejoramiento clásico, enfocándose en introducciones de resistencias a estrés biótico y abiótico, mejorando así el rendimiento del cultivo y su calidad (Tohidfar and Khosravi 2015). Sin embargo, este tipo de transformaciones no han sido sencillas en plantas de frijol puesto que requieren una gran cantidad de tiempo. Sin embargo, es interesante poder aplicar técnicas biotecnológicas en esta planta que permitan estudiar más a fondo su relación simbiótica con las bacterias rizobios y de esta forma abrir la posibilidad de implementar esta característica en otras plantas.

Algunas de las técnicas que se han probado en frijol son el bombardeo de partículas a callos de frijol, ápices y semillas, microproyectiles de alta velocidad y biobalística (Svetleva et al., 2003). Si bien estos métodos podrían llegar a ser

efectivos en el caso de estar buscando una línea transgénica capaz de transferir la nueva construcción hacia su progenie, resultan ser procesos lentos y económicamente costosos para fines de investigación. Una alternativa muy viable es la infección por medio de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. La bacteria *A. tumefaciens* es ampliamente conocida por inducir tumores en la zona de inoculación del hospedero mediante los cuales existe una transferencia genética entre la planta huésped y la bacteria (Hiei et al., 1997).

### 2.9 *Agrobacterium rhizogenes*

*Agrobacterium rhizogenes*, es una bacteria que causa el síndrome de “raíces peludas” que nacen a partir de un callo (Tepfer, 1990). Este síndrome se caracteriza por una proliferación abundante de raíces adventicias en el sitio de infección, las cuales son generalmente más delgadas que el resto del sistema radicular (Moore et al., 1979). Estas raíces estarán expresando la construcción con la que fue transformada *A. rhizogenes* gracias a que la bacteria transfiere su plásmido de tipo inductor de raíz (Ri) a las células infectadas y que es homólogo al plásmido inductor de tumor (Ti) presente en *Agrobacterium tumefaciens* (Sinkar et al., 1987). Este plásmido transfiere a la célula del huésped un fragmento de ADN conocido como T-ADN. La transferencia de T-ADN está mediada por un segmento del plásmido conocido como de virulencia (vir).

Las raíces peludas pueden ser inducidas en distintos tejidos de las plantas, por ejemplo, tallos, hojas, hipocótilo, pecíolo, la punta del brote, el cotiledón, el protoplasto, raíces de almacenamiento y el tubérculo. Este sistema ha sido aprovechado para inducir genes diana en diversas plantas. Estas raíces tienen la ventaja de crecer rápido y se puede comprobar la transgénesis mediante el uso de técnicas simples como el ensayo tipo GUS que consiste en una construcción con un gen reportero que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa, o la detección por medio de la expresión de proteína verde fluorescente GFP, esto dependiendo del vector usado para la transformación (Cardarelli et al., 1987). Además, las raíces transformadas tienen la ventaja de representar un experimento de raíces *in situ*, son genéticamente estables, y permiten hacer estudios de interacción en la rizósfera de la planta (Tepfer, 1990). Dependiendo de la plasticidad de la planta también es posible hacer



una regeneración de estas plantas transformadas a través del callo inducido (Ackermann, 1977).

Las raíces peludas para la preparación de plantas transgénicas son una herramienta imprescindible que permite estudiar las interacciones entre las raíces de las plantas y los microorganismos que viven en la rizósfera. Esto nos ha permitido comprender la función de múltiples genes y estudiar aspectos moleculares de los procesos y sistemas biológicos (Veena and Taylor, 2007).

#### 2.10 Análisis funcional de genes por promotores génicos

Podemos definir un promotor génico como el procesador central de la regulación génica, el cual abarca la región 5' de la secuencia del transcrito que se ubica aguas arriba del sitio de la transcripción (Porto et al., 2014).

El estudio de genes por medio de sus promotores es una tecnología que ha permitido obtener información de cómo interactúa dicho gen en diversos órganos y etapas de crecimiento en las plantas.

Para su estudio es común usar vectores binarios que contienen un gen reportero, por ejemplo, GUS. La fusión en el vector entre el gen de interés y el gen de GUS permite estudios histoquímicos y análisis de expresión cuantitativa en diversos órganos de la planta (Nakagawa et al., 2007). También se puede usar este sistema para determinar el patrón de expresión en tejidos como las raíces.

#### 2.11 Análisis de localización proteica

El estudio de la localización espacial de proteínas dentro de una célula es posible gracias a la clonación molecular de la proteína verde fluorescente (GFP) proveniente de *Aequorea victoria*. La proteína verde fluorescente (GFP) es una molécula cuya flexibilidad permite su expresión en una gran cantidad de organismos eucariotas, esto incluye a las plantas superiores (Grebenok et al., 1997). GFP funciona por medio de la unión mediante un vector a un promotor específico y el gen de interés. Esta expresión se puede analizar con excitación de luz azul, haciendo a la proteína fácil de detectar. Al tener una secuencia pequeña el gen de GFP es improbable que interfiera con la función original del gen, además de que es una proteína no tóxica para las células. (DeBlasio et al., 2010).

Sistemas de vectores de clonación por recombinación como lo es GATEWAY™ han facilitado la transformación de diferentes plantas por medio de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* con la facilidad de tener varios marcadores de detección, permitiendo conocer el desarrollo de la proteína dentro de la célula (Karimi et al., 2002). Este sistema permite ver la localización en diferentes organelos celulares, por ejemplo las mitocondrias, cuerpos de golgi, retículo endoplásmico o el núcleo (Veena and Taylor, 2007). Otras ventajas con las que cuenta este sistema es que se puede ver fácilmente la fluorescencia *in vivo*, a diferencia del uso del ensayo con GUS.

### 2.12 Análisis funcional de un gen a través de la sobreexpresión

Sobreexpresar un gen consiste básicamente en unirlo a un promotor de expresión constitutiva que permita tener siempre disponible la transcripción de este. Entonces al sobreexpresar un gen se obtienen múltiples copias de este, pudiendo causar diferentes fenotipos. Según el tipo de proteína que se esté estudiando, se puede recurrir a algunos de estos promotores que son comúnmente usados y ampliamente probados, tal como el CaMV 35S y el 19S (Dong et al., 1991) . Esta construcción se encontrará en un vector que sea compatible con *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*. El objetivo principal de introducir esta construcción en células de plantas será producir transgénesis que permitirá observar de manera fenotípica cómo el aumento de la expresión de este gen modula ciertos rasgos de interés. Esto permite asignar funcionalidades y se puede estudiar el cambio en diferentes órganos de la planta (Lloyd, 2003).

### 2.13 La familia MADS-box en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas

A pesar de lo bien estudiada y caracterizada que se tiene a esta familia de factores de transcripción en respuesta a factores externos y diferenciación de flores y frutos, poco se sabe acerca de su participación en fenómenos como la simbiosis. Sin embargo, ya se han iniciado algunos estudios acerca de su participación en este proceso. Se encontró que el gen *NMH7* se expresa mayormente en las células infectadas por *Rhizobium* en raíces de plantas de alfalfa. A pesar de que este no se encuentra en meristemas, vasculatura o tejidos, sí se encuentra involucrado en actividades de diferenciación en la formación del nódulo (Heard and Dunn, 1995).

En alfalfa también se identificó expresión del gen *NMH7*, perteneciente a la familia MADS-box, durante el desarrollo nodular. Debido a sus patrones de expresión se piensa que podría estar involucrado en el proceso de diferenciación celular, así como la activación de genes específicos para nodulación. Por otra parte, el gen *GmNMH7*, también perteneciente a MADS-box se ha relacionado con la regulación de genes en la etapa de nodulación temprana en plantas de soya. Esta regulación resultó ser de tipo negativa, es decir, controla el número de nódulos necesarios para la planta, evitando así un gasto innecesario de energía que podría terminar afectando a la planta (Wei et al., 2019).

En frijol común se encontró que el micro-RNA172 tiene como objetivo la región conservada del gen *APETALA 2*, también perteneciente a MADS-box. Este funciona como un regulador de tipo postranscripcional durante la simbiosis rizobio-leguminosa. Se hizo un análisis funcional que mostró su aumento durante la infección de rizobias, durante el desarrollo del nódulo y llegando a su máximo durante el estadio de nódulo maduro (Nova-Franco et al., 2015). Esto implica que distintos genes de la familia MADS-box están implicados en procesos de nodulación y simbiosis entre leguminosas y rizobios.

En el presente proyecto, se realizó un análisis funcional de un gen *AGAMOUS* durante la simbiosis con rizobios en el frijol. En una primera etapa se realizará el análisis bioinformático de la familia, esto incluye análisis fenográfico, motivos, perfiles de expresión en tejidos de frijol y análisis de expresión del gen *AGAMOUS LIKE 8* durante la simbiosis específica. A continuación, clonamos y caracterizamos el promotor y la localización subcelular de *AGL8*. Finalmente, sobreexpresamos el *AGL8* en frijoles y estudiamos el fenotipo de nodulación.

### 3. Antecedentes

Existe una relación simbiótica generalizada entre plantas leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. El beneficio que obtienen las plantas es la adquisición efectiva de nitrógeno en sus raíces. La simbiosis de *Rhizobium* es un proceso de desarrollo complejo que involucra diferentes etapas, como la comunicación presimbiótica, la invasión y la formación de nódulos (Wang, Liu, and

Zhu, 2018). Los genes esenciales para el establecimiento de la simbiosis entre ambas especies se están estudiando ampliamente para comprender el mecanismo de la vía simbiótica. Hasta ahora, el papel funcional de varios genes específicos de nodulación y factores de transcripción se han caracterizado en las leguminosas (Udvardi et al., 2007) . Sin embargo, los genes del hospedero y los factores de transcripción responsables de la formación nodular y la expansión celular durante la simbiosis han sido poco estudiados. En una publicación reciente (Nanjareddy et al., 2017), se han enumerado los genes y factores de transcripción que son específicos de la simbiosis con rizobias en frijol utilizando análisis transcriptómicos globales. AGAMOUS-like 8 se reporta como factor de transcripción MADS-box de los genes altamente expresados específicamente en raíces con presencia de nódulos. En las plantas, los factores de transcripción MADS-box son reguladores clave de varios procesos de desarrollo y desempeñan una función crucial en el desarrollo de las raíces, la expansión celular y la diferenciación.

#### 4. Justificación

La familia génica MAD-BOX fue seleccionada por su perfil transcriptómico de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa RT-qPCR y secuenciación de transcriptoma completo RNA-Seq hecho anteriormente (Nanjareddy et al. 2017) donde se muestra una alta expresión diferencial de genes pertenecientes a esta familia, especialmente del gen AGAMOUS-LIKE 8 en procesos de simbiosis. Este gen se ha estudiado en relación con procesos de crecimiento y desarrollo de fruto en plantas angiospermas, revelando su importancia en la diferenciación y elongación celular. Por ello planteamos la posible implicación de este factor de transcripción durante el proceso de desarrollo nodular entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium*. Se realizó un estudio por medio de software bioinformático para tener información sobre análisis de árboles fenográficos, análisis de estructura y análisis de motivos, así como confirmar el análisis de expresión diferencial a partir del transcriptoma generado con anterioridad. El elucidar los mecanismos de acción de factores de transcripción responsables de la relación simbiótica sirve principalmente como un reservorio que permitirá en el futuro entender mejor cómo se lleva a cabo esta simbiosis específica y de esta forma

dirigir los esfuerzos del mejoramiento genético hacia estos procesos, mejorando así la eficiencia en plantas para atraer mejores candidatos para la fijación de nitrógeno y de esta forma beneficiar a la producción de cultivos tan importantes como lo son las leguminosas en México y el mundo.

## 5. Hipótesis

El gen AGAMOUS-like 8 está involucrado en el desarrollo de los nódulos, participando en etapas clave como la división, expansión y diferenciación celular.

## 6. Objetivo general:

Caracterizar la función del gen *AGL8* durante la relación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium* mediante estudios de expresión, análisis de promotores, localización subcelular y sobreexpresión.

Objetivos específicos :

1. Identificar la familia de genes MADS-box en *Phaseolus vulgaris* mediante análisis bioinformático.
2. Identificar los patrones de expresión de *AGL8* en tejidos de frijol.
3. Clonar la región promotora del gen *AGL8*.
4. Analizar la expresión espacio-temporal del promotor *AGL8* en raíces de frijol bajo condiciones de simbiosis con *Rhizobium*.
5. Clonar y estudiar la localización subcelular del *AGL8* en las raíces del frijol.
6. Aislar y clonar el gen *AGL8* en vector binario para estudios de sobreexpresión.
7. Generar raíces pilosas transgénicas que sobreexpresan *AGL8* y su validación por RT-PCR.
8. Realizar estudios histológicos de las raíces transgénicas que sobreexpresan *AGL8* en frijoles en diferentes etapas de simbiosis con rizobias.

## 7. Métodos

### 7.1 Selección del gen *AGL8*

Se realizó un análisis transcripcional global previo que reveló genes candidatos que mostraban expresión diferencial durante el desarrollo de la relación simbiótica entre la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Phaseolus vulgaris* (Nanjareddy et al., 2017). El gen *AGL8* se expresó positivamente durante el desarrollo de raíces y de nódulos. Se identificó la secuencia del gen en la base de datos de genoma de *Phaseolus vulgaris* en Phytozome versión 12.1.6 <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#> (Goodstein et al., 2011). El promotor del gen se determinó tomando en cuenta la región de 933 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *AGL8* (Phvul.009G203400.1). Para el estudio de la localización subcelular se seleccionó la región codificante completa (744 pb) del gen. Mientras que, para la sobreexpresión de *AGL8*, consideramos una región de codificación completa más 127 pb de la región 3'UTR, es decir, 871 pb. Se diseñaron oligos directos e inversos específicos para cada una de las clonaciones anteriores (Tabla 1).

### 7.2 Aislamiento de ADN de *Phaseolus vulgaris*

Se hizo aislamiento de ADN de raíces de plántulas de frijol con dos días de germinación. Se tomaron 100 mg de material radicular y se hizo la extracción por medio del kit DNeasy plant mini kit de Qiagen® siguiendo las indicaciones del proveedor. Se hizo la verificación de calidad de la extracción por medio de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 marca Thermofisher.

### 7.3 Análisis fenográfico de la familia AGAMOUS

Las secuencias genómicas de frijol se obtuvieron del sitio Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>; Goodstein et al. 2012). Esto tomando como guía la información publicada en la base de datos de factores de transcripción de plantas PlantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/tf.php?sp=Pvu&did=Phvul.001G186400.1>). Las proteínas de MADS-box de *P. vulgaris* se alinearon con las pertenecientes a MADS-box en *A. thaliana* con el fin de hacer la clasificación por grupos. Todas las secuencias de proteínas candidatas de MADS-box se alinearon utilizando ClustalW con los parámetros

predeterminados. Se generaron los árboles fenográficos de todas las proteínas de MADS-box usando MEGA 7 (Tamura et al. 2011) con el método de unión de vecinos aplicando los siguientes parámetros: corrección de poisson, eliminación por pares y bootstrap (1000 réplicas).

#### 7.4 Diseño de oligos específicos para promotor AGL8 y localización subcelular

Se diseñaron oligos que cumplieran la amplificación del fragmento que se consideró como región promotora (933 pares de bases).

Para generar la construcción del promotor AGL8-glucuronidasa (GUS), se identificó y aisló del ADN genómico de *P. vulgaris* un fragmento de 933 pb del promotor AGL8 que estaba río arriba de los codones de iniciación de la traducción. Se usó la herramienta gráfica SnapGene software (Biotech 2020). así como Oligocalc (Kibbe 2007). Los oligos para la amplificación del fragmento de localización se diseñaron del mismo modo, con la excepción de que aquí se tomó toda la región codificante (744 pb) para el diseño, quedando como se muestra en la Tabla 1. Estos mismos oligos fueron usados para amplificar el promotor y para el estudio de sobreexpresión del gen *AGL8*.

#### 7.5 Amplificación de fragmento del promotor del gen AGL8

Se amplificó el fragmento del promotor por medio de la técnica de PCR. Se prepararon 50  $\mu$ L de reacción que contenía: 4  $\mu$ L ADN (100 ng) de raíz de frijol, 5  $\mu$ L de 10x PCR buffer(-MgCl<sub>2</sub>), 1  $\mu$ L de 10 $\mu$ M dNTP, 1.5  $\mu$ L de 50  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 0.3  $\mu$ L Platinum® Taq ADN Polymerase de Invitrogen 2.2  $\mu$ L de mezcla de oligos forward y reverse a 10  $\mu$ M, 35.8  $\mu$ L de agua desionizada. Las condiciones del termociclador fueron: 4 minutos a 94 °C para desnaturalización inicial seguido por 34 ciclos fraccionados en 45 segundos a 94 °C para desnaturalización, 45 segundos a 60°C para alineamiento y extensión de 2 minutos y 30 segundos a 72 °C. Finalmente 10 minutos de extensión final. La reacción fue teñida con Thermo Scientific 6X ADN

Loading Dye, posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1% teñido con Syber safe® durante 35 minutos a 120 V.

Para la construcción de localización de *AGL8* se siguió el mismo procedimiento. El fragmento amplificado fue purificado con el kit Thermo Scientific™ GeneJET® Gel Extraction Kit.

Tabla 1: Oligos específicamente diseñados para promotor y para el estudio de la localización subcelular, así como la sobreexpresión.

Primers para promotor					
<b>PrAGL8 For</b>	5'-GCAAACAAAATCCATGGTG-3'	53° TM	42% GC	19 pb	
<b>PrAGL8 rev</b>	5'-CCTCTCCCATATTCTACC-3'			57.5°TM	53%GC 19 pb
Primers para localización subcelular					
<b>AGL8 For</b>	5'-CACCGAATATGGGGAGAGGAAGGGGTG-3'			64°TM	55%GC 21 pb
<b>AGL8 Rev</b>	5'-CCAGCTGAATTCATGGGGTG-3'			60.5°TM	GG%GC 20 pb

#### 7.6 Introducción de fragmento a vector binario pENTR

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se hizo la ligación del fragmento de prAGL8 y del fragmento de LocAGL8, ambos amplificados con anterioridad al vector de entrada pENTR™SD/D-TOPO® (Invitrogen).

En primer lugar, aguas arriba del sitio de inicio de la traducción de *AGL8*, se identificó una secuencia promotora de 933 pb del genoma de *Phaseolus vulgaris* (Phytozome 12.0). Diseñamos oligos directos e inversos que tenían un contenido de GC superior al 40 %, tenían una TM no mayor de 5°C de diferencia entre ellos, tenían una secuencia CACC en el extremo 5 'del oligo directo (para la clonación direccional en un pENTR-Gateway vector), y tenían un tamaño entre 23 y 19 pb, respectivamente para los oligos hacia adelante y hacia atrás, como se muestra en la Tabla 1. Se obtuvieron los oligos hacia adelante y hacia atrás que cumplieron con un porcentaje de GC mayor al 40 %, tuvieron una TM no mayor a 5°C de diferencia entre sí, contaron con una secuencia CACC en el extremo 5 'y fueron de un tamaño entre 18 y 25 pb, quedando finalmente como se muestra en la tabla 1.

Se utilizó ADN genómico de *Phaseolus* recién aislado como plantilla y se amplificó el fragmento del promotor *AGL8* con los oligos anteriores y la "polimerasa



Platinum TAQ de alta fidelidad" mediante análisis de PCR. En condiciones de PCR, se estableció una temperatura de unión de oligonucleótidos de 56 °C. El tamaño de la banda se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1 %). Esto correspondía al tamaño esperado, es decir, 933 pb (figura 6A).

Se escindió el fragmento de 933 pb del gel de agarosa y se clonó en un vector de entrada perteneciente a la tecnología Gateway. Este vector de entrada fue el pENTR / D-TOPO (Figura S1), compatible con células competentes de *E. coli* TOP10.

#### 7.7 Transformación de células competentes *E. coli* TOP10

Se usó un vial de 50 µL de células *E. coli* químicamente competentes One Shot™ TOP10 Invitrogen™ para introducir en ellas el vector ligado prAGL8, así como el vector para estudio de localización LocAGL8, esto siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las células fueron plaqueadas en cajas petri con medio Luria-Bertani (LB) sólido complementado con 50 mg/L de antibiótico kanamicina. Se comprobó que las colonias resultantes fueran positivas a la inserción del plásmido pENTR-AGL8 por medio de PCR de la siguiente manera 10 µL de GoTaq® ADN Polymerasa, 2 µL de plásmidos M13 específicos para vector, 8 µL de agua con bacterias disueltas tomadas de cada colonia. Dos colonias que resultaron positivas para la prueba de PCR fueron crecidas en medio LB líquido para su posterior extracción del plásmido con el kit PureLink® Quick de Invitrogen. Para confirmar la extracción correcta del plásmido se hizo un PCR con: 10 µL de polimerasa GoTaq® ADN Polymerase, 1 µL del plásmido, 2 µL de los oligos específicos y 7 µL de agua.

#### 7.8 Introducción de vector pBGWFS7.0 a *Agrobacterium rhizogenes*

Se eligió una de las muestras de plásmido para continuar tanto de prAGL8 como de LocAGL8. Con ellas se realizó una reacción de PCR con oligos M13 para cortar el fragmento, usando como polimerasa la DreamTaq™ Hot Start de ThermoFisher según las instrucciones del fabricante. Para el estudio de promotor se obtuvo un fragmento de 1257 pb, el cual fue ligado al vector binario pBGWFS7.0 usando: 3.0 µL de pBGWFS7.0, 5.0 µL de fragmento de PCR, y 1 µL de Mix enzimático Gateway™ LR Clonase™, todo esto incubando a temperatura ambiente

toda la noche. Por otra parte, el fragmento para *LocAGL8* fue ligado del mismo modo al vector pEARLY104. Pasadas 24 horas, se agregó 1 µL de proteinasa K y se dejó incubar 10 minutos a 37 °C. Se transformaron nuevamente bacterias *E. coli* top 10, verificando por PCR como se hizo anteriormente. Al final se aisló el plásmido y se verificó por PCR también como se hizo anteriormente. Cada plásmido se introdujo a *Agrobacterium rhizogenes* por medio de 1 pulso de electroporación a 1.7 KiloVolts.

Se comprobó la correcta transformación de las colonias resultantes por medio de una PCR con los oligos específicos de promotor y localización para verificar inserción del plásmido dentro de la bacteria. Las cepas exitosas se guardaron en glicerol al 90 % en refrigeración a -80 °C para su uso posterior.

#### 7.9 Crecimiento de plantas *Phaseolus vulgaris*, producción de raíces peludas e inoculación.

Las semillas de frijol negro Jamapa se esterilizaron en la superficie: Se da un enjuague a las semillas con agua corriente, 1 minuto en alcohol industrial, 5 minutos en hipoclorito de sodio al 20 % (v/v) y 3 enjuagues con agua estéril. Las semillas se germinaron colocándolas en una bandeja húmeda con papel absorbente sobre la cual se colocaron las semillas de manera ordenada, asegurándose que el sitio de salida de la radícula estuviera en la misma dirección. A los 3 días, las semillas se inyectaron en el hipocótilo con la construcción de *Agrobacterium rhizogenes* que contenía la construcción del vector *prAGL8* recién preparado, que se cultivó previamente en medio LB sólido con espectinomicina 100 µg/mL como prevención de contaminación bacteriana. Las plántulas lesionadas se mantuvieron en una preparación de tubo de vidrio de 20 cm y se taparon y se dejaron crecer en una incubadora con 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad, esto para favorecer la producción de raíces peludas. A los 15 días después de la inyección, las plantas que contenían raíces peludas se transfirieron a un medio de vermiculita estéril. Solo se dejaron las raíces peludas, se eliminaron el resto de las raíces primarias. Las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento y se regaron con solución nutritiva ByD.

### 7.10 Ensayo tipo GUS

Se preparó el buffer GUS con:  $K_2HPO_4$  al 100 mM,  $KH_2PO_4$  100 mM, EDTA 10 mM, Tritón X al 0.1%,  $K_3Fe(CN)_6$  0.5 mM,,  $K_4Fe(CN)_6$  0.5 mM y X-gluc 1mM.

Se cortaron las “Raíces peludas” de las plantas de frijol tras 15 días después de su inoculación con *A. rhizogenes* y se colocaron en cajas petri sumergidas totalmente en el buffer GUS. Se incubaron toda la noche (16 horas como máximo) a 37 °C aisladas de la luz. Pasado el tiempo de incubación se enjuagaron con agua desionizada y posteriormente se dejaron por 2 horas en hipoclorito de sodio al 1 %. Se procedió a su observación en el estereoscopio.

### 7.11 Análisis de localización subcelular

Las raíces peludas transgénicas se verificaron con la construcción diseñada para la localización de AGL8 mediante un estereoscopio de fluorescencia. Posteriormente, en condiciones de frío, se cortaron las raíces y se colocaron en portaobjetos con medio ByD para fijar el cubreobjetos. Las muestras se analizaron inmediatamente en un microscopio confocal ZEISS LSM-710-NLO (Centro de Investigaciones en Óptica, León, GTO) y se fotografiaron las imágenes.

### 7.12 Inoculación con *Rhizobium*

Se creció *Rhizobium tropici* CIAT 899 usando medio peptone-yeast extract (PY) como medio de cultivo líquido (Toledo et al. 2003) usando 10mg/mL de rifampicina como antibiótico, a 28 °C en movimiento. Una vez crecido el cultivo se inocularon 3 ml. en las plantas colocadas en sustrato sólido. Para verificación de hilos de infección se usó cepa bacteriana con construcción GUS.

### 7.13 Análisis de sobreexpresión en raíces de *Phaseolus vulgaris*.

Se crecieron plantas con raíces peludas transgénicas de sobreexpresión tal como se explica en el punto 5.9. Al día siguiente de su traspaso a medio sólido (vermiculita) se inocularon 3 ml de cultivo de *R. tropici* con construcción de GUS. A los 10 a 30 días post-inoculación se extrajeron las raíces del sustrato con la finalidad de verificar el tamaño y cantidad de los nódulos que crecieron y verificar si existía alguna diferencia entre las plantas control y las de sobreexpresión. Para verificar que realmente estuviera ocurriendo una sobreexpresión se llevó a cabo un análisis de PCR semicuantitativo. Para este se tomó material de raíz de ambos tratamientos

y se congeló inmediatamente con hielo seco. Posteriormente se hizo la extracción de ARN total con ayuda del kit “Spectrum™ Plant Total RNA Kit” QUIAGEN™. Con el ARN se procedió a hacer cADN. Este se usó como templado en una reacción de PCR con el uso de primers de la proteína acuaporina, con la finalidad de usarlo de control e igualar las concentraciones entre ambos tratamientos. Una vez lograda la concentración igual, se realizó la misma PCR, pero con los primers del gen *AGL8*. Así, de forma visual podemos observar si existió variación en la cantidad de expresión que se está produciendo a los 30 dpi.

## 8. Resultados

### 8.1 La familia génica de *AGL8* en *Phaseolus vulgaris* está compuesta por dos subfamilias

Para realizar la identificación en todo el genoma de genes MADS-box en *Phaseolus vulgaris*, buscamos en la base de datos PlantTFDB 5.0 (<http://planttfdb.gao-lab.org/>) e identificamos todos los genes putativos pertenecientes a la familia MADS-box que están presentes en el genoma de *Phaseolus vulgaris*. Se identificaron un total de 92 miembros de la familia MADS-box en el genoma de *P. vulgaris*. Esta familia de factores de transcripción se divide en dos subfamilias: MADS tipo MIKC y MADS tipo M. Ambas subfamilias se pueden identificar mediante los dominios proteicos característicos, que son el SRF para las tipo M y el MEF2 para la subfamilia MIKC (Castelán-Muñoz et al., 2019).

El fenograma de los genes de la subfamilia de *P. vulgaris* se construyó usando un método NJ. El tipo MICK con 43 secuencias (Figura 1 A) y las de tipo M con 49 (Figura 1 B). Cada subfamilia de genes se clasificó en 3 grupos principales.

Los grupos principales se dividieron en 2-4 grupos menores en cada subfamilia. La mayoría de los genes vegetales bien estudiados son genes de tipo MICK y tienen tres dominios desde el extremo N al C terminal de la proteína: dominio intermedio (I) (~ 30 codones), dominio de espiral (K) similar a la queratina (~ 70 codones) y dominio C terminal (C) (longitud variable). Estos genes se denominan de tipo MIKC y son específicos de las plantas (dePamphilis et al., 2003).

## 8.2 Análisis estructural de la familia de genes MADS-box:

Para comprender las características estructurales de los genes de MADS-box de *P. vulgaris*, se llevó a cabo un análisis de la distribución entre intrones y exones individualmente para los genes de subfamilia de tipo MICK y tipo M. Esto se hizo con la ayuda del 'Gene Structure Display Server 2.0' (<http://gsds.gao-lab.org/>). Los resultados de dicho análisis se muestran en la figura 2. Entre los miembros de la familia MICK se puede observar un rango de entre 6 y 12 intrones, siendo 7 el número predominante (Figura 2A). La mayoría de los de tipo MICK tienen una distribución y una longitud conservadas para cada exón. Los genes de tipo MICK se mapearon en los 11 cromosomas de *P. vulgaris*, entre ellos un máximo de 6 genes estaban presentes en el cromosoma 2 y un mínimo de 1 gen en los cromosomas 10 y 11.

En la subfamilia de tipo M, los genes tienen un rango entre 1 y 8 exones (Figura 2B). Una gran parte de ellos tienen una longitud y distribución conservadas para cada exón. Los genes de tipo M se asignan a 9 de los 11 cromosomas. Entre ellos, un máximo de 9 genes estaba presente en el cromosoma 2 y un mínimo de 1 gen en el cromosoma 11. Los genes de tipo M estaban ausentes en los cromosomas 5 y 8.

También se llevó a cabo un análisis de motivos conservados en la plataforma MEME para identificar cada gen como parte de la familia o subfamilia (Fig 3). Fueron enviados a la plataforma SMART para identificar dominios conservados. En la subfamilia de tipo MICK, se encontraron 5 motivos, de los cuales el motivo 1 fue predominante. Esto se representa en rojo en la Figura 3 A.

Lo mismo se llevó a cabo para los genes que se encuentran en la subfamilia tipo M, para los cuales se encontraron 7 motivos distintos, siendo el 1, 5 y 6 los predominantes. Se representan gráficamente en la Figura 3 B.

Se identifica como una representación del dominio Keratin-lik (K), que es el más conservado y esencial para las interacciones proteína-proteína entre factores de transcripción de la familia MADS-box. Este tiene un tamaño de entre 60 y 80 aminoácidos.

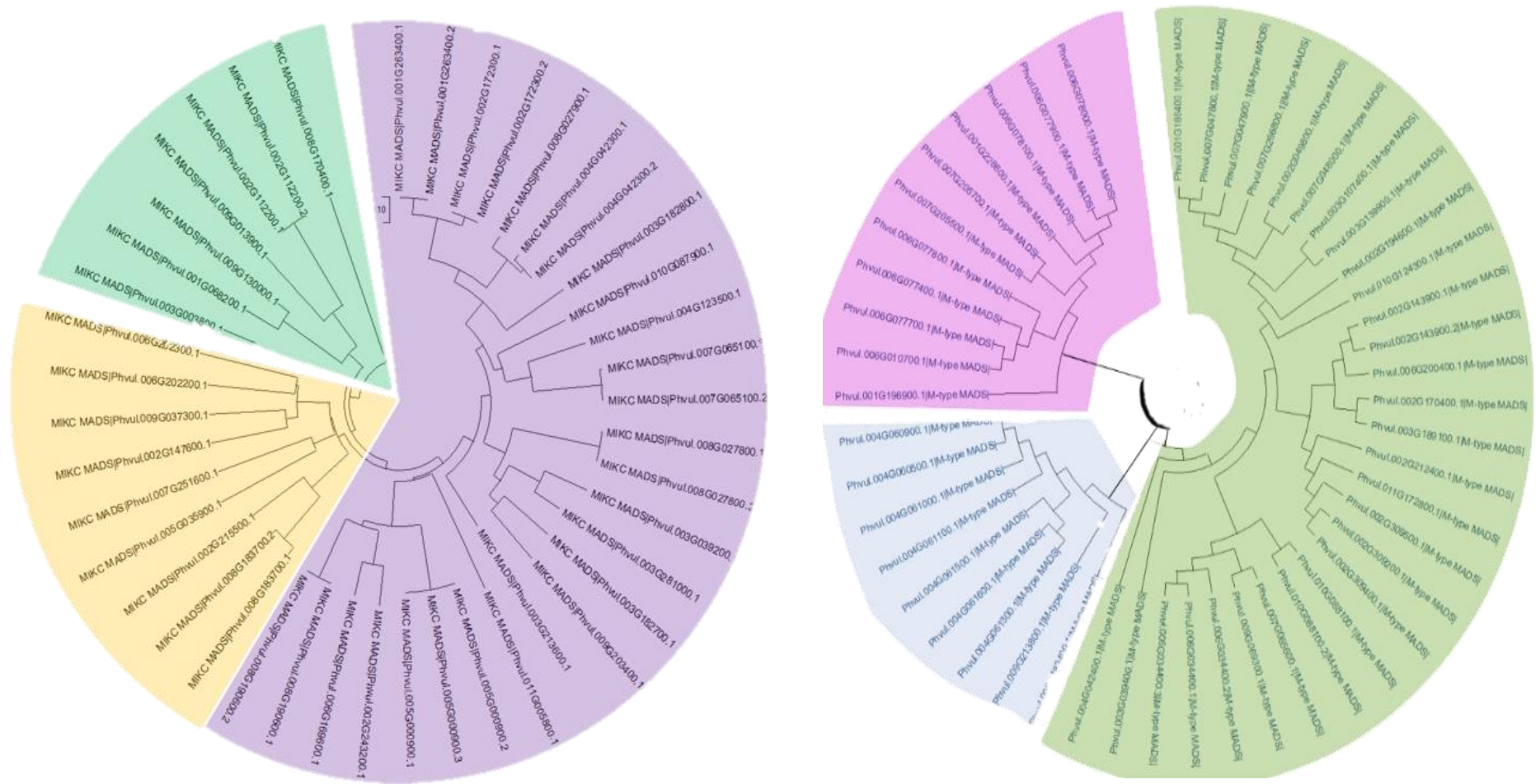
También se llevó a cabo un análisis de motivos conservados en la plataforma MEME para identificar cada gen como parte de la familia o subfamilia (Fig 3). Fueron enviados a la plataforma SMART para identificar dominios conservados. Se predijeron un total de 7 motivos conservados, aquí los nombramos en números consecutivos del 1 al 7. El motivo 1 se encontró en todos los genes pertenecientes a MADS-box, en ambas subfamilias. Este motivo se identifica como una representación del dominio Keratin-like (K), que es el más conservado y esencial para las interacciones proteína-proteína entre factores de transcripción de la familia MADS-box. Este tiene un tamaño de entre 60 y 80 aminoácidos.

En la subfamilia de tipo MICK, el dominio 2 estaba presente en casi todos los genes. Esto se representa en la Figura 3 A.

Para la subfamilia tipo M encontramos que los motivos 2, 4 y 5 son los predominantes. Se representan gráficamente en la Figura 3 B.

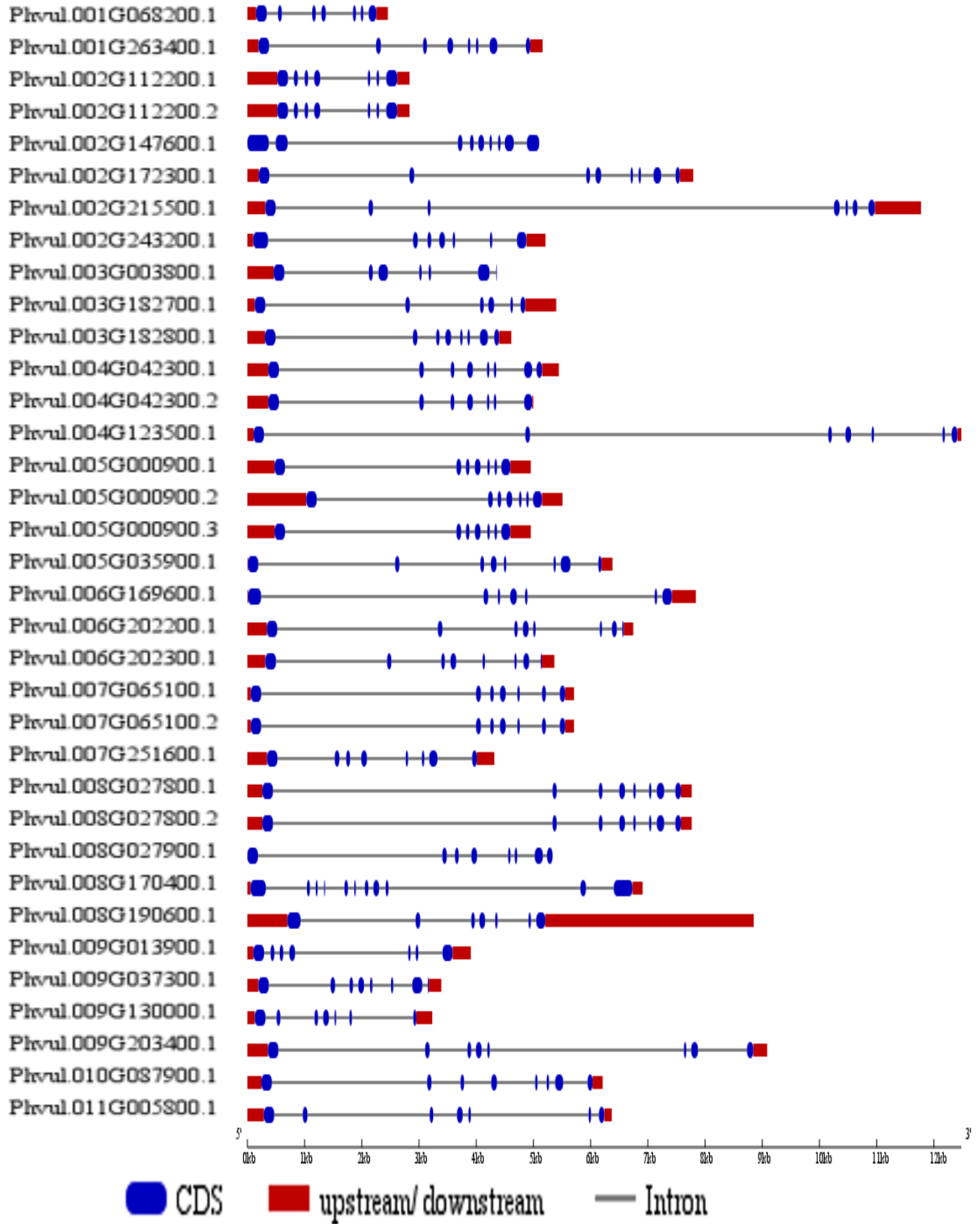
#### 8.2.1 AGL8 es regulado al alza durante el desarrollo de nódulos en frijol.

En las plantas, los genes MADS-box participan en el control de todos los aspectos principales del desarrollo, incluido el desarrollo de gametofitos masculinos y femeninos, el desarrollo de embriones y semillas, así como el desarrollo de raíces, flores y frutos (Becker and Theißen 2003; Gramzow and Theissen, 2010). Sin embargo, la participación de los genes de MADS-box en el desarrollo de nódulos rizobianos *de novo* en leguminosas es poco conocida. Para ello, se requiere identificar los genes de MADS-box que son específicos de la simbiosis leguminosa-rizobios. Primero identificamos en base a los datos transcriptómicos de *P. vulgaris* (Nanjareddy et al., 2017) genes de MADS-box expresados diferencialmente en raíces noduladas inducidas por rizobios en *P. vulgaris*. Se construyeron mapas de calor basados en el nivel de expresión de cada subfamilia (Figura 4). Observamos que tres genes para la subfamilia MICK y uno para la subfamilia tipo M (Figura 4) fueron específicamente regulados al alza durante el desarrollo de nódulos en el frijol.



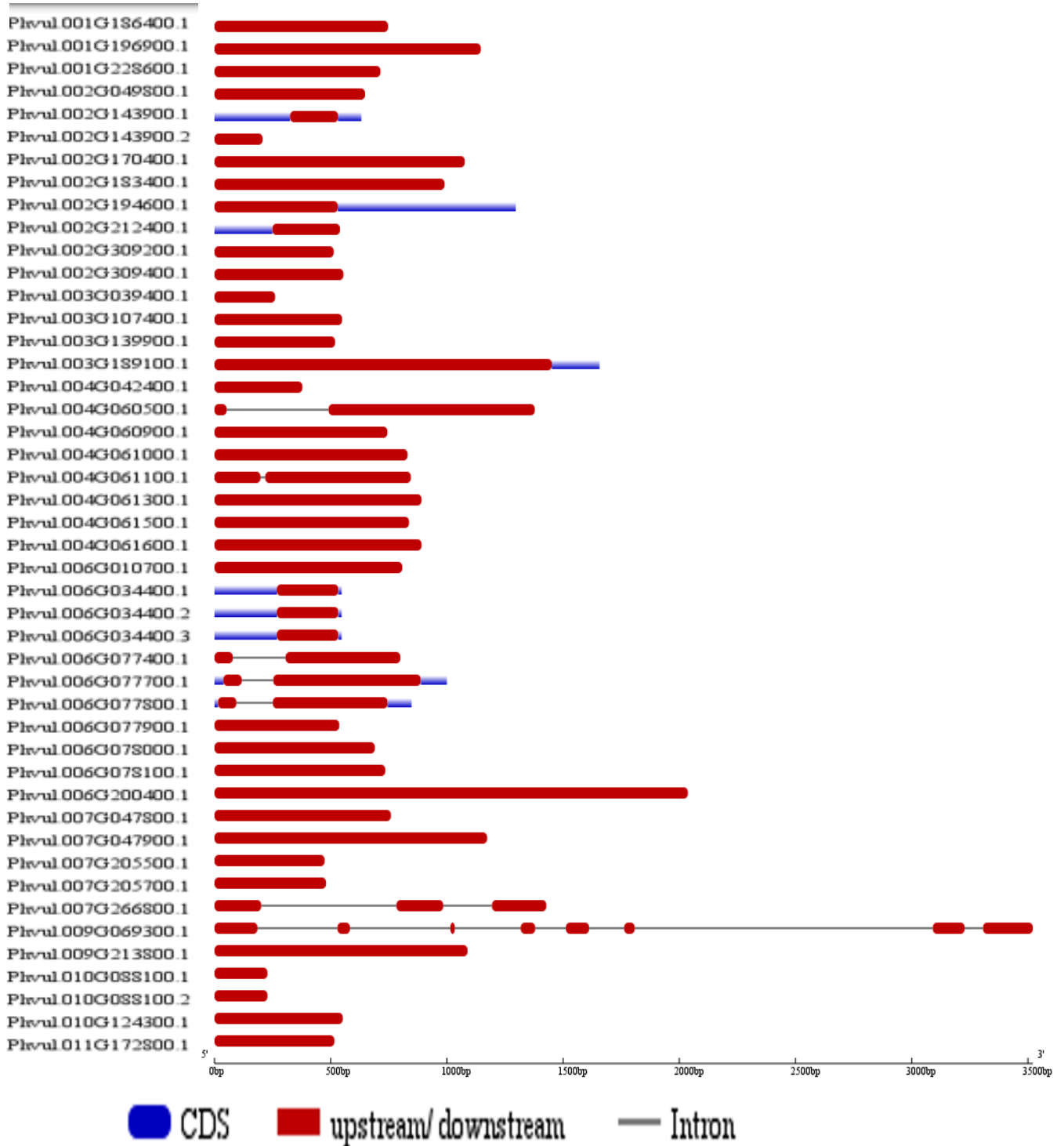
**Figura 1:** Análisis fenético de la familia MADS. **A)** Árbol fenético que muestra la relación entre las 43 secuencias pertenecientes a la subfamilia tipo MICK. Árbol construido con el software MEGA7 con método Neighbor joining (NJ) con 1000 valores de arranque. **B)** Árbol fenético que muestra la relación entre las secuencias pertenecientes a la subfamilia tipo M.

2 A





## 2 B



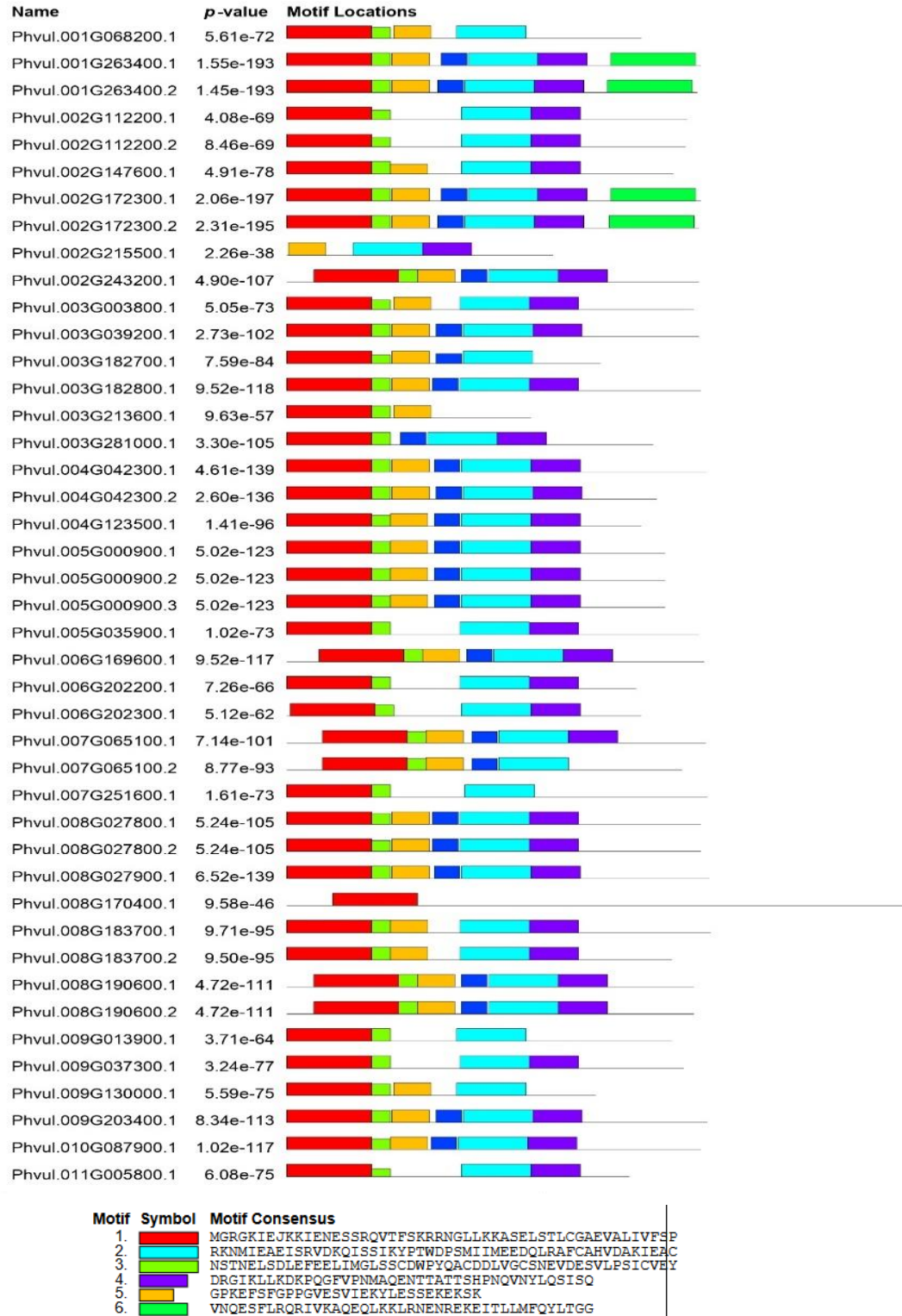
**Figura 2:** Esquema representativo de las estructuras intrón-exón de los genes AGL8 en *Phaseolus vulgaris*. Se representan los exones como rectángulos rojos, mientras que las líneas negras continuas indican los intrones. **A)** Se muestran los resultados para sub-familia tipo MICK. **B)** Se muestran los resultados para sub-familia tipo M. La región marcada con color rojo indica los CDS. La línea negra continua indica la presencia de intrones.

### 3 A



Motif	Symbol	Motif Consensus
1.	[Red]	MGRGKIEJKRIENKTNRQVTFSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSS
2.	[Cyan]	LQRSQRNLMGEDLGPLSLKELQNLEKQLESSLKQIRSRKTZ
3.	[Green]	RGKLYEYSSSS
4.	[Purple]	IMLDZIEELQKKERLLZEENRALRKKJEE
5.	[Yellow]	MLKTJERYQKCSYDASZAGSST
7.	[Blue]	QSSQQEYLKLLKARIE

### 3 B



**Figura 3:** Análisis de motivos conservados de genes de MADS-BOX en *P. vulgaris*. Los recuadros de colores representan distintos motivos y su posición **A:** Distribución de los motivos conservados de la subfamilia tipo MICK de los genes MADS box después de los análisis en el software MEME. **B:** Distribución de los motivos conservados de la subfamilia tipo M-type de los genes MADS box después de los análisis en el software MEME.

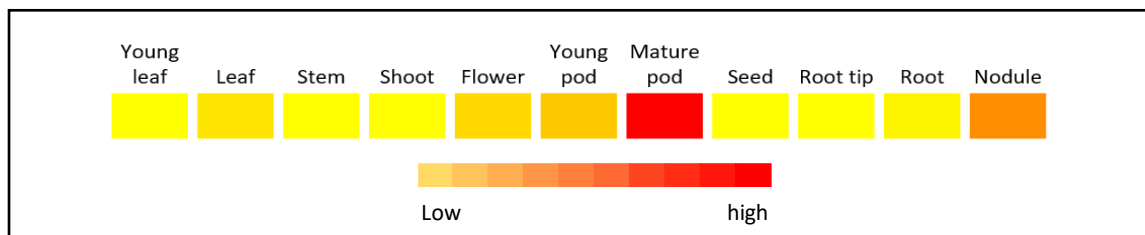


**Figura 4:** Mapa de calor que muestra los resultados del transcriptoma para cada una de las secuencias pertenecientes a la familia MADS-box. **A)** Expresión para las secuencias pertenecientes a la subfamilia tipo MICK donde rojo es menor expresión y azul una expresión mayor durante la nodulación. Se observa que dos identificadores tienen una expresión mayor durante la etapa de nodulación. **B)** Mapa de calor que muestra los resultados del transcriptoma de las secuencias de la familia tipo M. En este caso podemos observar un identificador que muestra mayor expresión durante la nodulación.

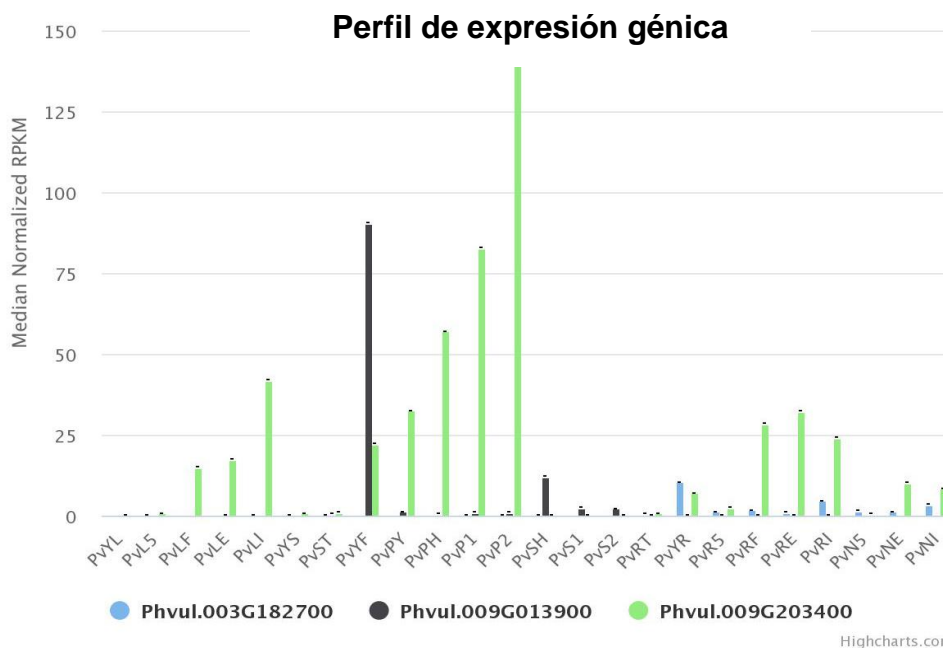
### 8.3 El gen *AGL8* se expresa en nódulos y raíces de frijol.

Basándonos en los perfiles de expresión de genes de tipo MICK específicos de plantas, se seleccionó Phvul.009G203400 que corresponde a AGAMOUS-LIKE 8 (*AGL8*) que se indujo específicamente durante la nodulación (Figura 4 y 5). Además, se realizó un análisis *in silico* basado en los datos reportados en el atlas Common Bean Gene Expression (PvGEA; O'Rourke et al. 2014). En este análisis se encontró que de los 3 genes que se regularon positivamente durante la nodulación a los 14 días post inoculación, *AGL8* es inducido específicamente a 5 dpi en comparación con los otros dos genes (Figura 6). Por lo tanto, seleccionamos el *AGL8* para un análisis más detallado.

Los datos de expresión específicos de tejido y relacionados con la etapa de desarrollo nos proporcionan pistas sobre las funciones del gen *AGL8* en diferentes tejidos vegetativos y reproductivos de *P. vulgaris*. Por lo tanto, se realizó un análisis *in silico* y se extrajeron los niveles de expresión reportados en el atlas de Phytozome (*P. vulgaris* v12) y Common Bean Gene Expression (PvGEA; O'Rourke et al., 2014). Con base en el mapa de calor del perfil de expresión (Fig.5), se encontró una menor expresión en los tejidos vegetativos (hoja joven, hoja, tallo, brote, semilla, punta de la raíz, raíces) y una mayor expresión en los tejidos reproductivos (flor, vaina joven y madura vaina). Se encontró que la expresión de *AGL8* era mayor en los tejidos de los nódulos en comparación con las raíces, lo que indica la especificidad de *AGL8* para los nódulos. Por lo tanto, se seleccionó *AGL8* para caracterizar su papel durante la simbiosis de rizobias.



**Figura 5.** Perfiles de expresión *in silico* de *P. vulgaris* *AGL8*. Perfiles de expresión del mapa de calor de *AGL8* en varios tejidos de *P. vulgaris*. Los datos del transcriptoma en diferentes tejidos fueron extraídos por Phytozome (*P. vulgaris* v2.1) y el atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (PvGEA). El mapa de calor se generó utilizando los valores de fragmentos por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas cartografiadas (FPKM) del gen *AGL8*.

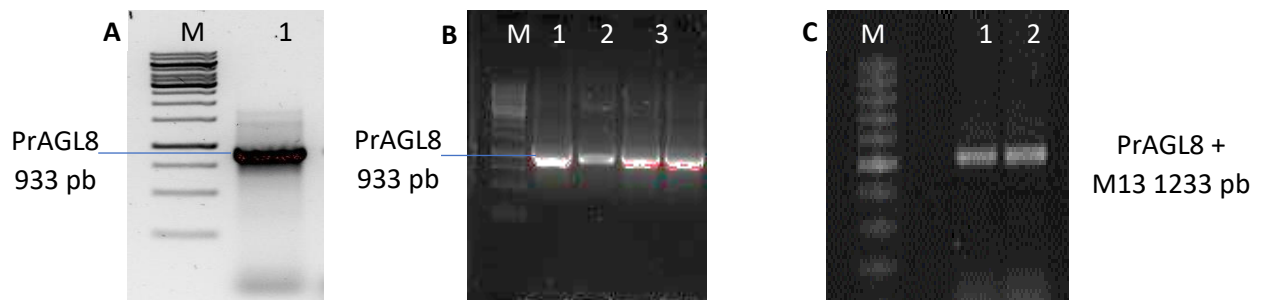


**Figura 6:** Perfil de expresión génica de los tres genes pertenecientes a la familia MADS-box más expresados durante la nodulación en diferentes etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* según el atlas de expresión génica PvGEA (O'Rourke et al. 2014). Las etapas y tratamientos se enlistan a continuación. PvYL: Tejido foliar trifoliado de plantas provistas de fertilizante. PvL5: Tejido foliar recolectado 5 días después de la inoculación con rizobios efectivos. PvLF: Tejido foliar de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo de LE y LI. PvLE: Tejido foliar recolectado 21 días después de la inoculación con rizobio efectivo. PvLI: Tejido foliar recolectado 21 días después de la inoculación con rizobio ineficaz PvYS : Entrenudos del tallo por encima del cotiledón recolectados en la 2ª etapa trifoliada. PvST : Punta de la planta, incluido el meristemo. PvYL - Tejido foliar trifoliado 2º de plantas provistas de fertilizante. PvL5: Tejido foliar recolectado 5 días después de la inoculación con rizobio efectivo. PvLF: Tejido foliar de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo de LE y LI. PvLE: Tejido foliar recolectado 21 días después de la inoculación con rizobio efectivo. PvLI: Tejido foliar recolectado 21 días después de la inoculación con rizobio ineficaz. PvYS: Todos los entrenudos del tallo por encima del cotiledón recolectados en la 2ª etapa trifoliada. PvST: Ápice de la planta, incluido el meristemo, recolectado en la 2ª etapa trifoliada. PvFY: Flores jóvenes, recolectadas antes de la aparición floral. PvPY: Vainas jóvenes, recolectadas de 1 a 4 días después de la senescencia floral. PvPH: Vainas de aproximadamente 9 cm de largo, asociadas con semillas en la etapa del corazón (solo vaina). PvP1: Vainas de entre 10 y 11 cm de largo, asociadas con semillas de etapa 1 (solo vaina). PvP2: Vainas de entre 12 y 13 cm de largo asociadas con semillas de etapa 2 (solo vaina). PvSH - Semillas en etapa de corazón, entre 3 y 4 mm de ancho y aproximadamente 7 mg. PvS1 - Semillas de etapa 1, entre 6 y 7 mm de ancho y aproximadamente 50 mg. PvS2 - Semillas de etapa 2, entre 8 y 10 mm de ancho y entre 140 y 150 mg. Puntas radiculares, 0,5 cm de tejido, recolectadas de plantas fertilizadas en la 2ª etapa trifoliada de desarrollo. PvYR - Raíces enteras, incluidas las puntas de las raíces, recolectadas en la 2ª etapa trifoliada de desarrollo. PvR5 - Raíces enteras separadas de nódulos de prefijación de 5 días de edad. PvRF - Raíces enteras de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo que RE y RI. PvRE - Raíces enteras separadas de los nódulos fix+ recolectados 21 días después de la inoculación. PvRI - Raíces enteras separadas de nódulos fijos recolectados 21 días después de la inoculación. PvN5 - Nódulos prefijados (efectivos) recogidos 5 días después de la inoculación. PvNE - Fijación efectiva de nódulos recolectados 21 días después de la inoculación PvNI - Fijación ineficaz de nódulos recogidos 21 días después de la inoculación

#### 8.4 Clonación del promotor AGL8 en vector pENTR.

Con el fin de analizar la expresión espacio-temporal se realizó un análisis de promotor en función de la simbiosis con bacterias *Rhizobium*. Como resultado se obtuvieron varias colonias positivas en las placas LB resistentes a los antibióticos. Las colonias individuales se volvieron a cultivar y los plásmidos se extrajeron con el kit PureLink® HiPure Plasmid (Invitrogen™) y se verificaron 4 colonias positivas con oligos de genes específicos que confirmaron la presencia del inserto AGL8 en los vectores pENTR / D-TOPO / prAGL8 (Figura 6B).

Posteriormente, se realizó una prueba de PCR utilizando dos colonias positivas con oligos M13, que amplifica las regiones que flanquean el inserto del gen. Los amplicones de PCR resultantes se procesaron en un gel de agarosa. Se observó un fragmento esperado de 1,233 pb (promotor de 933 pb + flanco de 300 pb del vector pENTR) (Figura 6C). La banda resultante se cortó y purificó usando el kit de extracción de gel GeneJET de Thermo Scientific.



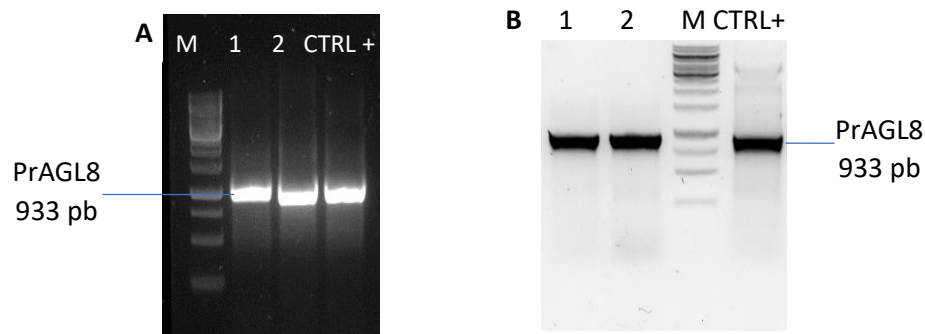
**Figura 7:** Clonación de prAGL8 a vector pENTR **A)** Amplificación de fragmento prAGL8 desde DNA genómico de raíz de *Phaseolus vulgaris*. La banda se muestra en un tamaño de 933 pb. **B)** Electroforesis de PCR realizada al plásmido pENTR purificado desde 4 colonias diferentes que contienen el fragmento de prAGL8. Las bandas nuevamente se muestran en el tamaño esperado de 933 pb. **C)** Gel de electroforesis de PCR realizada al vector pENTR con oligos M13. Al unirse estos oligos al fragmento específico en el vector, queda un fragmento de tamaño total de 1,233 pb.

#### 8.5 Introducción del promotor de AGL8 en vector de salida pBGWSF7.0 e introducción a *A. rhizogenes*

Se inició la reacción de la mezcla de enzimas LR Clonase™ II con el fin de introducir el fragmento AGL8 amplificado con M13 en el vector final pBGWSF7. La mezcla clonada se introdujo en *E. coli* TOP10 mediante el método de choque

térmico y se sembró en una placa con medio LB y antibiótico. Se observaron varias colonias después de 16 h de las cuales se seleccionaron dos colonias, se volvieron a cultivar, se aislaron los plásmidos y se realizó la PCR utilizando oligonucleótidos específicos de *AGL8*. Los resultados muestran el fragmento esperado de 933 pb en ambas colonias seleccionadas tan similar como un control positivo (pENTR / D-TOPO / prAGL8) (Figura 7A).

A continuación, se transformó la cepa K599 de *A. rhizogenes* usando el plásmido positivo pBGWFS7.0 / prAGL8::GUS por electroporación. Los plásmidos positivos K599-pBGWFS7.0 / prAGL8::GUS confirman el inserto de prAGL8 dentro del vector y la cepa era viable para el crecimiento y uso posterior en la generación de raíces transgénicas.



**Figura 8:** Inserción de fragmento prAGL8 al vector pBGWSF7 **A)** Amplificación de fragmento prAGL8 desde vector pBGWSF7.0 purificado de bacterias *E. coli* transformadas. En el carril 1 y 2 se pueden observar las bandas en el tamaño de 933 pb esperados. A la derecha encontramos el control +, el cual contiene los oligos específicos para AGL8 además del vector pENTR de la primera transformación. **B)** Electroforesis de PCR realizada al plásmido pBGWSF7.0 purificado de 2 colonias de *A. Rhizogenes* diferentes que contienen el fragmento de prAGL8. Las bandas nuevamente se muestran en el tamaño esperado de 933 pb. A la derecha control positivo con vector pENTR y oligos de prAGL8.

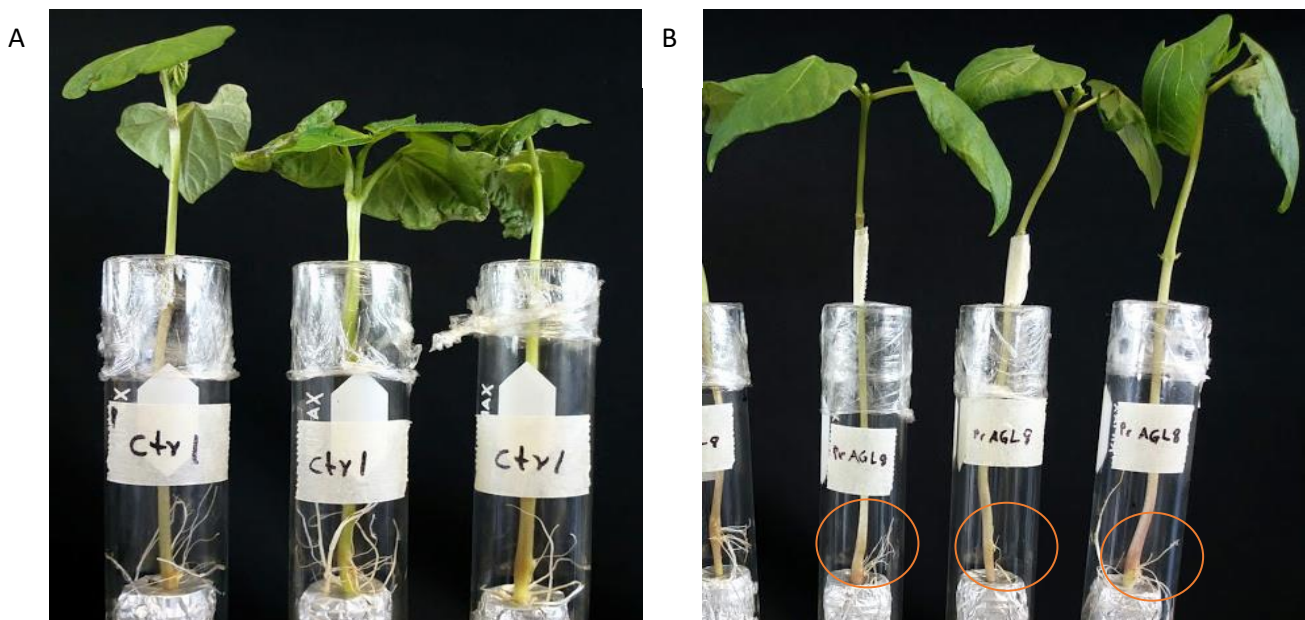
### 8.5.1 El promotor de *AGL8* tiene actividad en células meristemáticas en condiciones simbióticas con *Rhizobium*.

Se realizó el protocolo para la inducción de raíces peludas en plantas de frijol (Nanjareddy et al., 2017), con el fin de analizar el patrón de expresión del promotor del gen *AGL8* en raíces no inoculadas, raíces inoculadas con bacterias *Rhizobium* y nódulos. El promotor clonado en el vector pBGWFS7.0 / prAGL8:: GUS expresa un gen GUS bajo el control del promotor *AGL8*. La actividad del promotor



del gen *AGL8* se puede detectar basándose en el ensayo histoquímico GUS. Los callos de raíz transgénicos comenzaron a brotar entre 5 y 7 días después de la inyección con la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes* que alberga el vector pBGWFS7.0 / prAGL8:: GUS. Tras 10 días, emergieron las raíces peludas cuyo origen se encuentra en los callos de la región del hipocótilo (aproximadamente 0.5 - 1 cm de longitud), tanto de las plantas de control (vector vacío) como de las plantas con pBGWFS7.0/prAGL8:: GUS (Figura 8).

12 días después de la inyección, se cortaron las raíces primarias de la planta, de modo que solo quedarían raíces peludas y se trasplantaron a macetas de vermiculita estériles. En esta etapa, las plantas se inocularon con *Rhizobium tropici* (tipo salvaje). Las raíces peludas se recolectaron en diferentes puntos de tiempo y se analizaron histoquímicamente para GUS de acuerdo con (Jefferson et al., 1987). Como se muestra en la Figura 9, observamos una comparación entre los patrones de tinción de GUS en los tejidos de la raíz inoculados con rizobio y sin inocular.



**Fig. 8:** Inducción de raíces transgénicas con construcción prAGL8 para estudio de promotor. **A)** Se muestran plantas control con raíces peludas con una longitud de más de 0.5 cm. a los 10 dpi. **B)** Plantas con construcción prAGL8 con desarrollo de múltiples raíces peludas en la zona de inducción del callo a los 10 dpi.

Las raíces que fueron sometidas al ensayo GUS del control (vector vacío) no muestran coloración azul (sin expresión de GUS), lo que indica la autenticidad del vector promotor (Figura 9A). Mientras que las raíces pBGWFS7.0/prAGL8:: GUS muestran actividad promotora *AGL8* representada por un fuerte color azul en las células meristemáticas de la raíz, tejido vascular de la raíz y células corticales no inoculadas (Figura 9B). Curiosamente, después de la inoculación con *Rhizobium*, los patrones de GUS en las raíces cambiaron; la expresión de GUS disminuyó y se restringió solo a las zonas de meristemo de las raíces pBGWFS7.0 / prAGL8:: GUS (Figura 9C).

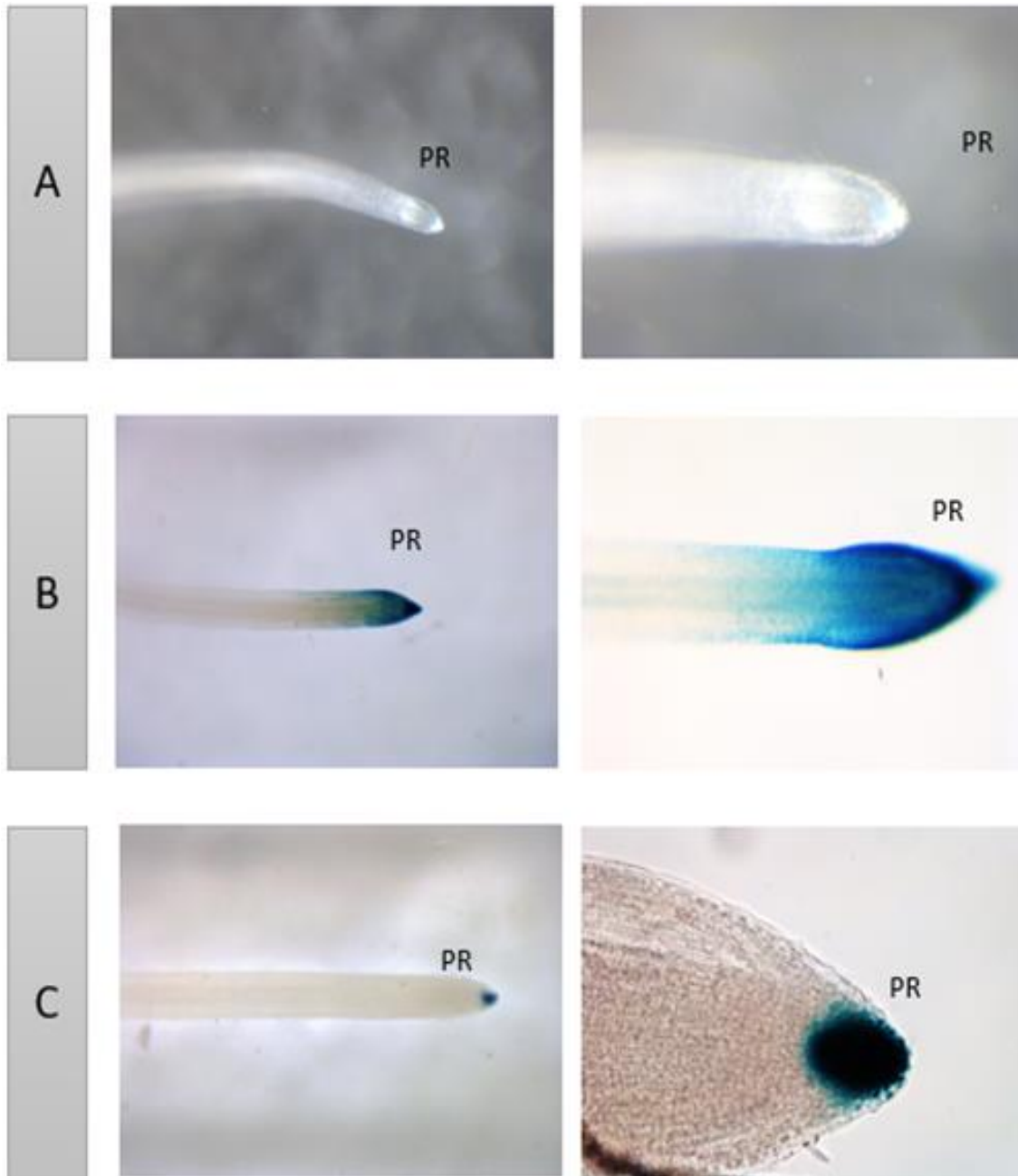
#### 8.5.2 El promotor de *AGL8* tiene actividad en los nódulos maduros formados en las raíces de *Phaseolus vulgaris*

A continuación, estudiamos los patrones de expresión del promotor *AGL8* en los nódulos radiculares. Durante el desarrollo del nódulo en las primeras etapas, se observó expresión de GUS en el meristemo del nódulo. En los nódulos maduros, 21 días después de la inoculación, se observó una fuerte expresión de GUS en la vasculatura del nódulo (Figura 10A-D). Sin embargo, también se observó una expresión débil de GUS en la corteza exterior y en el núcleo (región central infectada por rizobio) del nódulo. Como era de esperar, no se observó tal expresión de GUS en los nódulos de control del frijol (Figura 10E).

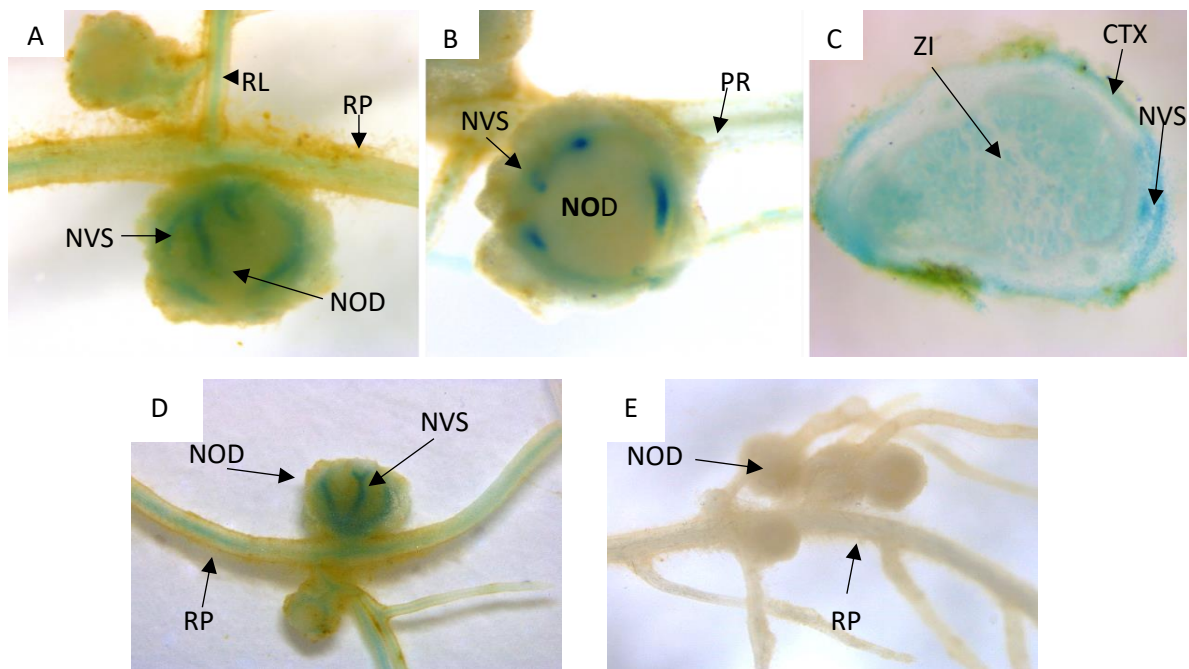
#### 8.6 Clonación del gen *AGL8* en las raíces del frijol.

Para comprobar la localización subcelular de la proteína *AGL8* en frijol, se diseñaron oligos específicos con un tamaño entre 18 y 25 pares de bases, y con un porcentaje de GC mayor al 40 %, los cuales se muestran en la Tabla 1. Estos destinados a amplificar la región del transcrito de *AGL8*.

El fragmento fue amplificado por PCR desde cADN de *P. vulgaris* a una temperatura de unión de 58 ° C, usando nuevamente la "polimerasa Platinum de alta fidelidad" (Invitrogen). Se verificó que la banda tuviera un tamaño de 871 pb en gel de agarosa al 1 % (Figura 11).

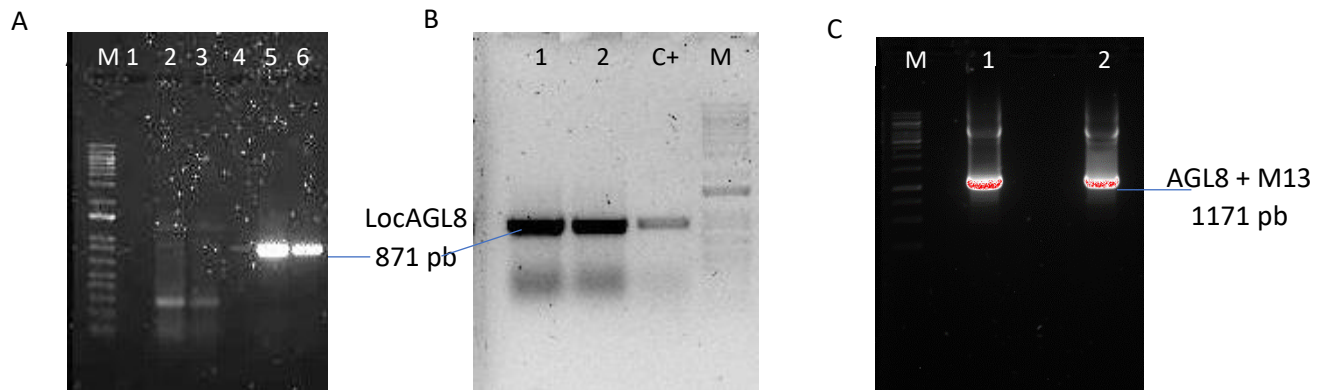


**Figura 9:** Detección del promotor de AGL8 mediante tinción de GUS. **A)** Raíz primaria transgénica control (Con inserción de vector vacío pBGWSF7) sometida a tratamiento con buffer GUS a los 15 días después de la inoculación. PR: Raíz principal. **B)** Patrón de tinción de GUS en puntas de raíz principal transgénica en plantas sin inoculación de *Rhizobium tropici*. **C)** Patrón de tinción de GUS en puntas de raíz principal transgénica en plantas a los 15 días después de inocularse con *Rhizobium tropici*.

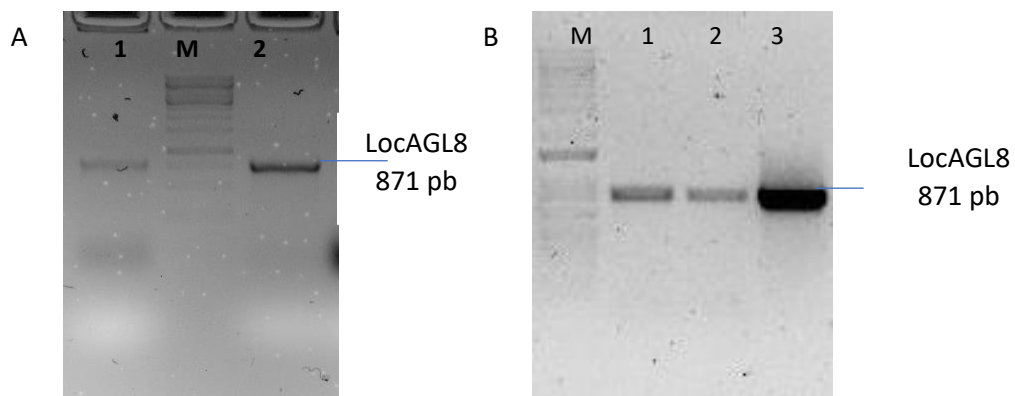


**Figura 10:** Nódulos maduros de frijol con construcción prAGL8::GUS. **A)** Nódulos creciendo en raíces transgénicas con la construcción prAGL8::GUS. Se aprecian las nervaduras del nódulo con coloración azul debido al buffer GUS usado. RL: raíz lateral/ NOD: nódulo / RP: raíz principal / NVS: Nervaduras. **B)** Nódulo cortado de forma transversal donde se puede apreciar la tinción nuevamente en nervaduras. **C)** Corte fino de nódulo que permite ver a detalle la región central infectada (RCI), las nervaduras en 3 puntos, así como la membrana interna del nódulo también expresando prAGL8. ZI: Zona de infección/ CTX: Cortex. **D)** Nódulos tomados en estereoscopio. Se aprecian las nervaduras del nódulo teñidos de GUS. **E)** Nódulos en raíz principal de planta control. No se nota tinción GUS.

El fragmento de 871 pb fue clonado en el vector de entrada pENTR/D-TOPO de Gateway. Las copias obtenidas mediante su introducción en células de *E. coli* TOP10 se aislaron mediante el mismo protocolo de extracción de plásmido usado anteriormente y para verificar la presencia del inserto dentro del vector se llevó a cabo una electroforesis (Figura 11 B) . A este vector se le realizó PCR usando como cebadores M13 (Figura 11 C) esto con el fin de añadir este fragmento de 300 bases al inserto y poder introducirlo al siguiente vector. Se observa un tamaño de 1,171 pb. (Fragmento de *AGL8* de 871 pb + flanco de 300 pb del vector pENTR) (Figura 11 C). La banda resultante se cortó y purificó usando el kit de extracción de gel GeneJET (Thermo Scientific).



**Figura 11:** Clonación de AGL8 a vector pENTR. **A)** Amplificación de fragmento LocAGL8 a partir de cDNA extraído de raíz de *Phaseolus vulgaris*. La banda se muestra en un tamaño de 871 pb. **B)** Electroforesis de PCR realizada al plásmido pENTR purificado desde 2 colonias diferentes que contienen el fragmento de LocAGL8. Las bandas nuevamente se muestran en el tamaño esperado de 871 pb. **C)** Gel de electroforesis de PCR realizada al vector pENTR con oligos M13. Al unirse estos oligos al fragmento específico en el vector, queda un fragmento de tamaño total de 1,171 pb.



**Figura 12:** Inserción de fragmento AGL8 a vector pEarleyGate104 **A)** Amplificación del gen AGL8 desde vector pEarleyGate104 purificado de bacterias *E. coli* transformadas. En el carril 1 y 2 encontramos las bandas en el tamaño de 871 pb. En el carril central encontramos el control +, el cual contiene los oligos específicos para AGL8 además del vector pENTR de la primera transformación. **B)** Electroforesis de PCR realizada al plásmido pEarleyGate104 purificado desde 2 colonias de *A. rhizogenes* diferentes que contienen el fragmento de AGL8. Las bandas coinciden con el tamaño esperado de 871 pb. A la izquierda control positivo con vector pENTR y oligos de LocAGL8.

### 8.6.1 Introducción del gen AGL8 en vector de salida pEarleyGate104 e introducción a *A. rhizogenes*

Se inició la reacción enzimática LR Clonase para introducir el fragmento de *AGL8* en el vector pEarleyGate104 (Karimi et al., 2002). Una vez seguido el protocolo, el vector quedó listo para introducirse en *E. coli* TOP10 mediante choque térmico. Se sembró en caja petri con selección de antibióticos. Una vez teniendo las colonias positivas, se realizó un aislamiento del plásmido y se comprobó la inserción del amplicón de *AGL8* por medio de PCR. Los resultados indican el fragmento de 871 pb en una de las colonias (Figura 12 A).

Luego, se transformó la cepa K599 de *A. rhizogenes* usando el plásmido positivo pEARLY104 con el inserto de *AGL8* por electroporación en equipo MicroPulse BioRad™. Se realizó un pulso a 1.7 KiloVolts. Los plásmidos positivos K599- pEarleyGate104/*AGL8*::YFP confirman el inserto de *AGL8* dentro del vector y la cepa era viable para el crecimiento y uso posterior en la generación de raíces peludas transgénicas.

### 8.6.2 *AGL8* se localiza en el núcleo celular.

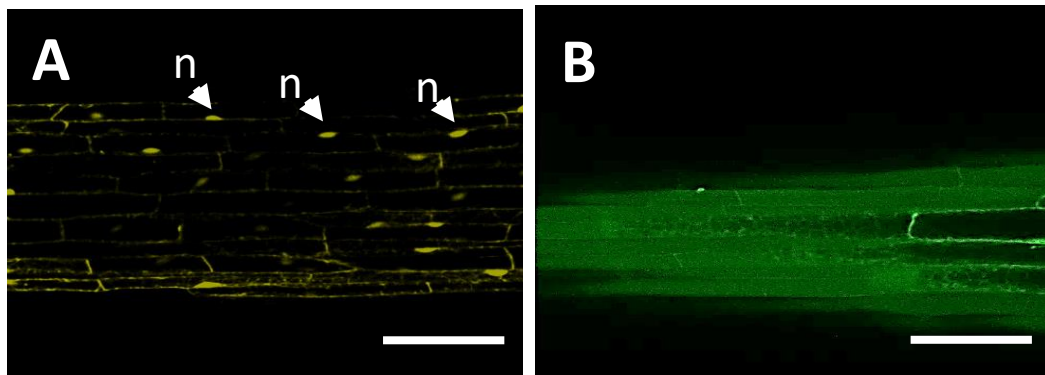
La localización subcelular de la proteína *AGL8* fue analizada por experimentos *in silico* e *in vivo*. La secuencia completa de la proteína *AGL8* fue analizada por el programa CELLO v2.5 con el fin de proporcionar la predicción en cuanto a la localización subcelular usando programas *in silico* (Yu et al., 2006). Basado en CELLO v.2.5, la localización subcelular de la proteína *AGL8* se encuentra principalmente en el núcleo (3.529 arriba = unidades de predicción), y citoplasma (0.815 arriba). Posteriormente, se realizó un experimento *in vivo* para analizar la localización subcelular de *AGL8*. pEarleyGate104/*AGL8*::YFP se introdujo en las raíces pilosas de *P. vulgaris* por infección con *A. rhizogenes* K599 para determinar la localización subcelular en frijol.

Los resultados que se obtuvieron con el microscopio confocal muestran que la señal fluorescente de *AGL8*-YFP fue observada en núcleo de las raíces

transgénicas de *P. vulgaris* (Figura 13 A). Estas observaciones en el microscopio están en consenso con el análisis *in silico* de *AGL8* (Tabla 2).

Las raíces peludas que expresan el vector vacío sirvieron como controles. Se observó la YFP (fluorescencia amarilla) en el citoplasma de las células de *P. vulgaris* (Figura 13 B).

Basándonos en ambos experimentos, se puede decir que la proteína *AGL8* se encuentra distribuida en núcleo celular en la raíz de *P. vulgaris*.



**Figura 13.** Análisis de la localización subcelular de proteína *AGL8* por medio de YFP en punta de raíz de frijol. **A:** Localización subcelular de *AGL8::YFP* en el núcleo de la célula. **B:** Raíz control (vector Pearly104 vacío). Barra de escala 20  $\mu$ M; n- núcleo.

**Tabla 2:** Predicción de la localización subcelular de *AGL8* analizada por el programa CELLO v2.5

### CELLO RESULTS

SeqID: AGL8(Phvul.009G203400.1)

Analysis Report:	LOCALIZATION	RELIABILITY
SVM		
Amino Acid Comp.	Nuclear	0.577
N-peptide Comp.	Nuclear	0.914
Partitioned seq. Comp.	Nuclear	0.558
Physico-chemical Comp.	Nuclear	0.688
Neighboring seq. Comp.	Nuclear	0.792
 CELLO Prediction:		
	Nuclear	3.529 *
	Cytoplasmic	0.815
	Mitochondrial	0.248
	Cytoskeletal	0.182
	Chloroplast	0.060
	Golgi	0.052
	Extracellular	0.035
	Vacuole	0.025
	Peroxisomal	0.019
	PlasmaMembrane	0.015
	Lysosomal	0.011
	ER	0.010

#### 8.7 Aislamiento y clonación del gen *AGL8* en vector binario para estudios de sobreexpresión.

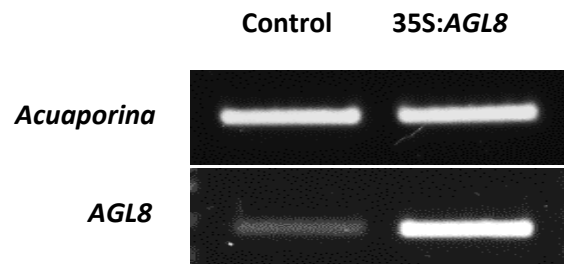
El marco abierto de lectura, por sus siglas en inglés ORF del gen *AGL8* se clonó en el vector binario pEARLY104 (Earley et al., 2006). El inicio de la transcripción del gen *AGL8* estuvo mediado por el promotor 35S CaMV, por lo que sobreexpresa el gen diana (Figura 11-12). A continuación, se transformó la construcción pEARLY 104/*AGL8* en *Agrobacterium rhizogenes K599* para estudios de sobreexpresión.

#### 8.8 La construcción pEARLY104/*AGL8* sobreexpresa el gen *AGL8* en raíces peludas de frijol.

Se indujeron raíces peludas transgénicas en plantas de *Phaseolus vulgaris* según el protocolo estandarizado por Nanjareddy et al., (2017). Dos semanas después de la inducción de la raíz pilosa. estas fueron cortadas y congeladas en nitrógeno líquido para posteriormente ser guardadas a -80 °C.



Se extrajo el ARN total del control (raíz con vector vacío) y plantas de sobreexpresión de 35S: *AGL8* (pEARLY104/*AGL8*) y se preparó ADNc de acuerdo con las instrucciones de fabricación (Invitrogen). El análisis de RT-PCR se llevó a cabo utilizando oligos específicos para *AGL8*. Estos resultados muestran niveles más altos de acumulación de transcripción *AGL8* en raíces de sobreexpresión en comparación con las raíces de control (Figura 14). Una expresión de acuaporina de control interno indica la buena calidad y la misma cantidad de ARN en el experimento. Juntos, esto sugiere que la construcción pEARLY104/*AGL8* sobreexpresaba el gen *AGL8* en raíces peludas de frijol.



**Figura 14:** Expresión de *AGL8* en raíces de sobreexpresión mediante análisis de RT-PCR. Se realizó RT-PCR en el ADNc de la raíz de frijol de las raíces de control y de sobreexpresión. Se usaron oligonucleótidos de *AGL8* específicos de genes para medir la acumulación de transcritos de *AGL8*; Se utilizaron oligos de acuaporina como control interno.

#### 8.8.1 La sobreexpresión de *AGL8* en frijol promueve el desarrollo de nódulos.

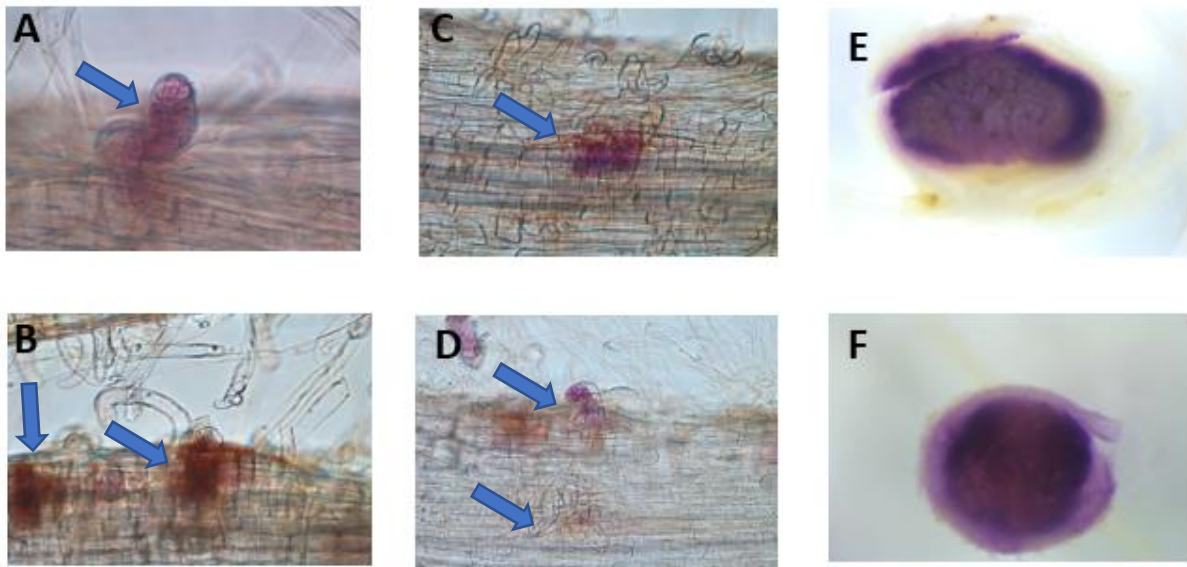
Para analizar los cambios histológicos durante el desarrollo de nódulos en condiciones de sobreexpresión de *AGL8*, lo primero que se hizo fue producir raíces peludas transgénicas en plántulas de frijol como se describió anteriormente. En este caso, una vez que las raíces transgénicas crecieron lo suficiente (2-3 cm de longitud), se trasplantaron a macetas con vermiculita estéril. Las plantas trasplantadas se inocularon con la cepa CIAT899 de *Rhizobium tropici* recién cultivada que alberga el indicador GUS con el fin de seguir el desarrollo de la colonización de rizobios y el proceso de desarrollo de nódulos.

Se tomó tejido de raíces peludas a los 10 dpi, el tejido de la raíz pilosa se recogió de las plantas con sobreexpresión de *AGL8* y las plantas de control (vector vacío) y se tiñeron inmediatamente para el análisis histoquímico de GUS. Posteriormente, las muestras de raíces se observaron al microscopio. Se contó el

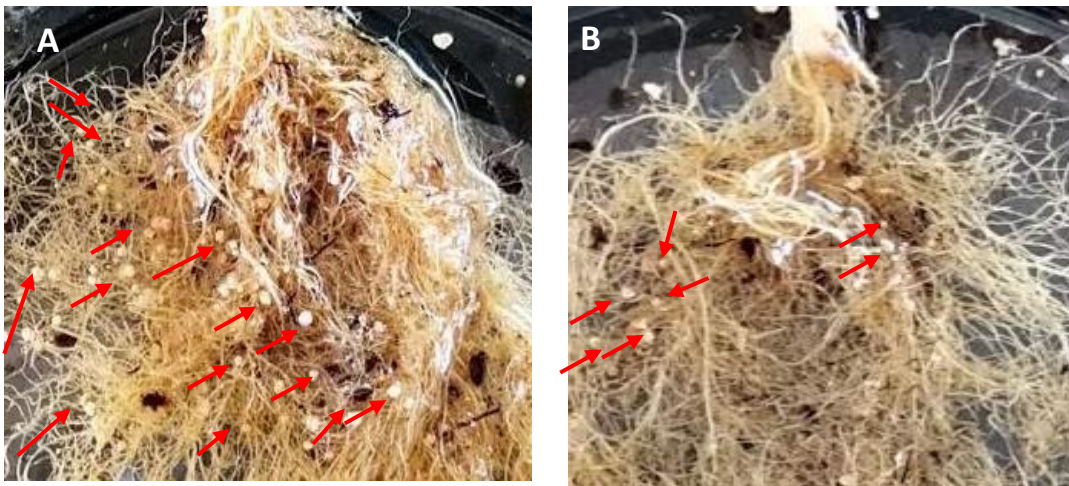
número de infecciones rizobiales tempranas para ver si había alguna diferencia entre las dos condiciones. Se observó que había un mayor número de sitios de infección por rizobios en las plantas que sobreexpresaban el promotor de *AGL8*/*GUS* en comparación con el control (Figura 16).

Un corte transversal de un nódulo maduro a 21 dpi muestra que los nódulos estaban empaquetados con rizobios tanto en las muestras de control como en las de sobreexpresión (Figura 15 E y F), lo que indica que estos nódulos eran funcionales.

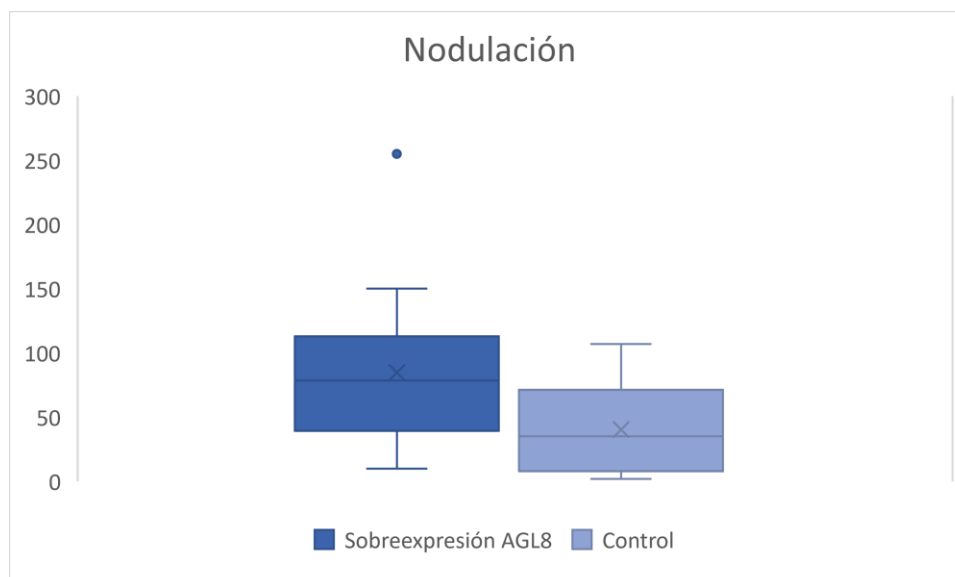
Se obtuvieron datos cuantitativos a 25 dpi, se verificaron las raíces peludas transgénicas de las plantas control y de sobreexpresión de *AGL8* para contar el número de nódulos que se desarrollaron en el sistema radicular de cada planta. En el panel A de la Figura 16 presentamos una imagen representativa de los tejidos de las raíces de dos plantas. En el lado A (sobreexpresión de *AGL8*) se puede observar un mayor número de nódulos en comparación con el lado B, que es el de la planta de control. A pesar de tener una densidad de raíces similar, la sobreexpresión parece promover el desarrollo de nódulos. En la Figura 16 se muestra la representación gráfica del número de nódulos por planta. En azul se representan los nódulos de las plantas de sobreexpresión de *AGL8*, mientras que en naranja están las plantas de control. Los números de nódulos fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en la sobreexpresión de *AGL8* en comparación con el control (Figura 17).



**Figura 15:** Sitios de infección en raíces transgénicas de plantas de frijol a los 10 dpi. **A-D:** Sitios de infección temprana teñidos con tinción GUS magenta en plantas sobreexpresando AGL8. **E** Corte transversal de nódulo en etapa de maduración en planta control de sobreexpresión. **F** Corte transversal de nódulo en etapa de maduración en planta sobreexpresando AGL8.



**Figura 16:** Nódulos en raíz de planta sobreexpresando AGL8 y en planta control a los 25 dpi. **A:** Fotografía que muestra una cantidad de nódulos en la raíz de esta planta que está sobreexpresando AGL8. **B:** Planta control (vector vacío).



**Figura 17:** Análisis del efecto de sobreexpresión de AGL8 en el número de nódulos rosados contabilizados en raíces de frijol con respecto a las plantas control. Se puede observar una diferencia significativa en plantas sobreexpresantes de AGL8 ( $p < 0.05$ ). Esto teniendo como base el conteo de 20 plantas sobreexpresantes y 10 controles.

## 9. Discusión:

El fenómeno de la simbiosis entre bacterias rizobios y plantas de frijol implica un gran despliegue de la maquinaria genética tanto en las bacterias como en el hospedero. En este trabajo se propuso al gen *AGL-8* perteneciente a la familia MADS-box como un participante activo durante distintas etapas en la formación de nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris*. Este gen es un factor de transcripción cuya función descrita en la literatura se encuentra relacionada con el desarrollo reproductivo del ápice del brote, así como desarrollo floral y mantenimiento de identidad en inflorescencias (Gu et al., 1998). Sin embargo, se ha encontrado evidencia que podría indicar la participación de genes de esta familia, y, sobre todo, del grupo de genes *AGL* en procesos simbióticos en la raíz como el desarrollo de la raíz, la infección por rizobios, la organogénesis, función de los nódulos y la autorregulación de la nodulación (Ayra et al., 2021).

### 9.1 AGL8 en la familia MADS-box

En el análisis bioinformático se identificó la existencia de 92 genes para *Phaseolus vulgaris* pertenecientes a la familia de las MADS-box, en comparación a

los 146 presentes en *Arabidopsis thaliana*. Estos genes se pueden clasificar en dos subfamilias o linajes, MICK y M-type. Los MICK tienen como característica poseer tres dominios más que los genes de tipo M, esto contando desde el extremo N hasta el extremo C de la proteína. Esto va de acuerdo con lo reportado por (dePamphilis et al., 2003).

El análisis de motivos conservados reveló que ambas subfamilias están altamente conservadas, es decir, que ha habido menos inserciones y deleciones durante la evolución de los genes MADS. El análisis de la estructura génica de los genes del MADS-box muestra un mínimo de 6 exones y un máximo de 8 intrones para MICK Y para M-type mínimo de 1 y máximo de 8 intrones. Esto parece indicar una similitud entre las estructuras, mostrándose bien conservados. El análisis de estructura de genes muestra la conformación en número de intrones y exones, así como el análisis de motivos, donde se puede observar patrones muy similares entre los clados de la familia. Esto se acopla a los datos encontrados para otras especies de plantas para esta misma familia MADS (Cheng et al. 2017).

En el análisis de expresión diferencial se puede observar para MICK 2 genes cuya expresión aumenta durante la nodulación. En la subfamilia M-type se puede encontrar uno. Estos genes son candidatos a ser relevantes en el proceso de formación de nódulos.

En el análisis diferencial se identificaron en total 3 genes cuya expresión se aumenta durante el proceso de formación de nódulos en raíz, además del *AGL8*, con estos, podría ahora continuarse un análisis en laboratorio, para comprobar su implicación. Especialmente se continuó con la caracterización del gen *AGL 8*, que fue resultado de un análisis previo, del cual se tomaron los datos y se construyó un mapa de calor para observar los mejores candidatos (Nanjareddy et al. 2017). Anteriormente se ha reportado la posible participación de genes pertenecientes a la gran familia MADS en nodulación aunque estos reportes son pocos y no se había hecho hasta ahora una experimentación más allá del ensayo *in silico* (Aswath and Kim 2005).

## 9.2 Detección de actividad del promotor de AGL8 durante distintas etapas del desarrollo nodular

Durante el proceso de reconocimiento entre los rizobios y la planta hospedero diversos genes entran en funcionamiento. En las raíces, el primer sitio de reconocimiento ocurre en las zonas de elongación, pues es aquí donde entran en función los factores NOD (Mylona et al., 1995).

Se encontró que el promotor del gen *AGL8* está activo en las raíces de *Phaseolus vulgaris*, teniendo un incremento justamente en la zona de elongación de la raíz a etapas tempranas de haber sido inoculadas con *Rhizobium*, lo que sugiere una importancia en la etapa de reconocimiento entre ambos organismos.

Durante la formación y maduración de nódulos, cientos de genes son regulados tanto positiva como negativamente. En la presente tesis se analizó la presencia del promotor de *AGL8* en las células del nódulo tanto en estado maduro como en estado senescente. En las etapas más tempranas el patrón de coloración se encontró principalmente asociado a zonas meristemáticas, región de infección, así como en haces vasculares. En etapas senescentes se encontró principalmente en zonas vasculares y zonas de la corteza, esta información es también respaldada por el trabajo reciente sobre los genes *AGL* y su papel en la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Ayra et al., 2021).

## 9.3 Localización subcelular de AGL8 en raíces de *P. vulgaris*

Las células tienen formas de organización complejas; conocer la localización de una proteína durante determinados procesos puede brindarnos información acerca de su función y permite hacer clasificaciones. Con el fin de conocer la localización celular de *AGL8* se realizó un estudio de localización subcelular. Mediante microscopía se logró observar que *AGL8* se encuentra en el núcleo celular. Esto va de acuerdo con lo mencionado en (Immink et al., 2002) sobre la localización celular de la proteína *AGL8*. Esto también va de acuerdo con su clasificación como factor de transcripción.

## 9.4 Efectos en la nodulación ante la sobreexpresión del gen *AGL8*

En este trabajo se muestra evidencia de que la sobreexpresión de *AGL8* parece aumentar la cantidad de nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris*,

dejando claro que este gen cumple con un rol dentro del proceso de reconocimiento de rizobios y la formación de nódulos. En (Ayra et al., 2021) se observó que el silenciamiento de otros genes de tipo *AGL* lleva a una disminución en la infección por rizobios, así como una mayor producción de nódulos pequeños que no cumplen de forma eficaz con su función simbiótica.

Es importante recalcar que aún faltan estudios como el análisis de silenciamiento, el cual nos podría brindar un panorama más amplio de cómo afectaría la ausencia de ese gen en específico a la relación simbiótica entre los rizobios y *Phaseolus vulgaris*. Sin embargo, los resultados proporcionan evidencia del papel de este gen durante el paso de las bacterias rizobias a través de la epidermis y, posteriormente, durante la progresión del hilo de infección en los tejidos de la raíz cortical y los primordios nodulares. También sería interesante analizar las interacciones que tiene este gen con otros genes involucrados en el proceso de nodulación, esto con la finalidad de poder entender más a fondo las rutas de regulación del proceso de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno.

## 10. Conclusiones

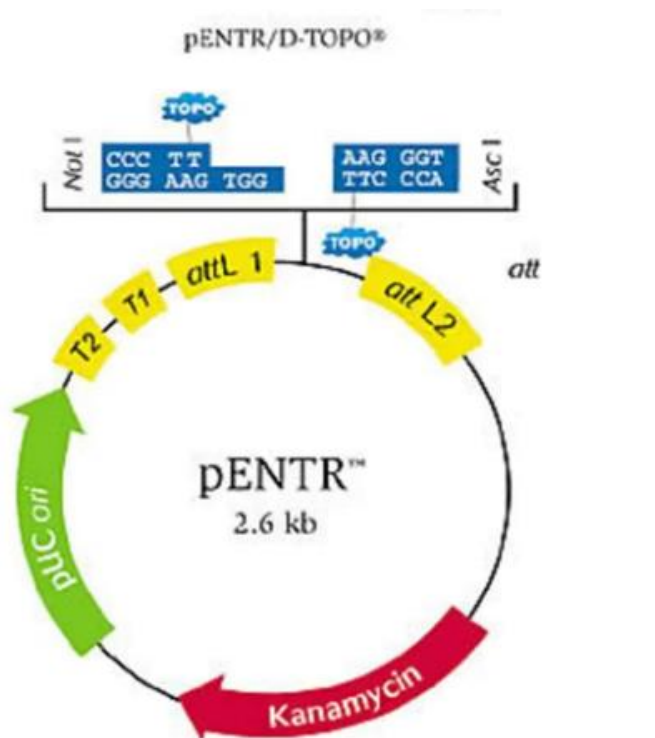
Los factores de transcripción pertenecientes a MADS-box pueden clasificarse en dos subfamilias o linajes en *Phaseolus vulgaris*. La primera subfamilia es MICK, la cual cuenta con 43 miembros, mientras que el tipo M, con 49 miembros. Se encontró gracias al análisis de dominios que las proteínas poseen el dominio SRF altamente conservado.

El análisis de promotor de *AGL8* reveló la expresión del gen en etapas de nodulación temprana en las zonas meristemáticas de la raíz.

En el análisis de localización subcelular se encontró que *AGL8* se encuentra en el núcleo celular.

La sobreexpresión del gen *AGL8* produce un efecto de hipernodulación en plantas de frijol común.

## 11. Material suplementario



**Figura S1:** Vector pENTR/D-TOPO. Vector de entrada utilizado para el inicio de la clonación del promotor de AGL8 en *E.coli*.

## 12. Referencias

- Ackermann, Claudius. 1977. Pflanzen Aus *Agrobacterium rhizogenes*-Tumoren an *Nicotiana tabacum*. *Plant Science Letters* 8 (1): 23–30.
- Aswath, C. R., & Kim, S. H. 2005. Another story of MADS-box genes—their potential in plant biotechnology. *Plant Growth Regulation*, 46(2), 177-188.
- Ayra Litzy, Rezero-Saavedra Maria del Rocío, Isidra Arellano Mariel, Lozano Luis, Ramirez Mario, Leija Alonso & Hernández, Fuente Sara-Isabel, Girard Lourdes, Valdés López Oswaldo, Hernández Georgina. 2021. Control of the Rhizobia Nitrogen-Fixing Symbiosis by Common Bean MADS-Domain/AGL Transcription Factors. *Frontiers in Plant Science* 12 (2) 1061-1070.



- Becker, Annette, and Günter Theißen. 2003. The Major Clades of MADS-Box Genes and Their Role in the Development and Evolution of Flowering Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (3): 464–89.
- Berardini, Tanya Z, Leonore Reiser, Donghui Li, Yarik Mezheritsky, Robert Muller, Emily Strait, and Eva Huala. 2015. The Arabidopsis Information Resource: Making and Mining the ‘Gold Standard’ Annotated Reference Plant Genome. *Genesis* 53 (8): 474–85.
- Berger, Antoine, Alexandre Boscari, Pierre Frenedo, and Renaud Brouquisse. 2019. Nitric Oxide Signaling, Metabolism and Toxicity in Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 70 (17): 4505–20.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz159>.
- Bhattacharya, Amita, Priyanka sood, and Vitaly Citovsky. 2010. The Roles of Plant Phenolics in Defence and Communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* Infection. *Molecular Plant Pathology* 11 (5): 705–19.  
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>.
- Biotech, G. (2020). Snapgene viewer. *Glick B, editor*, 3(3).
- Bras, Cristina Pacios, Meritxell Alberich Jordá, André H M Wijfjes, Marga Harteveld, Nico Stuurman, Jane E Thomas-Oates, and Herman P Spaik. 2000. A *Lotus Japonicus* Nodulation System Based on Heterologous Expression of the Fucosyl Transferase NodZ and the Acetyl Transferase Noll in *Rhizobium Leguminosarum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13 (4): 475–79.
- Bressani, Ricardo, Elena Marcucci, Carlos Enrique Robles, and Nevin S Scrimshaw. 1955. “Valor Nutritivo de Los Frijoles Centroamericanos: I. Variacion En El Contenido de Nitrogeno, Triptofano y Niacina En Diez Variedades de Frijol Negro (*Phaseolus vulgaris*, L.) Cultivadas En Guatemala y Su Retencion de La Niacina Despues Del Cocimiento.” *Food research* 19 (15) : 263-268
- Cardarelli, M, D Mariotti, M Pomponi, L Spanò, I Capone, and P Costantino. 1987.

*Agrobacterium Rhizogenes* T-ADN Genes Capable of Inducing Hairy Root Phenotype. *Molecular and General Genetics MGG* 209 (3): 475–80.  
<https://doi.org/10.1007/BF00331152>.

Castelán-Muñoz, Natalia, Joel Herrera, Wendy Cajero-Sánchez, Maite Arrizubieta, Carlos Trejo, Berenice García-Ponce, María de la Paz Sánchez, Elena R Álvarez-Buylla, and Adriana Garay-Arroyo. 2019. MADS-Box Genes Are Key Components of Genetic Regulatory Networks Involved in Abiotic Stress and Plastic Developmental Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10: 853.

Cheng, Z., Ge, W., Li, L., Hou, D., Ma, Y., Liu, J., ... & Gao, J. (2017). Analysis of MADS-box gene family reveals conservation in floral organ ABCDE model of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Frontiers in plant science*, 8, 656.

Del Cerro, Pablo, Francisco Pérez-Montaña, Antonio Gil-Serrano, Francisco Javier López-Baena, Manuel Megías, Mariangela Hungria, and Francisco Javier Ollero. 2017. The *Rhizobium* Tropici CIAT 899 NodD2 Protein Regulates the Production of Nod Factors under Salt Stress in a Flavonoid-Independent Manner. *Scientific Reports* 7 (1): 46712. <https://doi.org/10.1038/srep46712>.

Consortium, The UniProt. 2018. UniProt: A Worldwide Hub of Protein Knowledge. *Nucleic Acids Research* 47 (D1): 506–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.

Cooper, J E. 2007. Early Interactions between Legumes and Rhizobia: Disclosing Complexity in a Molecular Dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 1355–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x>.

DeBlasio, Stacy L, Anne W Sylvester, and David Jackson. 2010. Illuminating Plant Biology: Using Fluorescent Proteins for High-Throughput Analysis of Protein Localization and Function in Plants. *Briefings in Functional Genomics* 9 (2): 129–38. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp060>.

De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y., & Theißen, G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in plant science*, 8(10), 475-483.

- dePamphilis, Claude W, Hong Ma, Jongmin Nam, and Masatoshi Nei. 2003. Antiquity and Evolution of the MADS-Box Gene Family Controlling Flower Development in Plants. *Molecular Biology and Evolution* 20 (9): 1435–47. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg152>.
- Dong, Jin-Zhuo, Mei-Zhu Yang, Shi-Rong Jia, and Nam-Hai Chua. 1991. Transformation of Melon (*Cucumis Melo L.*) and Expression from the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter in Transgenic Melon Plants. *Bio/Technology* 9 (9): 858–63. <https://doi.org/10.1038/nbt0991-858>.
- Ebel, Roland, José Gonzalo Pozas Cárdenas, Florencio Soria Miranda, and Jesús Cruz González. 2017. Manejo Orgánico de La Milpa: Rendimiento de Maíz, Frijol y Calabaza En Monocultivo y Policultivo. *Terra Latinoamericana* 35 (2): 149–60.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), 616-629.
- Ewald, Paul W. 1987. Transmission Modes and Evolution of the Parasitism-Mutualism Continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503 (1): 295–306. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb40616.x>.
- Fernández-Luqueño, Fabián, and David Espinosa-Victoria. 2008. Bioquímica, Fisiología y Morfología de La Senescencia Nodular: Una Revisión Crítica. *Terra Latinoamericana* 26 (2): 133–44.
- Frassinetti, Stefania, Morena Gabriele, Leonardo Caltavuturo, Vincenzo Longo, and Laura Pucci. 2015. Antimutagenic and Antioxidant Activity of a Selected Lectin-Free Common Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) in Two Cell-Based Models. *Plant Foods for Human Nutrition* 70 (1): 35–41. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0453-6>.
- Garay-Arroyo, Adriana, Enrique Ortiz-Moreno, María de la Paz Sánchez, Angus S Murphy, Berenice García-Ponce, Nayelli Marsch-Martínez, Stefan De Folter,

- Adriana Corvera-Poiré, Fabiola Jaimes-Miranda, and Mario A Pacheco-Escobedo. 2013. The MADS Transcription Factor XAL2/AGL14 Modulates Auxin Transport during Arabidopsis Root Development by Regulating PIN Expression. *The EMBO Journal* 32 (21): 2884–95.
- Goodstein, David M, Shengqiang Shu, Russell Howson, Rochak Neupane, Richard D Hayes, Joni Fazo, Therese Mitros, et al. 2011. Phytozome: A Comparative Platform for Green Plant Genomics. *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D1178–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>.
- . 2012. Phytozome: A Comparative Platform for Green Plant Genomics. *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue): D1178–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>.
- Gramzow, Lydia, and Guenter Theissen. 2010. A Hitchhiker’s Guide to the MADS World of Plants. *Genome Biology* 11 (6): 1–11.
- Grebenok, Robert J, Elizabeth Pierson, Georgina M Lambert, Fang-Cheng Gong, Claudio L Afonso, Ruth Haldeman-Cahill, James C Carrington, and David W Galbraith. 1997. Green-Fluorescent Protein Fusions for Efficient Characterization of Nuclear Targeting. *The Plant Journal* 11 (3): 573–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11030573.x>.
- Gu, Q, C Ferrandiz, M F Yanofsky, and R Martienssen. 1998. The FRUITFULL MADS-Box Gene Mediates Cell Differentiation during Arabidopsis Fruit Development. *Development* 125 (8): 1509 – 1517. <http://dev.biologists.org/content/125/8/1509.abstract>.
- Guasch Vidal, Beatriz. 2011. Selección y Caracterización de Mutantes de *Rhizobium Tropici* Ciat 899 Afectados En La Producción de Factores Nod En Condiciones de Estrés Salino (Tesis doctoral inédita) Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Heard, J, and K Dunn. 1995. Symbiotic Induction of a MADS-Box Gene during Development of Alfalfa Root Nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (12): 5273 LP – 5277. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5273>.

- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104.
- Hiei, Yukoh, Toshihiko Komari, and Tomoaki Kubo. 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 35 (1): 205–18. <https://doi.org/10.1023/A:1005847615493>.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A., & Kononowicz, A. K. (2014). *Phaseolus vulgaris*—recalcitrant potential. *Biotechnology advances*, 32(7), 1205-1215.
- Hobert, Oliver. 2008. Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Science* 319 (5871): 1785 – 1786. <https://doi.org/10.1126/science.1151651>.
- Hungria, Mariangela, Diva de S Andrade, Lígia Maria de O Chueire, Agustin Probanza, Francisco J Gutierrez-Mañero, and Manuel Megías. 2000. Isolation and Characterization of New Efficient and Competitive Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (11–12): 1515–28.
- Immink, R. G., Gadella Jr, T. W., Ferrario, S., Busscher, M., & Angenent, G. C. (2002). Analysis of MADS box protein–protein interactions in living plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2416-2421.
- Indrasumunar, Arief, and Peter M Gresshoff. 2010. Duplicated Nod-Factor Receptor 5 (NFR5) Genes Are Mutated in Soybean. *Plant Signaling & Behavior* 5 (5): 535–36. <https://doi.org/10.4161/psb.11028>.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901-3907.
- Jones, Kathryn M, Natalya Sharopova, Dasharath P Lohar, Jennifer Q Zhang, Kathryn A VandenBosch, and Graham C Walker. 2008. Differential Response

- of the Plant *Medicago Truncatula* to Its Symbiont or an Exopolysaccharide-Deficient Mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2): 704 LP – 709. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709338105>.
- Karimi, Mansour, Dirk Inzé, and Ann Depicker. 2002. GATEWAY™ Vectors for *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation. *Trends in Plant Science* 7 (5): 193–95. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3).
- Kibbe, W. A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35, 43-46.
- Kofuji, Rumiko, Naomi Sumikawa, Misuzu Yamasaki, Kimihiko Kondo, Kunihiro Ueda, Motomi Ito, and Mitsuyasu Hasebe. 2003. Evolution and Divergence of the MADS-Box Gene Family Based on Genome-Wide Expression Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 20 (12): 1963–77. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg216>.
- Latchman, David S. 1997. Transcription Factors: An Overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (12): 1305–12. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X).
- Limpens, Erik, Carolien Franken, Patrick Smit, Joost Willemsse, Ton Bisseling, and René Geurts. 2003. LysM Domain Receptor Kinases Regulating Rhizobial Nod Factor-Induced Infection. *Science* 302 (5645): 630–33.
- Liu, Juhua, Jing Zhang, Jianbin Zhang, Hongxia Miao, Jingyi Wang, Pengzhao Gao, Wei Hu, et al. 2017. Genome-Wide Analysis of Banana MADS-Box Family Closely Related to Fruit Development and Ripening. *Scientific Reports* 7 (1): 3467. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03897-1>.
- Lloyd, Alan. 2003. Vector Construction for Gene Overexpression as a Tool to Elucidate Gene Function BT. In, Erich Grotewold (ed.). 329–344. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:329>.
- Long, S R. 1996. *Rhizobium* Symbiosis: Nod Factors in Perspective. *The Plant Cell* 8 (10): 1885–98. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1885>.

- MA, Wen-ya, Wei LIU, Wen-sheng HOU, Shi SUN, Bing-jun JIANG, Tian-fu HAN, Yong-jun FENG, and Cun-xiang WU. 2019. "GmNMH7, a MADS-Box Transcription Factor, Inhibits Root Development and Nodulation of Soybean (*Glycine Max* [L.] Merr.)." *Journal of Integrative Agriculture* 18 (3): 553–62. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61992-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61992-6).
- Mandel, M A, and M F Yanofsky. 1995. The Arabidopsis *AGL8* MADS Box Gene Is Expressed in Inflorescence Meristems and Is Negatively Regulated by *APETALA1*. *The Plant Cell* 7 (11): 1763-1771. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.11.1763>.
- Maróti, G., & Kondorosi, É. (2014). Nitrogen-fixing Rhizobium-legume symbiosis: are polyploidy and host peptide-governed symbiont differentiation general principles of endosymbiosis?. *Frontiers in Microbiology*, 5, 326.
- Maunoury, N, A Kondorosi, E Kondorosi, and P Mergaert. 2008. Cell Biology Of Nodule Infection And Development BT - Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses. In , Michael J Dilworth, Euan K James, Janet I Sprent, and William E Newton (eds), 153–89. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3548-7_6).
- Moore, L., Warren, G., & Strobel, G. (1979). Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 2(4), 617-626.
- Müller, Joachim, Thomas Boller, and Andres Wiemken. 2001. Trehalose Becomes the Most Abundant Non-structural Carbohydrate during Senescence of Soybean Nodules. *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 943–47. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.943>.
- Mylona, P, K Pawlowski, and T Bisseling. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell* 7 (7): 869–85. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.869>.
- Nakagawa, Tsuyoshi, Takamasa Suzuki, Satoko Murata, Shinya Nakamura, Takeshi Hino, Kenichiro Maeo, Ryo Tabata, et al. 2007. Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*

71 (8): 2095–2100. <https://doi.org/10.1271/bbb.70216>.

Nanjareddy, Kalpana, Manoj-Kumar Arthikala, Brenda-Mariana Gómez, Lourdes Blanco, and Miguel Lara. 2017. Differentially Expressed Genes in Mycorrhized and Nodulated Roots of Common Bean Are Associated with Defense, Cell Wall Architecture, N Metabolism, and P Metabolism. *PLOS ONE* 12 (8): e0182328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182328>.

Nova-Franco, Bárbara, Luis P Íñiguez, Oswaldo Valdés-López, Xochitl Alvarado-Affantranger, Alfonso Leija, Sara I Fuentes, Mario Ramírez, et al. 2015. “The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the Common Bean *Rhizobium* Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology* 168 (1): 273 – 291. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255547>.

Oldroyd, Giles E D, and J Allan Downie. 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59 (1): 519–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>.

O’Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., & Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC genomics*, 15 (1), 1-17.

Pařenicová, Lucie, Stefan de Folter, Martin Kieffer, David S Horner, Cristina Favalli, Jacqueline Busscher, Holly E Cook, et al. 2003. Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15 (7): 1538 – 1551. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>.

Perret, Xavier, Christian Staehelin, and William J Broughton. 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (1): 180–201.

Porto, Milena Silva, Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro, Vandré Guevara Lyra Batista, Roseane Cavalcanti dos Santos, Péricles de Albuquerque Melo Filho, and Liziane Maria de Lima. 2014. Plant Promoters: An Approach of Structure and Function. *Molecular Biotechnology* 56 (1): 38–49.



<https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>.

SAGARPA. 2017. "Planeación Agrícola Nacional. Recuperado el 20 de febrero del 2022 Ciudad de México.

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B\\_sico-Frijol.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256428/B_sico-Frijol.pdf).

Salinas, Gabriela. 2015. El Papel Del Frijol En La Salud Nutrimental de La Población Mexicana. Recuperado el 20 de febrero del 2022 *Revista Digital Universitaria* 16 (2).

<http://www.ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2294?show=full>.

Santillán, Luisa. 2014. La Milpa, Clave Para La Seguridad Alimenticia y El Aprovechamiento Sostenible de La Biodiversidad. Recuperado el 22 de febrero del 2022 CIENCIA UNAM.

[http://ciencia.unam.mx/leer/356/La\\_milpa\\_tradicion\\_milenaria\\_de\\_agricultura\\_familiar](http://ciencia.unam.mx/leer/356/La_milpa_tradicion_milenaria_de_agricultura_familiar).

Schwartz, H F, M A P Corrales, and Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1989. *Bean Production Problems in the Tropics*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

<https://books.google.com.mx/books?id=jz76qSE1CL4C>.

Sinkar, Vilas P, Frank F White, and Milton P Gordon. 1987. Molecular Biology of Ri-Plasmid—A Review. *Journal of Biosciences* 11 (1): 47–57.

<https://doi.org/10.1007/BF02704657>.

Soyano, Takashi, and Makoto Hayashi. 2014. Transcriptional Networks Leading to Symbiotic Nodule Organogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 20: 146–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.010>.

Svetleva, D, M Velcheva, and G Bhowmik. 2003. Biotechnology as a Useful Tool in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Improvement. *Euphytica* 131 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1023/A:1023983831582>.

Tamura, Koichiro, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei, and Sudhir Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics

Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731–39. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>.

Tapia-López, Rosalinda, Berenice García-Ponce, Joseph G Dubrovsky, Adriana Garay-Arroyo, Rigoberto V Pérez-Ruíz, Sun-Hyung Kim, Francisca Acevedo, Soraya Pelaz, and Elena R Alvarez-Buylla. 2008. An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146 (3): 1182–92.

Tepfer, D. 1990. Genetic Transformation Using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiologia Plantarum* 79 (1): 140–46. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x>.

Terpolilli, J. J., Hood, G. A., & Poole, P. S. (2012). What determines the efficiency of N<sub>2</sub>-fixing Rhizobium-legume symbioses?. *Advances in microbial physiology*, 60, 325-389.

Tohidfar, Masoud, and Solmaz Khosravi. 2015. Transgenic Crops with an Improved Resistance to Biotic Stresses. A Review. *BASE*. (19) 1, 62-70

Toledo, I., Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 54-64.

Udvardi, Michael K, Klementina Kakar, Maren Wandrey, Ombretta Montanari, Jeremy Murray, Andry Andrianakaja, Ji-Yi Zhang, et al. 2007. Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment. *Plant Physiology* 144 (2): 538–49. <https://doi.org/10.1104/pp.107.098061>.

Ulloa, José Armando, Petra Rosas Ulloa, José Carmen Ramírez Ramírez, and Blanca Estela Ulloa Rangel. 2011. El Frijol (*Phaseolus vulgaris*): Su Importancia Nutricional y Como Fuente de Fitoquímicos. *Revista de divulgación de la Universidad Autónoma de Nayarit*.(8) 5-9

- Veena, Veena, and Christopher G Taylor. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: Recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43 (5): 383–403.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>.
- Wang, Q., Liu, J., & Zhu, H. (2018). Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 313.
- Wang, Qi, Shengming Yang, Jinge Liu, Kata Terecskei, Edit Ábrahám, Anikó Gombár, Ágota Domonkos, et al. 2017. Host-Secreted Antimicrobial Peptide Enforces Symbiotic Selectivity in *Medicago Truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (26): 6854 – 6859.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1700715114>.
- Wei, L. I. U., HOU, W. S., Shi, S. U. N., JIANG, B. J., HAN, T. F., FENG, Y. J., & WU, C. X. (2019). GmNMH7, a MADS-box transcription factor, inhibits root development and nodulation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3), 553-562.
- Xie, Fang, Jeremy D Murray, Jiyoung Kim, Anne B Heckmann, Anne Edwards, Giles E D Oldroyd, and J Allan Downie. 2012. Legume Pectate Lyase Required for Root Infection by Rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2): 633 – 638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113992109>.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Zahran, Hamdi Hussein. 1999. Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (4): 968 LP – 989. <http://mmb.asm.org/content/63/4/968.abstract>.