



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL
DEL GEN *NLP4* y *NLP6* COMO NUEVOS REGULADORES DE LA
NODULACIÓN DE *P. VULGARIS* DURANTE LA SIMBIOSIS CON
RHIZOBIUM TROPICI.**

**FORMA DE TITULACIÓN: TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS**

**P R E S E N T A:
BRENDA AZUCENA FLORES MORENO**

**TUTOR: DR. MANOJKUMAR ARTHIKALA
ASESORA: DRA. KALPANA NANJAREDDY
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.

Índice

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas.....	2
Agradecimientos.....	3
Dedicatoria.....	4
Glosario.....	5
Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. Importancia de <i>Phaseolus vulgaris</i> en México.....	8
1.2. Papel del nitrógeno.....	9
1.3. Proceso de Simbiosis.....	11
1.4. Función de la bacteria <i>Rhizobium</i>	13
1.5. Papel de NIN-LIKE PROTEINS (NLPs).....	15
1.6. Papel de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> en la simbiosis.....	17
1.1. Estudio de Promotores.....	19
2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo principal.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Justificación.....	21
5. Antecedentes.....	23
5.1. Raíces pilosas (hairy roots) en <i>P. vulgaris</i>	23
5.2. Análisis GUS.....	25

5.3.	Análisis GUS de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	26
5.4.	Papel de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el proceso de nodulación	27
5.5.	Interacción de los <i>NLPs</i> con otros genes de la ruta simbiótica.....	30
5.6.	Nivel de expresión de la familia <i>NLPs</i>	33
5.7.	Ruta simbiótica	34
6.	Metodología.....	38
6.1.	Identificación del nivel de expresión de <i>pNLP6</i> y <i>pNLP4</i> en <i>P. vulgaris</i>	38
6.2.	Secuencia del promotor <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	38
6.3.	Diseño de oligos para <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	39
6.4.	Aislamiento y clonación del promotor de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	40
6.5.	Esterilización de semillas.....	40
6.6.	Germinación de semillas.....	41
6.7.	Extracción de DNA genómico de <i>P. vulgaris</i>	41
6.8.	Amplificación de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> mediante PCR.....	41
6.9.	Visualización y aislamiento del fragmento	42
6.10.	Clonación del promotor <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el vector pENTR/D- TOPO.....	43
6.11.	Transformación en <i>E. coli</i>	43
6.12.	Aislamiento de plásmido y secuenciación.....	43
6.13.	Clonación de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el vector destino	44
6.14.	Transformación de <i>E. coli</i> y <i>A. rhizogenes</i> en el vector final	44
6.15.	Estudio de la expresión espacio-temporal de <i>pNLP6</i> y <i>pNLP4</i> durante la simbiosis	45
6.16.	Generación de raíces pilosas (hairy roots) en <i>P. vulgaris</i>	45

6.17. Preparación de material para inyección.....	45
6.18. Inyección de <i>A. rhizogenes</i>	45
6.19. Inoculación de <i>P. vulgaris</i> con <i>R. tropici</i>	46
6.20. Ensayo de análisis GUS.....	47
6.21. Microscopía.....	47
7. Resultados.....	48
7.1. Diseño de oligos para amplificación de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	48
7.2. Aislamiento y clonación del promotor <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	48
7.3. Transformación de <i>E. coli</i> con el vector de entrada pENTR/D-TOPO en <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	50
7.4. Transformación de <i>A. rhizogenes</i> con el vector final pBGWFS7.0 en <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	51
7.5. Inducción de raíces pilosas (hairy roots) de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	52
7.6. Sistema de inducción de raíces pilosas (hairy roots) <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	53
7.7. Análisis de patrones de expresión en <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> sin <i>R. tropici</i> silvestre.....	55
7.8. Análisis de los patrones de expresión en <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> con <i>R. tropici</i> silvestre.....	57
7.9. Expresión del promotor <i>NLP6</i> en raíces inoculadas con <i>R. tropici</i> silvestre.....	57
7.10. Análisis de los patrones de expresión <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en la nodulación.....	59
7.11. Infección del pelo radicular en <i>P. vulgaris</i> por <i>R. tropici</i> silvestre.....	59
7.12. Colonización: Formación de puntos de infección.....	60
7.13. División de células corticales.....	60
7.14. Análisis de la expresión <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el desarrollo de la nodulación.....	62
7.15. Patrones de expresión del promotor <i>NLP6</i> en el proceso de nodulación.....	64
7.16. Patrones de expresión del promotor <i>NLP4</i> en el proceso de nodulación.....	65

7.17. Analisis de la expresión de GUS en secciones transversales de nódulos <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en <i>P. vulgaris</i>	67
7.18. Expresión mediada por el promotor <i>NLP4</i> en cortes transversales nodulares	67
7.19. Expresión del promotor <i>NLP6</i> en cortes transversales nodulares	68
7.20. Expresión de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en la actividad de nódulos maduros	70
7.21. Expresión del promotor <i>pNLP6</i>	70
7.22. Expresión del promotor <i>pNLP4</i>	71
7.23. Variaciones en los patrones de expresión de <i>pNLP6</i> y <i>pNLP4</i> en nódulos activos	73
8. Discusión	74
8.1. Patrones de expresión espacio temporal del promotor <i>NLP6</i> :.....	75
8.2. Patrones de expresión espacio temporal del promotor <i>NLP4</i>	76
9.1. Expresión de <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en nódulos activos en la simbiosis con <i>R. tropici</i>	77
9.2. Expresión <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> antes y después de la inoculación.....	79
9.3. <i>NLP4</i> y <i>NLP6</i> como inductores en el inicio de la nodulación con <i>R. tropici</i> silvestre	80
9.4. Expresión del <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el proceso tardío de la nodulación.....	81
9.5. Análisis del <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i> en el transporte de nitrógeno	82
9. Conclusiones	84
9.6. Perspectivas a futuro	85
10. Productos generados.....	85
10.1. Artículos.....	86
10.2. Congresos	86
11. Bibliografía.....	88

12. Anexos.....	99
12.1. ANEXO 1: Extracción del ADN genómico de semillas de <i>P. vulgaris</i>	99
12.2. ANEXO 2: Extracción de ADN fragmento <i>pNLP4</i> y <i>pNLP6</i>	101
12.3. ANEXO 3: Extracción del plásmido bacteriano mediante Miniprep	103
12.4. ANEXO 4: Figuras	106
12.5. ANEXO 4:Tablas	107
12.6. Programas PCR.....	110
12.7. Secuencias de los promotores <i>NLP4</i> y <i>NLP6</i>	111

Índice de figuras

Figura 1. Regulación de la fijación simbiótica de nitrógeno en los nódulos de las raíces de las leguminosas.

Figura 2. Proceso de nodulación en *P. vulgaris*.

Figura 3. Inicio de la infección de *Rhizobium* en *P. vulgaris*.

Figura 4. Análisis de datos de RNA seq de la proteína de la familia NLPs en *P. vulgaris*

Figura 5. Desarrollo de la formación del nódulo en diferentes etapas.

Figura 6. Desarrollo de la vasculatura nodular.

Figura 7. Amplificación por PCR del promotor *NLP4* y *NLP6*.

Figura 8. PCR de transformación de *E. coli* con pENTR/D-TOPO/*pNLP4* y pENTR/D-TOPO/*pNLP6*.

Figura 9. PCR de transformación de *E. coli* con *A. rhizogenes* cepa K599 con el vector pBGWFS7.0/*pNLP4* y pBGWFS7.0/*pNLP6*.

Figura 10. Inducción de hairy roots mediante la transferencia de material genético de *A. rhizogenes* a *P. vulgaris*.

Figura 11. Generación de raíces peludas (hairy roots) *pNLP4* y *pNLP6*.

Figura 12. Patrones de expresión espacial y temporal de *pNLP4* Y *pNLP6* sin inoculación (sin *R. tropici* silvestre).

Figura 13. Patrones de expresión espacio-temporal de *pNLP4* y *pNLP6* con inoculación (*R. tropici* silvestre).

Figura 14. Expresión espacio-temporal de *pNLP4* y *pNLP6* en el inicio de la infección con *R. tropici* silvestre.

Figura 15. Desarrollo de nódulos control de *pNLP4* y *pNLP6*.

Figura 16. Patrones de expresión espacio temporal de *pNLP4* y *pNLP6* en el proceso de nodulación.

Figura 17. Etapas del desarrollo de la nodulación de *pNLP4* y *pNLP6* en cortes transversales bajo análisis GUS.

Figura 18. Análisis de la expresión de *pNLP4* y *pNLP6* bajo análisis GUS en nódulos maduros con *R. tropici* silvestre.

Índice de tablas

Tabla 1. Preparación de oligos para la amplificación del promotor de *NLP4* y *NLP6*.

Tabla 2. Condiciones del programa PCR Amplificación del promotor *NLP4* y *NLP6*.

Tabla 3. Diseño de oligos finales específicos para la amplificación de *NLP4* y *NLP6*.

ANEXOS: Protocolos, tablas, figuras como material suplementario de esta investigación:

ANEXO 1: 1°Protocolo:kit DNeasy Plant Pro and Plant®. Procedimiento: Extracción del ADN genómico de semillas de *P. vulgaris*.

ANEXO 2: 2°Protocolo:kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction®Procedimiento: Extracción del ADN de la banda del gel de agarosa que contiene el fragmento del gen de interés.

ANEXO 3: 3° Protocolo : kit GeneEluted Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich)®Procedimiento: Purificación y extracción del plásmido de bacteria mediante Miniprep

ANEXO 4: Tablas.

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

Tabla A2. Composición del medio PY sólido.

Tabla A3. Composición del buffer GUS-x gluc volumen 10 mL.

Tabla A4. Concentraciones de la transformación con el vector final y promotor *NLP4* y *NLP6*.

Tabla A5. Programa y componentes de reacción PCR para la amplificación del promotor *NLP4* y *NLP6*.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mi familia y a mis padres por el enorme apoyo brindado en todo momento, por motivarme siempre a no rendirme. A mi hermana, gracias por la ayuda incondicional siempre en todo momento y por acompañarme en todas las noches que los desvelos eran interminables y obvio también a Rocky por alegrarme los días. Ustedes son mi motor, por lo que sigo luchando y esto fue posible gracias a ellos, me siento muy orgullosa de ustedes, INFINITAS GRACIAS POR TANTO a pesar de todos los problemas y este logro también es suyo.

De igual manera, agradezco profundamente a mis geniales asesores, el Dr. Manojkumar Arthikala y la Dra. Kalpana Nanjareddy por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y siempre impulsarme a pesar de las muchas dificultades que tuvimos a lo largo de este proyecto. Muchísimas gracias por ser mis mentores y permitirme aprender de ustedes. Así mismo agradezco a mis sinodales y profesores, a la Dra. Harumi por siempre estar al pendiente y el apoyo brindado durante todo el proceso.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA/PAPIIT-UNAM, clave no. IN213221 e IN216321 por apoyar con la beca para la conclusión de estudios. Además agradecimientos a mi institución por darme tanto y tantas personas durante este gran viaje. Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII) ENES León-UNAM en las instalaciones de la UNAM: Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León (ENES León). Finalmente agradezco al proyecto CONACYT CF-MI-20191017134234199/316538 por apoyar parcialmente este trabajo.

Dedicatoria

De manera muy especial, agradezco a todo mi equipo de trabajo: Tona, Pau, Caro, Lau, Nataly y Dani por siempre apoyarme en todo. Obviamente, agradecimientos especiales a mis compañeros de laboratorio por seguirnos impulsando hasta el final: Monse, Moni, Juan, Josh, Paul, Rod son personas maravillosas, estoy muy feliz de ver todo lo que han crecido y logrado a lo largo de todo este tiempo.

Quiero dedicar un agradecimiento muy especial a Jacobo, por su inmensa ayuda durante toda mi estancia en el laboratorio y no solo en eso si no en todo momento y por sus sabios consejos.

Infinitas gracias de verdad a mis amigas que fueron el apoyo incondicional en los momentos de crisis: Clau, Nere, Nancy, Evelyn Gracias mil gracias por creer en mí y enserio que ustedes también han sido mi ejemplo de perseverancia y admiración.

Glosario

GUS: GUS assay / Ensayo GUS / β -glucuronidasa

NF: Nod Factors / Factores Nod

TF: Transcription Factor / Factor de transcripción

Hr: Hairy roots / Raíces peludas

ITs: Infection thread / Hilo conductor de la infección

Ipk: Infection pocket / Bolsillo de infección

Nd: Nodule primordia / Primordio del nódulo

Cc: Cortical cell / Célula cortical

Dv: División cortical cells / Células de división cortical

Dpi: Days post inoculation *R. tropici* / *Días después de la inoculación R. tropici*

Nf: Nodule formation starts zones / zonas de formación de nódulos comienzan

Mz: Meristematic zone / Zona meristemática

Vc: Vasculature nodule / Nódulo de vasculatura

Nm: Nodule mature / Nódulo maduro

Sy: Symbiosome / Simbiosoma

Ny: Young nodule / Nódulo juvenil

Ne: Nodule early stage / Nódulo en etapa temprana.

Ir: Lateral root / Raíz lateral

Vr: Vasculature radical / Vasculatura radical

Zd: Differentiation Zone / Zona Diferenciación

Ze: Elongation zone / Zona de elongación

R. tropici: *Rhizobium tropici*

P. vulgaris: *Phaseolus vulgaris*.

pNLP4/pNLP6: Promotor *NLP4* y *NLP6* en *P. vulgaris*.

Resumen

La familia de genes NIN (Nodule Inception) de las plantas codifica factores de transcripción como las proteínas NIN like Proteins (*NLPs*), que desempeñan un papel clave en la eficiencia del uso del nitrógeno. Sin embargo, la regulación de la familia *NLPs* en la nodulación de las leguminosas ha sido poco conocida. Investigaciones anteriores del equipo de trabajo realizaron un análisis de RNA-Seq que muestran que las proteínas *NLPs* se expresan específicamente bajo la simbiosis de *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici*. El presente trabajo se centró en el estudio de los perfiles de expresión espacio-temporal del promotor de *NLP4* y *NLP6* de *P. vulgaris* durante la formación y el desarrollo de los nódulos. Para ello, primero amplificamos ambos genes (*NLP4* y *NLP6*) del genoma de *P. vulgaris* y los clonamos en el vector binario pBGWSF7.0/Pr*NLP*:GUS utilizando el sistema de clonación Gateway. El vector binario clonado se transformó en la cepa K599 de *Agrobacterium rhizogenes*. Para generar raíces peludas transgénicas, se inyectó el vector pBGWSF7.0/Pr*NLP*::GUS-GFP de *A. rhizogenes* K599 en plántulas de *P. vulgaris* de 2 días de edad. Posteriormente, se inocularon raíces peludas de 10 días de edad con *Rhizobium tropici* de tipo salvaje para inducir la nodulación en las raíces y se estudió la expresión espacio-temporal del promotor de *pNLP4* y *pNLP6* en diferentes puntos temporales mediante el ensayo histoquímico de GUS. Nuestros resultados muestran que la expresión de ambos promotores *pNLP4* y *pNLP6* fue inducida en la zona de elongación de la raíz tras la inoculación de *Rhizobium* en las raíces peludas transgénicas después de 3 días post-inoculación (dpi). En conjunto, concluimos que *pNLP6* se expresa de manera más general y uniforme durante todo el desarrollo de la nodulación y en etapa de maduración. En cambio, *pNLP4* tiene expresión más específica en etapa temprana de la infección en la progresión del hilo de infección y formación de primordios. En nódulos maduros, *pNLP4* expresa en la periferia del nódulo y en la membrana plasmática de las células infectadas. Ambos promotores *pNLP4* y *pNLP6* se expresan activamente en los simbiosomas de nódulos maduros (21 dpi) con expresión de forma contraria. *pNLP6* se expresa de forma más general durante todo el proceso de nodulación. Especialmente en la zona del núcleo del nódulo y en el citoplasma de las células infectadas. Por lo cual, estos resultados indican que *pNLP4* y *pNLP6* tienen un papel relevante en el inicio de la nodulación y podrían ser nuevos reguladores en la simbiosis rizobiana de *P. vulgaris*.

Palabras clave: vía simbiótica, nodulación, análisis de promotores, raíces pilosas.

1. Introducción

1.1. Importancia de *Phaseolus vulgaris* en México.

Phaseolus vulgaris mejor conocida como el frijol común, es una de las bases de la alimentación en México, su cultivo es de suma importancia socioeconómica, tanto por la extensión de tierra que se ocupa para su producción así como por el consumo per cápita. El frijol común pertenece a la familia de las fabáceas y es una de las principales leguminosas a nivel mundial por su alto valor nutritivo e interés comercial. Su cultivo representa la legumbre de mayor relevancia en la dieta humana, al proveer proteínas y carbohidratos (Nápoles *et al.*, 2016).

Phaseolus vulgaris es una especie que ha sido extensivamente manipulada para la generación de variedades. En México, uno de los centros de origen del género *Phaseolus*, existen más de 150 especies, de las cuales 50 se encuentran en México, la mayoría de ellas ha sido caracterizada principalmente de manera morfológica y agronómica. Sin embargo, la caracterización molecular de las variedades es importante para tener un mejor manejo de las problemáticas que afectan a este cultivo tan importante (Reyes *et al.*, 2011).

Como leguminosa, *P. vulgaris* se puede asociar a bacterias del suelo que fijan nitrógeno, lo que le posibilita crecer en condiciones de bajo contenido de nitrógeno. En México y en otros países de Latinoamérica el frijol es la fuente de proteína y de alimento principal al presentar una alta carga nutricional y debido a su relativamente corto proceso de producción. Gracias a su alta disponibilidad, su bajo precio y símbolo cultural en México se cultivan alrededor de 70 variedades de frijol, que se distribuyen en 7 grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados (Cornelio Chimborazo, 2015).

Las variedades de mayor consumo son: Azufrado, Negro Jamapa, Peruano, Flor de mayo y Flor de junio. La variedad Negro Jamapa (frijol negro) tiene una alta demanda que se concentra en las regiones centro y sur del país. Sin embargo, en los últimos años en México, el área de siembra de frijol se ha reducido hasta en poco más de un 25 % en un periodo de 10 años desde el 2002 al 2012 aproximadamente (Casa Tipán, 2014).

Esto ha ocasionado que el rendimiento promedio (ton/ha) de la producción disminuya de manera significativa. Al disminuir el abastecimiento del frijol también disminuye el impacto y productividad económica. La disminución se debe a distintos factores entre ellos la sequía, la falta de nutrientes en los suelos, los agentes patógenos y sobre todo un mal manejo de su nutrición (Pérez Téllez, 2019).

Es por ello que la presente investigación pretende ofrecer un panorama general al realizarse sobre esta leguminosa *P. vulgaris*, dado su importancia económica y nutricional. Además de ofrecer información que podría ayudar a llevar a cabo un mejor manejo sobre el proceso de nodulación, nutrición y fijación del nitrógeno (Flores, 2015).

1.2. Papel del nitrógeno

El nitrógeno constituye un nutriente esencial y componente estructural de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, esenciales para los procesos de crecimiento y producción en las plantas. El nitrógeno es uno de los principales factores que provocan estrés sobre todo en las leguminosas, la mayoría por deficiencia o toxicidad. Cuando hay déficit de nitrógeno, habrá un factor limitante del crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos (Lattanzi., 2004).

La falta de nitrógeno en las leguminosas ocasiona un bajo rendimiento en el fruto, mayor susceptibilidad a enfermedades y sobre todo un bajo crecimiento y menor desarrollo en general (Otori *et al.*, 2017). La fijación del nitrógeno atmosférico en el suelo aporta grandes beneficios para las plantas ya que evita la erosión del mismo, además de perfeccionar su composición (Sánchez & Romero, 2016).

Dicho fenómeno repercute en el incremento de su actividad biológica y por lo tanto una mayor disponibilidad de nutrientes para el desarrollo óptimo de la planta. Una de las propiedades relevantes de un suelo con microorganismos que ayuden a la fijación de nitrógeno, es que reducen la filtración y pérdida de nutrientes (Ávila-Serrano *et al.*, 2005).

Lo cual conlleva a un mayor índice de producción económica en cultivos de interés comercial. La familia de las leguminosas tiene un alto índice de producción de nitrógeno en el suelo, la cual se da en la mayoría de las veces por el proceso llamado simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Aguilar Benítez *et al.*, 2017). Las plantas tienen la posibilidad de utilizar diversas fuentes de nitrógeno entre ellas el nitrato y amonio (Ho *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2009).

Ambos componentes podrían aumentar la tolerancia de las plantas leguminosas al estrés biótico y abiótico como por ejemplo la sequía y heladas. El nitrógeno es el principal nutriente que las plantas de la familia de las leguminosas necesitan en abundancia. La mayoría de los suelos del mundo son deficientes en nitrógeno y nitrato (Sigala & Olliet, 2019).

Estos últimos son una de las principales fuentes de nitrógeno para las plantas terrestres, las cuales deben adaptar su crecimiento y metabolismo en respuesta a las fluctuaciones en la disponibilidad de nitrógeno. El nitrato es una molécula de señalización importante que regula esta adaptación (Gojon *et al.*, 2009).

Los nitratos regulan la expresión de muchos genes, incluidos los genes implicados en su absorción y los genes de la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (NIR) (Gowri *et al.*, 1992); (Roy *et al.*, 2020). Se considera que el nitrato activa factores de transcripción preexistentes para llevar a cabo estos mecanismos de regulación. Sin embargo, aún se desconoce a profundidad los mecanismos moleculares implicados a nivel postraduccional. Así mismo, aún es poca la información sobre la identificación y activación en los mecanismos de respuesta al nitrato (Remans *et al.*, 2006).

1.3. Proceso de Simbiosis

La simbiosis es un proceso en el que las bacterias fijadoras de nitrógeno ayudan a regular la disponibilidad del nitrógeno atmosférico, para que pueda ser absorbido por las plantas. Esta asociación simbiótica que permite una mejor fijación de nitrógeno es común en las leguminosas. Una de las asociaciones simbióticas más comunes es a través de las bacterias del género *Rhizobium* (Clúa, 2018).

Estudios anteriores indican que la simbiosis mejora el estado nutricional de la planta, así como el grado de nutrientes en el suelo (He & Jia, 2013). La formación de nódulos en las raíces de las leguminosas y otras plantas habitadas por bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno puede darse a través de una cepa presente en el suelo o por medio de una cepa específica. Cuando se le agrega la cepa de una bacteria fijadora de nitrógeno, se dice que la planta ha sido inoculada (Ávila-Serrano *et al.*, 2005).

La simbiosis rizobio-leguminosa representa una habilidad importante cuando hay escasez o poca disponibilidad de nitrógeno en el sustrato (Berrabah *et al.*, 2019). Se sabe que la autorregulación de la nodulación es un mecanismo en las leguminosas que tiene la función de controlar cuántos nódulos hay en el sistema radicular. Debido a ello, se debe mantener un equilibrio entre la interacción de raíces y brotes, así como la pérdida y ganancia de nitrógeno (Nishida *et al.*, 2018).

El proceso de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno como el género *Rhizobium*, especialmente en legumbres es una de las estrategias más usadas actualmente para mejorar el rendimiento de manera general de las plantas. Este proceso se lleva a cabo por el crecimiento de nódulos que permiten una mayor fijación y disponibilidad del nitrógeno (Pedraza *et al.*, 2010).

La capacidad de las leguminosas de establecer una asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno es de fundamental importancia para la incorporación de nitrógeno en los suelos. Si bien en los últimos años se ha avanzado en la identificación de genes

de la planta requeridos para la nodulación, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos moleculares que regulan este proceso complejo (Traubenik, 2020).

Durante este proceso, se integra y coordina la infección de la bacteria, el desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa en respuesta a las señales del ambiente. El valor en la nodulación comúnmente va asociado al contenido de clorofilas y con ello en teoría un mejor impacto en la fijación de nitrógeno (Barbosa, 2016). De acuerdo a la literatura, se sabe que el frijol común genera y transloca el nitrógeno a modo de ureidos, alantoína y alantoato. De este grupo, los ureidos son considerados como los más favorables para trasladar el nitrógeno energéticamente, incluso desde los nódulos hasta las hojas. Bajo este análisis, se ha demostrado que únicamente necesitan la mitad de ATP fundamental para generar amidas en su síntesis y menos carbono, lo cual le confiere ventajas a estas leguminosas (Nápoles *et al.*, 2016).

La interacción simbiótica conduce al desarrollo de un nuevo órgano en las leguminosas llamado nódulo, el cual tiene la función de fijar el nitrógeno atmosférico cuando se encuentra activo. En los casos donde se establece una simbiosis, los procesos de penetración, infección e invasión de las células por parte de las bacterias del tipo *Rhizobium*, están regulados por la expresión de genes específicos que inducen dicho proceso (Paredes, 2013).

Dicha asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno es de importante trascendencia para la integración de nitrógeno en los suelos. En los últimos años, se ha avanzado en la identificación y función de aquellos reguladores clave que inducen la expresión de aquellos genes implicados solo en la regulación del nitrógeno en las leguminosas. Sin embargo, todavía se desconocen varios puntos de los mecanismos moleculares que regulan un proceso complejo, en el cual se incorporan y coordinan la infección de la bacteria, el desarrollo de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa y las señales del ambiente. Así mismo, se debe considerar que la expresión génica es regulada por múltiples factores y diversos niveles, que implican eventos nucleares y citoplasmáticos (Traubenik, 2020).

1.4. Función de la bacteria *Rhizobium*

Actualmente hay diferentes tratamientos para inducir la inoculación de leguminosas con bacterias endosimbióticas fijadoras de nitrógeno dichos son microorganismos del género *Rhizobium* pueden actuar en relación simbiótica con la planta, por medio de la formación de nódulos. El proceso de las rutas simbióticas involucradas forma una serie de interacciones químicas y físicas entre las leguminosas y los rizobios. Esto se da a través de procesos de señalización que desencadenan cambios en la expresión génica (Paredes, 2013).

Entonces, cuando la bacteria ingresa a las células epidérmicas y corticales de la planta, induce la división de las células de la raíz y la formación de los meristemos de los nódulos. De esta manera se producen orgánulos celulares especializados "simbiosomas", los cuales contienen uno o más bacteroides fijadores de nitrógeno

Durante este proceso de infección la bacteria *Rhizobium* entra a través de los pelos radiculares y se adentra hasta llegar a las células corticales. Posterior a esta etapa las bacterias se ramifican y se liberan mediante células infectadas formando un solo simbionte. Dentro de este nuevo "organelo", las bacterias crecerán y se dividirán junto con la membrana simbionte producida por la planta (Velázquez *et al.*, 2005).

La organogénesis de los nódulos está impulsada por tres procesos característicos que ocurren simultáneamente: colonización bacteriana, iniciación de nódulos y autorregulación del número de nódulos. Debido a que es un proceso complejo, la formación de nódulos incluye dos formas. Las leguminosas en general pueden formar nódulos determinados o indeterminados (Roth y Stacey, 1989).

Por ejemplo, en las legumbres como *Medicago truncatula* tiene meristemos nodulares persistentes que forman nódulos "indeterminados" largos y en ocasiones, multilobulados, mientras que los nódulos "determinados", en su mayoría esféricos, están formados por la actividad transitoria de los meristemas en los nódulos de especies como *Lotus japonicus*, *P. vulgaris* y *Glycine max* (Roy *et al.*, 2020).

Varias plantas establecen una interacción estrecha y persistente con bacterias fijadoras de nitrógeno (Todd *et al.*, 2004). Esta simbiosis, que da beneficios a lo largo de la vida en común a los dos simbiosistas, se hace en nódulos radiculares, en los que el nitrógeno atmosférico se fija y se transporta a la planta a modo de compuestos orgánicos nitrogenados. De esta simbiosis la planta recibe nitrógeno y la bacteria ácido málico en su forma ionizada (malato) y refugio (García, 2011).

El malato es un compuesto orgánico implicado en las primordiales rutas del metabolismo, como son el periodo de Krebs indispensables para el desarrollo óptimo de la planta. En diversos estudios se menciona que inocular con cepas de *Rhizobium* directamente hace que el proceso de nodulación sea más rápido que de forma natural. Actualmente *Rhizobium tropici* es una de las cepas más usadas para inducir la nodulación en *P. vulgaris* (García, 2011).

Se sabe que las raíces de las leguminosas tienen una relación simbiótica con las bacterias rizobios que conduce a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. El desarrollo de nódulos es un proceso complejo y estrictamente controlado. Primeramente, el proceso de simbiosis comienza con el intercambio de señales entre los dos socios. Un gran número de factores de transcripción (TF) participan en uno o más pasos de esta simbiosis (Oldroyd *et al.*, 2008).

La adhesión de los rizobios a las células de los pelos de la raíz en los llamados puntos de infección dará lugar a rizobios en división. De esta forma, los rizobios dentro de los simbiosomas se diferencian en bacteroides fijadores de N que liberan amoníaco en la célula huésped a cambio de carbono y otros nutrientes de la planta. Posteriormente, el desarrollo de un nuevo orgánulo colonizado por rizobios conduce a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Udvardi y Poole, 2013).

1.5. Papel de NIN-LIKE PROTEINS (NLPs)

Las proteínas (NLPs) NODULE-INCEPTION son factores de transcripción clave que regulan la organogénesis del nódulo (Schauser *et al.*, 1999; Tirichine *et al.*, 2007; Suzaki *et al.*, 2012; Soyano *et al.*, 2013). La actividad de la familia NIN se presenta río arriba de otros factores de Señalización Simbiótica (Nishida *et al.*, 2018). Se conoce que el papel de NIN tiende a ser regulado por los nitratos. Por ello, se cree que los miembros de dicha subfamilia NLPs representan un papel importante en la autorregulación de la nodulación, así como en la respuestas a la deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, aún no está claro cómo dicho proceso interactúa en la vía simbiótica de la nodulación temprana (Liu *et al.*, 2018).

Recientemente se ha catalogado a la familia de proteínas NIN-LIKE en *P. vulgaris* como elementos que intervienen en la simbiosis de los nódulos radiculares. El gen NIN Like protein (NLP6) el cual pertenece a la familia NIN (NODULE INCEPTION). La familia (NIN) NODULE INCEPTION codifica factores de transcripción. Esta familia de proteínas se deriva del dominio RWP-RK y se clasifica en 2 grupos. Estas son 2 subfamilias, las cuales son: RKDS y NLPs (NIN-like proteins). Los genes de la familia de proteínas RWP-RK son factores de transcripción muy conservados sólo en plantas (Nishida *et al.*, 2018).

La familia de los RKDs se ha estudiado en especies como plantas vasculares, algas verdes y mohos del limo. En *Arabidopsis* se han reportado 15 miembros constitutivos de NLPs. Hasta la fecha, sólo se han reportado pocas funciones de la familia RKDs. Una de las más importantes corresponde a los genes responsables de la gametogénesis y la embriogénesis. Sin embargo la función de NLPs está directamente relacionada en la expresión específica de los genes implicados en la eficiencia del uso del nitrógeno (Sakuraba & Yanagisawa, 2022).

Los factores de transcripción de la familia *NLPs* son reguladores clave en los promotores que se unen a las regiones de elementos de acción *cis* del gen relacionado con la eficiencia del uso del nitrógeno. De esta manera, los genes *NLPs* están relacionados con el transporte de nitrógeno por las enzimas implicadas en la síntesis de amonio y las señales de nitrato (Forde, 2002). Los factores de transcripción *NLPs* de la familia NIN se conforman de un dominio conservado N-terminal responsable de la respuesta de nitrato, así como un dominio de unión al ADN RWP-RK y un dominio PB1 conservado involucrado en la interacción de proteínas (Yin *et al.*, 2020).

Estudios anteriores sobre el gen *NLP6* en otras especies, por ejemplo en *Arabidopsis*, una planta no leguminosa, muestran a las proteínas *NLPs* como principales reguladores de la respuesta a los nitratos (Scheible *et al.*, 1997; Bi *et al.*, 2007). Aún se tiene poca información sobre dicho proceso en leguminosas. Sin embargo se cree que debe existir algún nexo molecular entre la activación de genes inducibles por nitrato y las cascadas de señalización de Ca^+ (Nishida *et al.*, 2018).

Los *NLPs* están involucrados en la vía de señalización del nitrato a través de sus dominios RWP-RK. Estas vías de señalización son procesos de gran importancia para que ocurra la nodulación temprana. En este contexto, las interacciones proteicas de los *NLPs* influyen con otros componentes como las cascadas de señalización de Ca^{2+} que están directamente involucradas en la formación de nódulos en las plantas. Además, los *NLPs* desarrollan otros aspectos importantes en el crecimiento y desarrollo de las leguminosas. Se conoce que esta familia de proteínas NIN-like (*NLPs*) también están implicadas en la regulación de la homeostasis del nitrógeno (Mu & Luo, 2019). Por ello, la regulación de los genes *NLPs* es muy importante para que ocurra la infección por parte de la bacteria *Rhizobium*. Esta interrelación es necesaria para la formación de nódulos y por ende para la fijación de nitrógeno. Las proteínas *NLPs* interactúan mediante sus dominios por estrés del nitrógeno (Lin *et al.*, 2018).

1.6. Papel de *Agrobacterium rhizogenes* en la simbiosis

Phaseolus vulgaris es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial y comercial. Las plantas leguminosas participan en la agrupación simbiótica mutualista con las bacterias del tipo rizobios. Estas bacterias simbióticas obtienen carbono de las plantas y a cambio ayudan a la fijación del nitrógeno atmosférico para las plantas que actúan como huésped. Este proceso de asociación llamado simbiosis es un desarrollo complejo que implica distintas interacciones con otros genes a través de diferentes etapas (Ayra *et al.*, 2016).

Gracias al proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, las leguminosas como el frijol, llevan a cabo interacciones simbióticas planta-microorganismo. El uso de *A. rhizogenes* puede representar una alternativa para aumentar la eficiencia del nitrógeno del suelo y promover una mejor calidad en las leguminosas de interés económico. El proceso de transformación se inicia cuando *Agrobacterium spp.* percibe señales químicas de las células dañadas de la planta, las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia. (Blanco & Gómez, 2003).

El proceso de transformación se inicia cuando *Agrobacterium spp.* percibe señales químicas de células de la planta cuando estas presentan alguna herida o han sido dañadas, como por ejemplo a través de la electroporación o biobalística., las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia (Blanco & Gómez, 2003). Hay reportes que señalan que el uso de estas cepas mejora la fertilidad del suelo y producen una agricultura sustentable (Chaudhary *et al.*, 2008). Dicha interacción de las leguminosas con las bacterias del género *Rhizobium* que aprovechen el nitrógeno atmosférico es de vital interés para un mejor desarrollo y aprovechamiento de los cultivos (Ramírez & Vallejo, 2009).

Los microorganismos benéficos al utilizarse como inoculantes para beneficiar a las plantas, tienen un papel importante en la inducción del crecimiento y su protección. Las asociaciones de *R. tropici* en las leguminosas influyen sinérgicamente en los niveles de infección, nutrición mineral y crecimiento de las plantas (Spagnoletti, 2013). El uso de

simbiosis mediante *R. tropici* implica una mejor fijación y movilización de nutrientes (Ballesteros, 1991).

En la naturaleza, *A. rhizogenes* es responsable de crear en distintas plantas dicotiledóneas, una patología (hairy root disease) cuyo primordial síntoma es el desarrollo de diversas raíces pilosas “hairy roots”, las cuales son raíces delgadas y pequeñas (de allí su nombre) que emergen en la parte aérea de la planta desde el tallo. Dichas raíces muestran un punto de origen, especialmente en el lugar de infección como respuesta a la adhesión de la réplica de un fragmento de un plásmido de la bacteria invasora en la célula vegetal (Chilton *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1994; Chandra, 2012).

A este segmento se le nombra ADN de transferencia (T-DNA) y nace del plásmido de virulencia ‘Ri’. Este plásmido consta de varios genes que codifican proteínas que desempeñan funcionalidades como: conjugación, síntesis y catabolismo de opinas, así como de iniciación, transferencia y unión del T-DNA (Chandra, 2012). Además de inducir la generación de raíces, la unión del T-DNA induce la síntesis de las ya mencionadas opinas, las cuales son compuestos de carbón de bajo peso molecular y que sirven de alimento a la bacteria. Hay 4 tipos de plásmidos ‘Ri’ en *A. rhizogenes* y se ordenan dependiendo del tipo de opina que sintetizan y son agropina, mannopina, cucumopina y mikimopina (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006).

Una de las opciones más utilizadas para la generación de plantas compuestas, también denominadas como raíces transgénicas y parte aérea (silvestre) es por medio de la generación de hairy roots inducidas por la infección e incorporación de material genético de *A. rhizogenes* (Velázquez *et al.*, 2005). A diferencia de *A. tumefaciens*, que se encarga de generar tumores en las zonas donde se unen la raíz y el tallo. Se ha descrito en protocolos anteriores que muestra un porcentaje alto en la generación eficiente de raíces peludas. De esta manera el uso de *A. rhizogenes*. En la presente investigación, se garantiza un método eficaz para la generación de hairy roots en *P. vulgaris* por medio de la inyección con los genes *NLP4* y *NLP6* (Nanjareddy *et al.*, 2017).

1.7. Estudio de Promotores

El estudio de promotores es útil para conocer la localización de la expresión del gen de interés en tejidos vasculares y meristemáticos. La transcripción de un gen está a cargo de secuencias llamadas promotoras, las cuales poseen información de la temporalidad y especificidad de cada gen. El estudio de promotores requiere de un gen reportero para poder analizar su expresión en las plantas transgénicas. Uno de los genes reporteros más usados son la fluorescencia GFP, RFP Y el análisis histoquímico GUS. El análisis GUS (betaglucoronidasa) es uno de los más utilizados en cuanto a la caracterización funcional de genes y localización celular a través de la tinción de color azul o magenta en tejidos vasculares debido a la acción de la betaglucoronidasa y el sustrato x-gluc (Jefferson, 1987).

Además, estudios señalan en (Soyano *et al.*, 2013) y en (Yi Peng *et al.*, 2022) que el análisis del promotor de genes de la familia *NLPs* en otras especies como *Arabidopsis*, es útil para estudiar la inducción de la expresión génica por inducción de nitrato a través de los genes *NR1* y *NR2* en plantas transgénicas (Gan *et al.*, 2012). El uso de genes reporteros permite detectar la expresión de un gen de interés en un momento y sitio específico (Lin *et al.*, 2018).

El papel de *NLP6* se encuentra descrito en especies como *L. japonicus* y *M. truncatula* en el proceso de nodulación. Se sabe que los genes *NLPs* se expresan bajo ciertas condiciones y en diversas etapas a lo largo del desarrollo de las interacciones fisicoquímicas en las leguminosas. Como antecedentes, se sabe que existen poco más de 200 genes en la nodulación que interactúan directamente con la simbiosis en *P. vulgaris*. Sin embargo, aún es desconocido el rol que tienen los genes involucrados en dicha señalización (Chiu, 2020).

Con anterioridad se ha descrito que ambos promotores *NLP4* y *NLP6* tienen un papel importante durante las respuestas en pelos radicales, formación de hilos de infección y organogénesis de la nodulación. Hasta ahora, hay pocos reportes que muestren la interacción de los *NLPs* durante la simbiosis con *R. tropici* (Nishida *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se analizó la expresión espacio temporal de los promotores *NLP4* y *NLP6* como factores de transcripción que actúan río arriba de la ruta de señalización simbiótica. Ambos promotores contienen a GUS como gen reportero con el vector final de destino PBGWSF.0 de 12,478 pb (Nishida *et al.*, 2018).

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Analizar los perfiles de expresión espacio-temporal de los promotores *NLP4* y *NLP6* en *P. vulgaris* durante el proceso de nodulación bajo condiciones de asociación simbiótica con *Rhizobium tropici* silvestre. Con esto se pretende lograr la descripción y caracterización funcional de los genes *NLP4* y *NLP6*.

2.2. Objetivos específicos

1. Aislar y clonar los promotores *NLP4* y *NLP6* en fusión con GUS mediante el sistema Gateway para observar cuál es su papel en la nodulación de *P. vulgaris*.
2. Generar raíces pilosas (hairy roots) con cada uno de los genes *NLP4* y *NLP6* en *P. vulgaris* para observar de qué manera se expresan de su durante las diferentes fases de la nodulación.
3. Estudiar la expresión específica de cada uno de los promotores *NLP4* y *NLP6* de *P. vulgaris* bajo la vía simbiótica con *R. tropici* para inferir su función en la nodulación temprana.

3. Hipótesis

Estudios anteriores de análisis de transcriptoma con datos de RNA seq in silico, mostraron que de los siete miembros de la familia *NLPs* solo 2 genes: *NLP4* y *NLP6*, muestran una mayor expresión bajo condiciones de simbiosis de *P. vulgaris* y *R. tropici* (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019). Lo que abre la discusión sobre cómo se lleva a cabo la regulación de la nodulación bajo la actividad de *NLP4* y *NLP6*. En este contexto, la pregunta de investigación a responder es la siguiente: ¿Cuál es la expresión el gen *NLP4* y *NLP6* en la nodulación bajo condiciones de simbiosis en *P. vulgaris* con *R. tropici*?

En base a los antecedentes que se tienen sobre dichos promotores, se infiere que los perfiles de expresión espacio-temporal de *NLP4* y *NLP6*, mostraran una expresión diferente entre ellos en las distintas etapas de la nodulación de *P. vulgaris* y *R. tropici*. Una expresión de manera contraria induce que ambos genes tienen una funcionalidad específica y un papel de gran relevancia en la transducción de señales en el inicio de la nodulación.

4. Justificación

Los factores de transcripción *NLP4* y *NLP6* son parte de la subfamilia NIN (Nodule Inception factor) y representa un papel importante en la autorregulación de la nodulación. Estos dos genes median la señalización para la autorregulación de la nodulación. Por ello, juegan un papel determinante en el desarrollo de la nodulación de las leguminosas y a su vez un incremento en la mejora y calidad de la fijación del nitrógeno en general (Nishida *et al.*, 2018).

Bajo esta premisa, se sabe que las leguminosas establecen una simbiosis mutualista con la bacteria del género *Rhizobium* que otorga a la planta huésped la obtención de nutrientes necesarios y de gran importancia para un correcto crecimiento y rendimiento de la planta (Wang *et al.*, 2004).

Durante este proceso, el mecanismo para que ocurra la infección se da a lo largo de varias fases en las que participan cascadas de señalización que activan o inducen el proceso de nodulación. En este contexto, se plantea la relevancia del estudio de los promotores *NLP4* y *NLP6* como nuevos reguladores en la nodulación de *P. vulgaris* durante la vía simbiótica (Lin *et al.*, 2018).

Sin embargo, aún no está claro cómo dicho proceso interactúa en la vía simbiótica de la nodulación temprana. Si bien, algunos genes de la familia *NLPs* ha sido caracterizada con anterioridad en *Arabidopsis* y otras leguminosas como *L. japonicus*, aún es en gran parte desconocido su papel durante la organogénesis del nódulo así como su función en la nodulación (Wang *et al.*, 2003).

La vía simbiótica promueve el equilibrio entre la ganancia y pérdida de nitrógeno cuando las condiciones de nitrógeno son limitantes. La inducción de la nodulación está regulada por varios genes fundamentales de *P. vulgaris* que inducen el establecimiento de la simbiosis. Entre ellos se encuentran los factores de transcripción *NLP4* y *NLP6*, los cuales se activan específicamente durante la asociación simbiótica. Hasta ahora, es poca la información con la que se cuenta sobre el papel de estos genes específicos (Nishida *et al.*, 2018).

Se sabe en la literatura que algunos genes de la familia *NLPs* han sido estudiados en otras especies modelo como *Arabidopsis*, *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*. Sin embargo, en *P. vulgaris* no han sido estudiados. Sobre la base de los argumentos anteriores, planteamos la conjetura de que los promotores *NLP4* y *NLP6* podrían estar relacionados en la regulación de la nodulación en la simbiosis (Scheible, 2004).

Por ello, la importancia de este trabajo radica en analizar los patrones de expresión espacio temporal de ambos promotores para entender cómo y cuándo se expresan dichos factores de transcripción. Dilucidar dichos mecanismos de acción sobre los cuales se induce el proceso de la nodulación, permiten entender mejor bajo qué condiciones se inducen las interacciones simbióticas (Yanagisawa, 2014).

Principalmente comprender cómo funcionan los factores de transcripción durante el progreso de la simbiosis permite obtener avances más específicos sobre cómo se regula dicha interacción y qué vías están involucradas en la respuestas a la deficiencia de nitrógeno. Por tales razones, la presente investigación pretende obtener mayor información acerca del grado de actividad y expresión de los promotores *NLP4* y *NLP6* sobre la nodulación en la vía simbiótica de *P. vulgaris* (Vuong, 2013).

Asimilar tales interacciones favorece a un mejor manejo del uso del nitrógeno y de las leguminosas de forma general. Ya que, al entender los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la transducción de señales en el proceso de nodulación, se contribuye al conocimiento sobre las estrategias de la simbiosis (Young *et al.*, 2001).

El presente trabajo pretende ofrecer un análisis molecular que implique estudios sobre dichos promotores, su expresión y clonación. De esta forma se promueve una mejor producción, así como el rendimiento de uno de los cultivos más importantes en México y a nivel mundial. Asimismo, el avance en esta área ofrece un mayor análisis que complementa la poca información sobre dicho gen en futuras investigaciones (Yin *et al.*, 2020).

5. Antecedentes

5.1. Raíces pilosas (hairy roots) en *P. vulgaris*

Existen diversos métodos para la inducción de plantas compuestas en *P. vulgaris* y otras especies a través de la transformación genética. Una de las formas más usadas para inducir a las plantas la formación de raíces transgénicas es mediante la transformación de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* a través de métodos como biobalística, electroporación y microinyección (Potrykus *et al.*, 1998).

Se ha documentado que las raíces compuestas permiten el mejoramiento de especies e incrementan su costo, primordialmente por la producción de plantas resistentes a plagas

y patologías, tolerantes a herbicidas, con productos alimenticios de mejor calidad y más grande nutrición. La inducción de las “hairy roots” en *P. vulgaris* es posible, debido a la inserción del ADN deseado (que codifica la proteína de interés) en el ADN de transferencia dentro del plásmido Ri (root inducing) otorgado por *A. rhizogenes* (Veena & Taylor, 2007).

Se ha encontrado que las cepas de *A. rhizogenes* que tienen la capacidad de inducir raíces peludas y tienen un índice más alto de inducir la nodulación en las leguminosas. Esto debido a que dichas cepas, portan plásmidos (pSym) que contienen los genes nod y nif, responsables para que ocurra el proceso de inicio de la nodulación (Folch Mallol, 1994).

La familia de las leguminosas establece interacciones simbióticas con las bacterias del suelo rizobios, para formar nuevos órganos productos de esta interacción. Dichos productos son los llamados nódulos, en los que los bacteroides derivan de las células infectadas a través de la raíz *Rhizobium*. Estos nódulos reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3) como fuente de nitrógeno (N) para el crecimiento del huésped. Por tanto la formación de interacciones simbióticas implica un proceso de señalización entre *P. vulgaris* y *R. tropici* (Oldroyd, 2008).

En el caso de la interacción de *NLPs*, se sabe que la expresión génica de los *NLPs* en la simbiosis es regulada a diversos niveles, que implican eventos nucleares y citoplasmáticos. En este transcurso, la formación de nuevos orgánulos llamados “nódulos” es necesaria para un mejor desarrollo de la nutrición de la planta. Entre las etapas del desarrollo de la simbiosis se encuentra la previa interacción fisicoquímica para el comienzo de la infección, además de la invasión, colonización y diferenciación celular que formará a los nódulos (Traubenik, 2020).

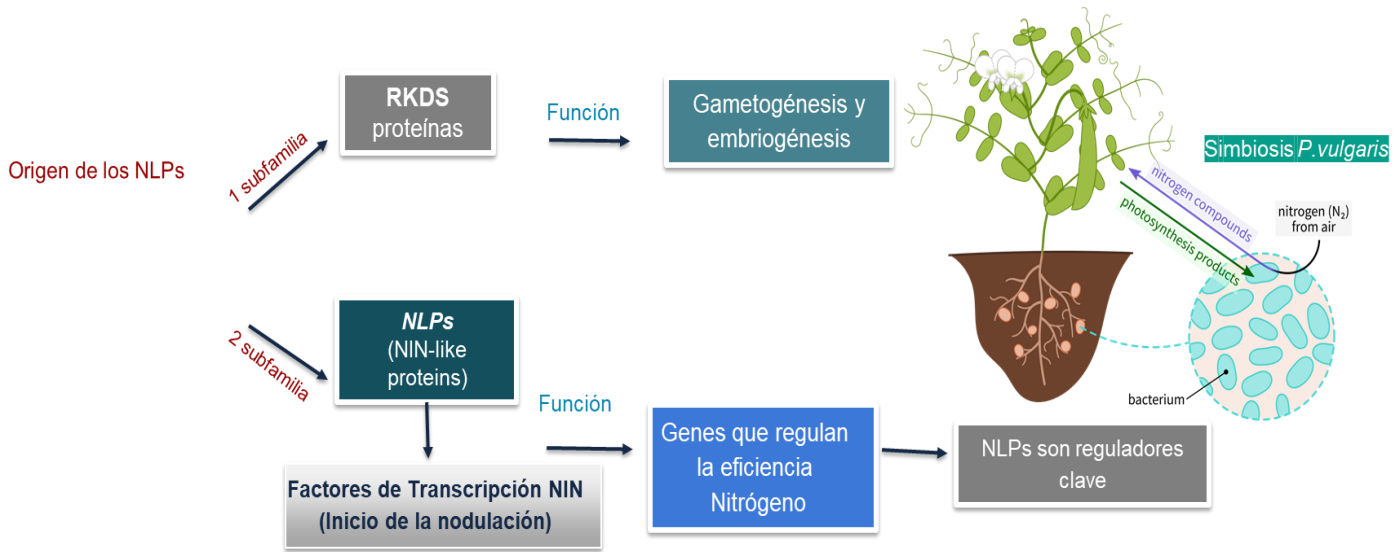


Figura 1. Regulación de la fijación simbiótica de nitrógeno en los nódulos de las raíces de las leguminosas. La familia (NIN)NODULE INCEPTION codifica factores de transcripción llamados *NLPs*, los cuales son reguladores clave en la eficiencia del uso del nitrógeno de las leguminosas. Esta familia se deriva del dominio RWP-RK y se clasifica en 2 subfamilias: *RKDs* y *NLPs*. Una función es que son genes responsables de la gametogénesis y la embriogénesis. La segunda función: *NLPs* codifica promotores que son clave en la regulación codifica reguladores clave para la inducir la nodulación (Wu *et al.*, 2020). Imagen modificada de (Schwember & Cabeza, 2019).

5.2. Análisis GUS

El análisis histoquímico de GUS es una de las formas más prácticas y utilizadas como gen reportero en el estudio de la expresión de genes. El ensayo GUS, proviene del gen denominado “*uidA*” que es el gen de dónde se obtiene la beta glucuronidasa de la bacteria *E. coli*. Dicho análisis produce una reacción que permite identificar en donde y como se está expresando un gen en los tejidos vasculares en el material vegetal. La reacción GUS funciona a través de una enzima y un sustrato. Esta reacción consiste de un buffer que contiene un sustrato llamado x-gluc (Hull & Devic, 1995).

Para ello la enzima beta-glucuronidasa. al tener contacto con el sustrato x-gluc, que es un glucurónido, rompe estas moléculas y se hidroliza generando dos residuos. Uno de ellos es el ácido glucurónico y el otro es un precipitado de color. Actualmente hay

diferentes sustratos que pueden mostrar diferentes colores de reacción. Los más comúnmente utilizados son el magenta. El color de la tinción que se produce dependerá del tipo de sustrato utilizado en la reacción. Generalmente varía el sustrato indol, es el más utilizado para las precipitación de color magenta (Jefferson, 1987).

5.3. Análisis GUS de *pNLP4* y *pNLP6*

La manera en la funciona el análisis GUS al identificar la expresión espacial y temporal de los promotores *NLP4* y *NLP6* es la siguiente: El vector final usado para ambos promotores es el PBGWSF7.0, el cual tiene un gen reportero que al momento de que se expresa en los tejidos de la raíz transgénica con el promotor *NLP4* o *NLP6*, produce la proteína beta glucuronidasa necesaria para que ocurra la reacción GUS. Por tanto, al momento de que se le agrega el sustrato GUS al tejido vascular; la expresión de los genes por los promotores *NLP4* o *NLP6*, reaccionará químicamente con la enzima que se unirá al sustrato y generará la reacción colorida. Por ello, el producto de la reacción es un indicador que muestra en dónde se estén expresando lo genes bajo el control de los promotores *NLP4* y *NLP6* (Cervera, 2005).

Es importante aclarar que como tal, no es que los genes *NLP4* y *NLP6* produzcan tinción por sí mismos, sino que el buffer GUS, que contiene el sustrato hace que el producto del gen reaccione con el sustrato (x-gluc), debido a que contiene la enzima codificada por el gen reportero. De esta manera, se visualiza en qué zona de la raíz, nódulo o tejido se están expresan los genes *NLP4* y *NLP6*. A través de la tinción en color magenta se analizan los patrones de expresión espacio-temporal en los tejidos analizados (Hull & Devic, 1995).

Por tanto, mientras haya una mayor expresión del gen de interés, habrá mayor intensidad de color. A mayor cantidad de concentración, habrá más enzima y por tanto mayor cantidad de sustrato reaccionó. La intensidad y cantidad del color indicará una mayor actividad del gen que se quiere analizar. En la presente investigación todos los análisis de la expresión espacial y temporal del promotor *NLP4* y *NLP6* fueron a través del color magenta. Cuando el sustrato reacciona con la enzima, se obtiene la tinción de color, lo

que indica la expresión de *NLP4* y *NLP6*. El tiempo de reacción depende del nivel de expresión que se busque observar. Para análisis de promotor el tiempo máximo es aproximadamente de 16 horas. Para la observación de eventos de silenciamiento por ejemplo, el tiempo de la reacción puede variar dependiendo del tejido en cuestión, por lo que puede ser en menor cantidad de horas (Jefferson, 1987).

5.4. Papel de *pNLP4* y *pNLP6* en el proceso de nodulación

Los *NLPs* son una familia de factores de transcripción responsables de la expresión génica inducida por el nitrato. Los *NLPs* inducen la activación de los genes relacionados con la disponibilidad del nitrógeno. El nitrato es una señal importante para la expresión de los genes de la nitrato reductasa. La nitrato reductasa es una enzima clave en la disponibilidad del nitrógeno que cataliza el proceso de reducción de nitrato a nitrito para que pueda ser absorbido por las plantas (Yanagisawa, 2014).

La expresión de los genes de la enzima nitrato reductasa, se pueden ver afectados por muchos factores como la disponibilidad de agua, presencia de metabolitos secundarios, y las fitohormonas pueden influir en la regulación de la actividad del nitrato reductasa. La regulación de los *NLPs* juega un papel importante en el control de los genes que codifican el transporte de nitrato y la nitrito reductasa a través de la regulación de los niveles de expresión de los genes asociados a la actividad presente en los cambios químicos del inicio de la nodulación (Wu *et al.*, 2020).

En la familia de los *NLPs*, los genes están cercanamente involucrados en las propiedades y las relaciones evolutivas. Por lo que se piensa que tienen una estrecha relación en la asociación de la autorregulación de la nodulación. La familia de los *NLPs* ha sido estudiada en otras especies de otros organismos modelo como *Arabidopsis*, *L. japonicus*, *M. truncatula* y *G. max*. En dichas especies pertenecientes a la familia de las leguminosas se ha encontrado una estrecha relación de la función de *NLPs* con la regulación. Al mismo tiempo, se han dilucidado varias propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las proteínas similares a NIN. En reportes anteriores se ha asociado la actividad de los genes *NLPs* para activar la nitrasa bacteriana (Szczyglowski *et al.*, 1998).

La inducción de genes de nitrasa en la rizobiasis está controlada por oxígeno. La concentración de oxígeno libre en la célula del nódulo es solo de 10^{-8} μM en la región de unión, lo que permite que funcione la nitrasa (Tjepkema & Yocum, 1974). Sin embargo, las mitocondrias de las plantas y las bacterias requieren una alta corriente de oxígeno para mantener la respiración y proporcionar nitrasa a partir de ATP. Las leghemoglobinas son importantes para equilibrar el oxígeno en aquellos nódulos a niveles bajos. Esta función es para llevar a cabo el transporte a los rizobios de manera rápida (Hernández-Reyes *et al.*, 2022).

Al investigar las relaciones evolutivas de los genes *NIN* se han tenido en cuenta las comparaciones entre especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como las especies que se unen a los nódulos y las que no lo hacen. Se ha demostrado que 16 eventos de duplicación (14 segmentarios y 2 en tándem) desempeñan un papel en la expansión de la familia de genes *NIN* en *P. vulgaris*. En estudios anteriores, se ha encontrado que los niveles de expresión de los genes *NIN* en diferentes tejidos de la planta inducen durante las condiciones de simbiosis una mejor resistencia a condiciones de estrés. A su vez, dicho evento promueve la señalización para la autorregulación de la formación de nódulos primordiales posteriores a la inoculación (BÜYÜK & Summer, 2021).

En literatura se ha descrito que los factores de transcripción *NLP4* y *NLP6*, actúan como activadores de los genes asimiladores de nitrato, al unirse a sitios adyacentes en la región promotora río arriba del gen de la nitrato reductasa (*NIA1*). Se ha encontrado que dichos genes interactúan físicamente en condiciones de nitrato continuo y señalización de nutrientes a través del dominio rico en histidina y glutamina, presente en muchas especies de plantas (Ripoll *et al.*, 2017).

Los heterodímeros de estos genes se acumulan en el núcleo, lo que coincide con la regulación al alza de los genes de asimilación y señalización de nitrato. Estos hallazgos proporcionan información sobre cómo las plantas coordinan sus respuestas a la disponibilidad de nitrato, así como la señalización del nitrato.

Se sabe que la familia de los factores de transcripción *NLPs* juega un papel importante en la señalización y el transporte de nitrógeno y Fósforo (P) durante la simbiosis de leguminosas con rizobios (Figura 2). Las leguminosas equilibran la producción de nitrógeno a partir de nitrato en el suelo con la fijación simbiótica de nitrógeno (Sakakibara *et al.*, 2006).

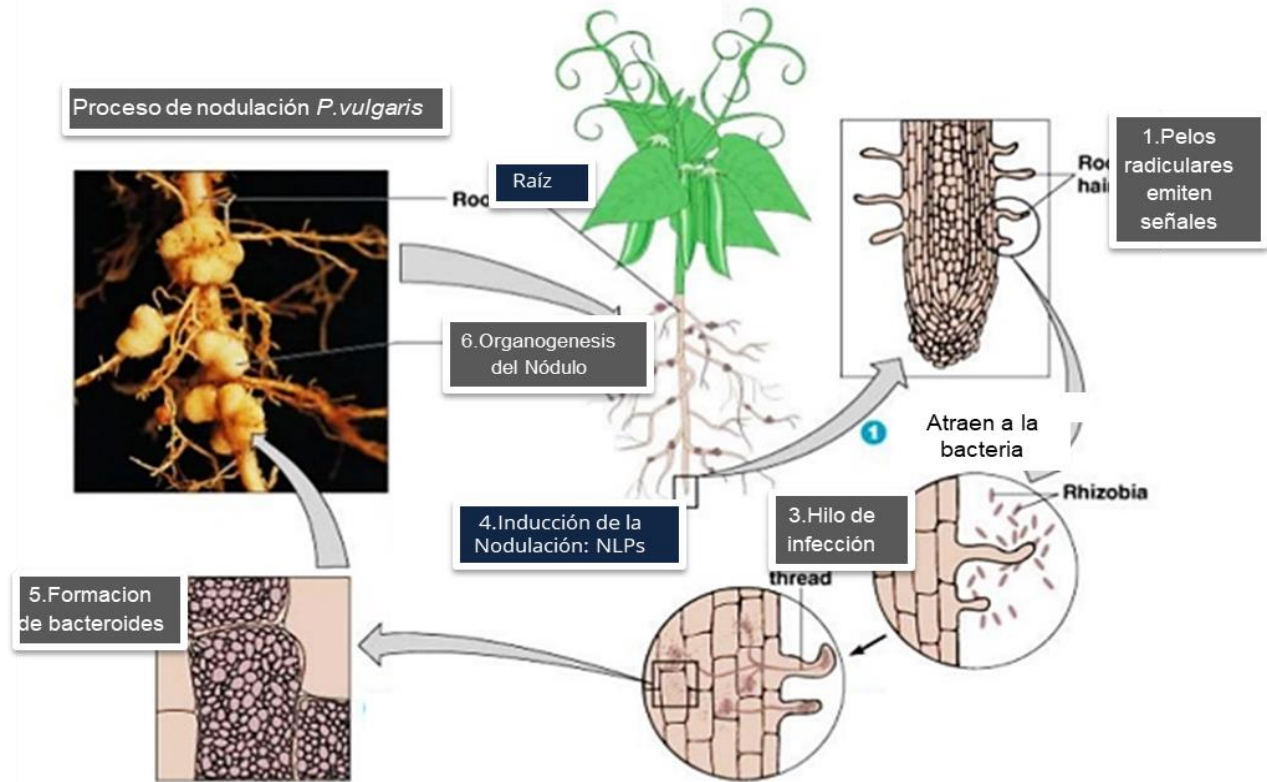


Figura 2. Proceso de formación de nodulación en *P. vulgaris*. Durante este proceso de infección la bacteria *R. tropici* entra a través de los pelos radiculares. Se adentra hasta llegar a las células corticales, posteriormente a esta etapa las bacterias se ramifican, así se liberan mediante células infectadas formando un solo simbiote. “Dentro de este nuevo "organelo", las bacterias crecerán y se dividirán junto con la membrana simbiote producida por la planta” (Roth & Stacey, 1989). La organogénesis de los nódulos está impulsada por tres procesos característicos que ocurren simultáneamente: colonización bacteriana, iniciación de nódulos y autorregulación del número de nódulos. Imagen modificada de (Schwember *et al.*, 2019).

La fijación de nitrógeno requiere la generación de un nuevo orgánulo, que es un desarrollo dependiente de citoquinina en las raíces. Descubrimos que la biosíntesis de citoquininas es un integrador central que equilibra las señales de nitrato a nitrógeno adquiridas por los simbioses. Una de las principales interacciones es el efecto inhibitorio sobre las altas concentraciones de NO_3^- en la simbiosis de las leguminosas. Dicha interacción es importante, debido a que los altos niveles de NO_3^- provocan un retraso en el crecimiento y maduración de los nódulos, debido a que se inhibe la actividad transcripcional de NIN al activar la expresión de genes inducibles por el factor Nod como *CRE1* y *NF-YA*, lo que provoca una menor acumulación de proteínas *NLPs* en el núcleo, y por tanto una menor actividad (Reynoso, 2013).

Dicha interacción es importante, debido a que los altos niveles de NO_3^- provocan un retraso en el crecimiento y maduración de los nódulos, debido a que se inhibe la actividad transcripcional de NIN al activar la expresión de genes inducibles por el factor Nod como *CRE1* y *NF-YA*, lo que provoca una menor acumulación de proteínas *NLPs* en el núcleo, y por tanto una menor actividad. Ello trae como consecuencia una menor expresión de los *NLPs* y por tanto repercusiones importantes sobre el desarrollo nodular (Lin *et al.*, 2018).

5.5. Interacción de los *NLPs* con otros genes de la ruta simbiótica

Las condiciones bajas de nitrato confieren un estado favorable para la inducción de citoquininas a través de la señalización simbiótica y, por lo tanto, el desarrollo de nódulos. Por el contrario, un alto contenido de nitrato inhibe la acumulación de citoquininas y ésta disminución en la acumulación de citoquininas simbióticas se ve exacerbada por mutantes biosintéticos de citoquininas, que son hipersensibles a la inhibición del crecimiento, la maduración y la fijación de nitrógeno de los nódulos (Stitt *et al.*, 1999). Por tanto, la administración de citoquininas restaura los nódulos y la fijación de nitrógeno en mutantes biosintéticos de forma dependiente de la concentración (Sakakibara *et al.*, 1996).

Se ha observado en otros estudios, que el efecto inhibitorio de los nitratos sobre la simbiosis se manifiesta de manera dependiente en algunos miembros de la familia *NLPs* como *NLP1* y *NLP4*, lo que contrasta con el efecto positivo de los nitratos sobre la biosíntesis de citoquininas observado en especies que no forman nódulos radiculares. En conjunto, esto sugiere que las leguminosas han desarrollado una respuesta de citoquinina diferente a los nitratos en comparación con las plantas no leguminosas (Lin *et al.*, 2018).

Las plantas han desarrollado estrategias de adaptación frente a la falta de nitrógeno. Dicha regulación está mediada por factores de transcripción que hacen frente a los cambios y al estrés en diferentes ambientes. Se piensa que uno de estos reguladores son los factores de transcripción *NIN* que a su vez se derivan en *NLPs*. Se ha encontrado que *NLP6* y *NLP7* actúan como activadores de asimilación de nitrato ya que se encargan de contactar sitios cercanos del promotor de genes de la desnitrificación, unidos físicamente bajo condiciones continuas de nitrato y privación de nitrato. Las regiones de estas proteínas son necesarias para estas interacciones (Ripoll *et al.*, 2017).

Además de las respuestas locales a los nitratos, las plantas tienen circuitos reguladores sistémicos que permiten la coordinación de las respuestas a los nitratos entre raíces y brotes (Zhang & Forde, 2000). La señalización de citoquininas es una de las vías subyacentes a esta señalización sistémica de disponibilidad de nitrato. Además de las leguminosas, la inducción de la biosíntesis de citoquininas por nitratos ha sido reportada en varias especies como maíz, arroz y *Arabidopsis* (Crawford, 2002).

Posteriormente se demostró que ciertos componentes de la biosíntesis de citoquininas y del transportadores regulan la respuesta de la planta al nitrógeno. Se sabe que la señalización de nitrato depende en gran medida de los *NLPs*. Por ejemplo, la actividad de los transportadores del tipo *AtIPT3* y *AtABCG* y el gen *NRSYM1* en la vasculatura de la raíz puede aumentar la exportación de citoquininas en respuesta a las corrientes de nitrato (Lin *et al.*, 2021).

Se ha identificado que el nitrato inhibe la biosíntesis de citoquininas y la señalización requiere de *NLP1* y *NLP4*. Por tanto, se sugiere que el promotor *NLP4* desempeña funciones importantes en la señalización del nitrato al inicio de la infección en los pelos radiculares. A continuación se muestra un esquema que describe el proceso de entrada de la bacteria *R.tropicici* y el proceso de colonización del hilo de infección. (Figura 1)(Roy *et al.*, 2020).

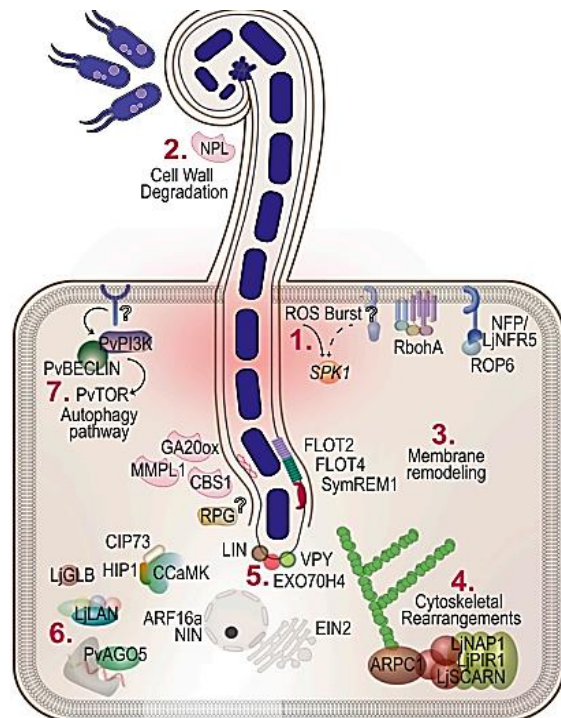


Figura 3. Inicio de la Infección de *Rhizobium* en *P.vulgaris*. Interacción química de la entrada de los rizobios en la célula vegetal. **1.** La entrada de la bacteria rizobial desencadena respuestas ROS. **2.** Se produce la degradación de la pared celular para permitir la entrada de la bacteria a través del pelo radicular. **3.** Remodelación de la membrana. Esto ocurre, debido a que la formación y expansión del hilo de infección requiere la ruptura de la pared celular de la planta **4.** Reordenamiento del citoesqueleto. Se requieren muchos componentes del citoesqueleto para redirigir el crecimiento de la punta del cabello y el desarrollo del hilo de infección. **5.** La bacteria avanza a través del hilo de infección, hasta llegar a las células corticales donde comenzara la colonización y la diferenciación celular. **6.** Ocurren diferentes cambios transcripcionales y post traduccionales para asegurar la respuesta de otros complejos como leghemoglobinas y NIN. **7.** Intervención de señalización química en la cual se involucran genes TOR y el proceso de autofagia. Las citoquininas y las auxinas regulan la iniciación y el desarrollo de nódulos (Imagen tomada de Roy *et al.*, 2020).

Los factores de transcripción *NLP6* y *NLP7* podrían actuar como activadores de los genes de asimilación de nitrato. Estos genes, se unen a sitios vecinos en la región promotora corriente arriba del gen de la nitrato reductasa *NIA1* e interactúan físicamente en condiciones de nitrato y de estrés constante. Se encontró que estas interacciones incluyen los dominios Phox y Bem1p (PB1) de *NLP6* ricos en histidina y glutamina que se conservan en otras especies de leguminosas. Dicha interacción de proteínas conservada promueve la señalización de nutrientes cuando hay una deficiencia de nitrógeno (Vuong, 2013).

Por ello, cuando la planta necesita nitrógeno, las hetero uniones TCP20 de *NLP6* se acumulan en el núcleo, coincidiendo con la activación de los genes anabólicos y dependientes de nitrato. Por lo que la expresión de la actividad de *NLP6* se expresa más fuerte en la zona del núcleo de los nódulos. Así mismo también se reporta que *NLP6* promueve el crecimiento del meristema de la raíz en caso de deficiencia de nitrógeno. Estos resultados brindan información sobre cómo las plantas coordinan las respuestas a la disponibilidad de nitrato, vinculando su absorción y señalización con la progresión del ciclo celular (Ripoll *et al.*, 2017).

5.6. Nivel de expresión de la familia *NLPs*

En estudios realizados anteriormente se realizó un análisis de transcriptoma de los promotores con datos de RNA seq de los miembros de la familia *NLPs* (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019). La familia NIN (Nodule Inception Factor) contiene una subfamilia *NLPs* la cual se conforma por 7 genes. De los cuales solo dos genes (*NLP4* y *NLP6*) muestran el mayor nivel de expresión en el proceso de nodulación bajo condiciones de simbiosis de *P. vulgaris* y *R. tropici* (Figura 3).

Se sabe que la región promotora del gen *NLP4* y *NLP6* en *P. vulgaris* tiene el mayor nivel en la transducción de señales para la nodulación temprana. Estos datos fueron tomados 5 días después de la inoculación (dpi) con *R. tropici* durante el proceso de nodulación, desde la formación de nódulos hasta la senescencia.

Por ello, en esta investigación se evalúa la expresión del promotor *NLP6* en diferentes etapas de la nodulación durante la simbiosis con *R. tropici*. Así como la relación de *NLP4* y *NLP6* en la inducción de la señalización temprana y su respuesta en la regulación nodular (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019).

Nivel de expresión de los genes *NLPs* en condiciones de simbiosis de *P. vulgaris* con *R. tropici*

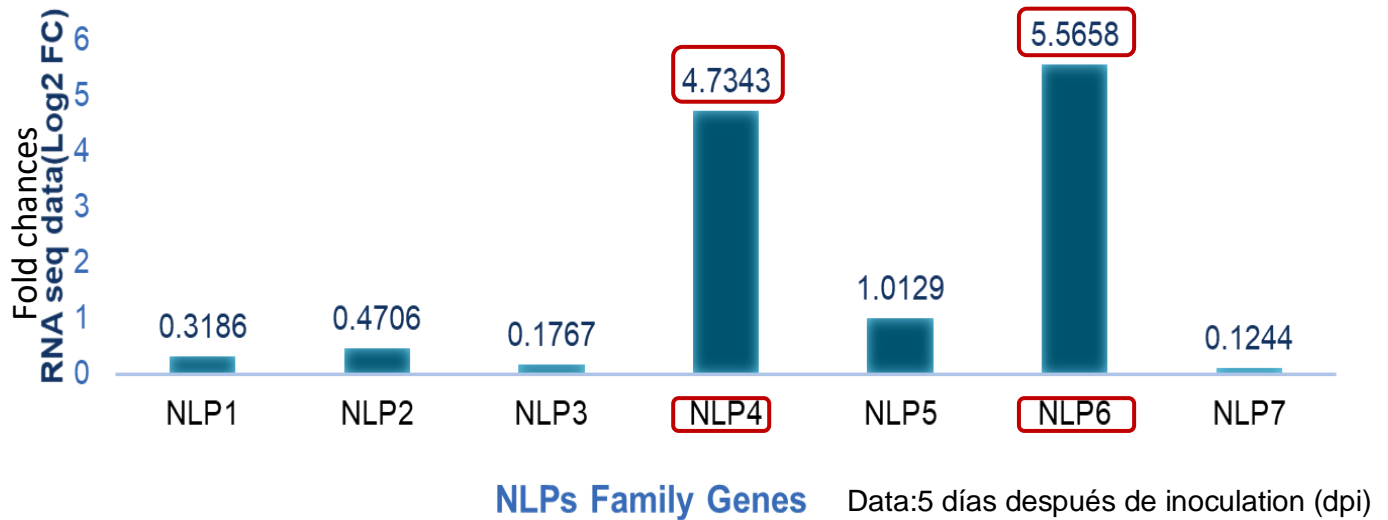


Figura 4. Análisis de datos de RNA seq de la proteína de la familia *NLPs* en *P. vulgaris*. Estudios previos de laboratorio realizaron un análisis de transcriptoma de promotor con datos de *RNA seq* in silico. Dichos datos muestran la expresión de los genes de la familia *NLPs* bajo condiciones de simbiosis con *R. tropici* silvestre a los 5 días post inoculación (dpi) Se encontró que de los 7 miembros de los genes *NLPs*. Solo 2 genes: *NLP4* y *NLP6* son los muestran una mayor expresión bajo condiciones de simbiosis de *P. vulgaris* y *R. tropici*. Datos tomados de (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019).

5.7. Ruta simbiótica

Las bacterias del género *Rhizobium* establecen genes específicos implicados en las interacciones eficientes de simbiosis en rutas de biosíntesis de aminoácidos (Pinilla, 2001). Dentro de la ruta simbiótica, la fijación activa del nitrógeno es una serie compleja de interacciones químicas y físicas entre las leguminosas. Los procesos de señalización desencadenan cambios en la expresión génica de ambas partes involucradas.

Esto se realiza a través de la señalización activada por los factores NIN facilitan el acceso bacteriano a las células epidérmicas y corticales (Lin *et al.*, 2021). Dicho evento abre la percepción de los factores Nod por parte de los receptores de la planta para reconocer al simbiote y que la bacteria entre en los pelos radiculares de la leguminosa. La entrada de la bacteria provoca la adhesión de los rizobios a las células ciliadas y por ello, se produce que los pelos radiculares se “enrosquen”. Dicha acción promueve que la bacteria viaje por el hilo de infección hasta adentrarse en las células corticales. Esta es la vía más común del ingreso de la bacteria a las plantas leguminosas, sin embargo, los rizobios también pueden penetrar en las raíces de las leguminosas para entrar. Para ambos métodos de entrada, el dependiente es el factor Nod (Sprent y James, 2007).

El factor NIN desencadena la iniciación del hilo de infección (IT) mediante la inducción del *NLPs* y el factor de transcripción nuclear. La especificidad del huésped está determinada por al menos dos pasos en el intercambio de señales mutuas entre las plantas y los micro simbioses. *NLPs*, codifica un TF que contiene RWP-RK, el cual es un regulador clave de múltiples genes/procesos que tienen efectos positivos o negativos en la organogénesis de los nódulos, dependiendo del momento del desarrollo de desarrollo, incluyendo la iniciación del TI, la organogénesis de los nódulos y el control del número de nódulos. Para comprender mejor este proceso, se muestran las etapas del desarrollo nodular inducido por *R. tropici*. (Figura 5) (Liu, 2020).

Posteriormente a la entrada del hilo de infección, múltiples hormonas controlan las divisiones celulares que conducen a la formación del nódulo. Entre ellas, el etileno, el cual reprime el pico de calcio inducido por el reconocimiento de un factor Nod. Posteriormente las citoquininas y la señalización de auxinas regulan positivamente el desarrollo del hilo de infección (Wang *et al.*, 2004). Por ello, cuando el hilo de infección llega hasta las células corticales, se produce una diferenciación y multiplicación de células que formarán el primordio nodular. El cual se convierte en un nódulo maduro, tal como se describe en el diagrama de la (Figura 5) (Soyano *et al.*, 2013).

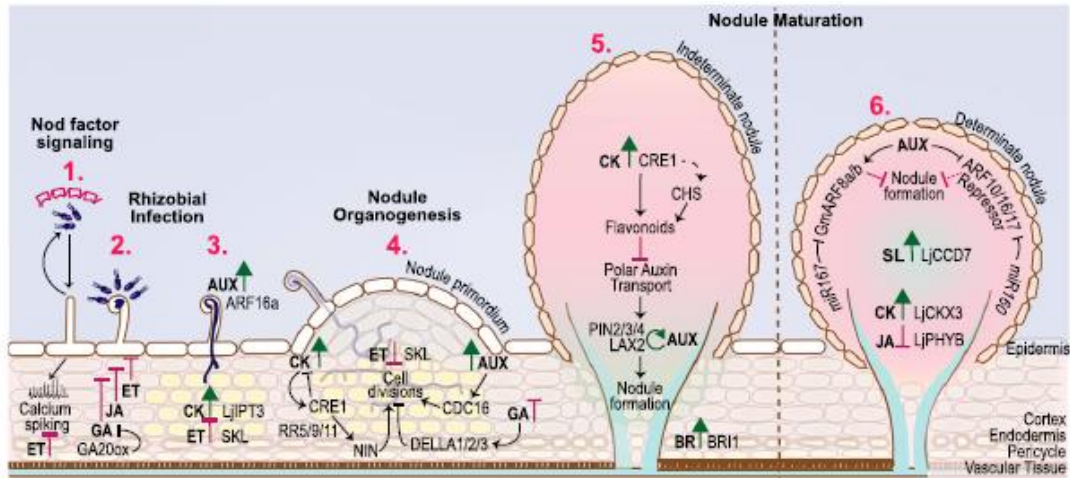


Figura 5. Desarrollo de la formación del nódulo en diferentes etapas. 1. Los factores de nodulación (Nod) se activan en respuesta a moléculas de transducción de señales secretadas por los flavonoides. 2. Esto conduce a la biosíntesis y secreción del factor Nod por parte de los rizobios que desencadenan el proceso de infección de *Rhizobium*. 3. El factor Nod desencadena el proceso infeccioso en las plantas huésped. Los genes de nodulación bacteriana se activan en respuesta a las moléculas de señalización secretadas por las plantas, como los flavonoides, lo cual da sitio a la biosíntesis y secreción de componentes Nod de parte de las bacterias *Rhizobium*. 4. Comienza la formación de nódulos primordiales, debido a la secreción de auxinas y citoquininas. Así mismo, comienza la diferenciación de las células corticales. 5. El transporte polar de auxinas, flavonoides y otros genes involucrados como CRE1 y el complejo LAX2 desencadenan la formación de nódulos indeterminados o determinados. 6. A los 21 dpi se observa la maduración completa de determinados. Imagen tomada de (Roy et al., 2020).

De esta manera se piensa que los factores de transcripción *NLPs* derivados de la familia de genes *NIN* inducen la división de las células de la raíz y la formación de meristemos nodulares para la generación de orgánulos celulares llamados "simbiontes" (Figura 6) (Fernández-Luqueño & Espinosa-Victoria, 2008). Estos son orgánulos especializados los cuales contienen una o más bacterias encargadas de fijar el nitrógeno. Durante el desarrollo de la nodulación, la diferenciación de los tejidos vegetales como los nódulos proporciona un entorno rico en nutrientes para las bacterias, con bajos niveles de oxígeno libre adecuados para la desnitrificación por la enzima nitrogenasa de oxígeno, inestable, pero suficiente para realizar el proceso (Roy et al., 2020).

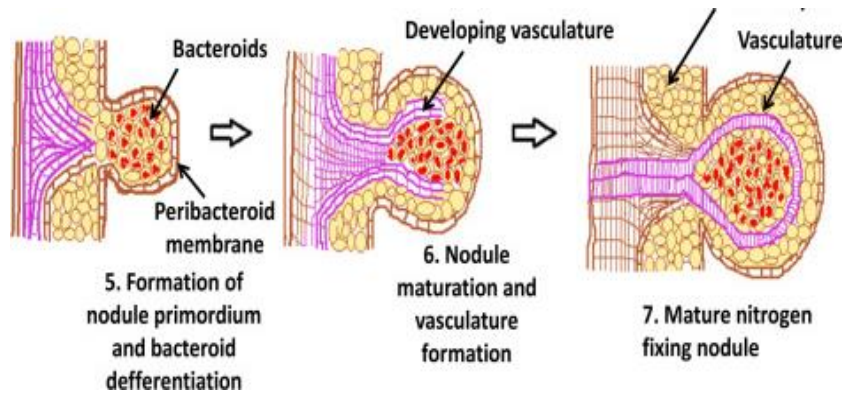


Figura 6. Desarrollo de la vasculatura nodular. Figura ilustrativa del proceso de desarrollo y maduración del nódulo dentro de la asociación por vía simbiótica. 1. Proceso de formación del nódulo primordial y diferenciación de las células corticales. El bacteroide está contenido por una membrana. 2. Desarrollo de la vasculatura. En esta etapa se forma la vasculatura del nódulo. 3. Etapa de maduración del nódulo. Desarrollo de la vasculatura amplia y fijación del nitrógeno. Imagen tomada de (Singh *et al.*, 2021).

Las interacciones entre leguminosas y rizobios suelen comenzar en suelos con limitaciones de nitrógeno cuando las leguminosas segregan una clase de metabolitos llamados flavonoides (Redmond *et al.*, 1986). Los flavonoides en las raíces de las leguminosas actúan como señales para los rizobios en condiciones de bajo nivel de nitrógeno e inducen genes que interactúan con la proteína NOD. De esta manera se induce la expresión de genes de nodulación "comunes" a través de los factores de transcripción (TF) mediante señales químicas de oligosacáridos con una estructura central conservada (Peters *et al.*, 1990). Dichas señales químicas liberan factores de nodulación a través de los genes/proteínas de *NOD* de los rizobios. Los rizobios reconocen estas señales e informan a la planta de un simbiote potencialmente beneficioso por lo cual se desactivan las defensas de entrada en las leguminosas y se permite la entrada de la bacteria beneficiosa *R. tropici* para que ocurra el siguiente paso que es la colonización (Long, 1996).

6. Metodología

El proceso para llevar a cabo esta investigación se dividió en 3 partes. La primera parte constituye la clonación y el aislamiento de ambos promotores utilizando los vectores pENTR/D-TOPO usado para la clonación y transformación de *pNLP4* y *pNLP6*. La segunda parte, consistió en realizar la construcción de cada promotor en el vector de destino pBGWSF7.0 que tiene como el gen reportero GUS. Posteriormente, realizar la transformación en *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 e inyectar plantas con cada promotor para generar hairy roots. Finalmente inoculada con *Rhizobium tropici* silvestre para inducir la nodulación en las raíces y estudiar la expresión espacio-temporal mediante análisis GUS. El proceso a detalle se explica a continuación:

6.1. Identificación del nivel de expresión de *pNLP6* y *pNLP4* en *P. vulgaris*

Previamente se realizó un estudio transcriptómico de raíces de *P. vulgaris* de la variedad Negro Jamapa en simbiosis con *R. tropici* cepa CIAT 899 a los 5 días después de la inoculación (dpi) del cual, se identificaron 7 genes de la familia *NLPs* en donde los denominados como *NLP6* y *NLP4* presentaron el mayor nivel de expresión durante la nodulación en la vía simbiótica con *R. tropici* (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019).

6.2. Secuencia del promotor *pNLP4* y *pNLP6*

Se identificó la secuencia del gen *PvNLP6* y *PvNLP4* los cuales codifican para factores de transcripción basado en los estudios de análisis transcriptoma de RNA seq (Munguía-Ortiz *et al.*, 2019) a través de un análisis en la herramienta en línea Phytozome v12.1 (<http://www.phytozome.net>). Ambas secuencias fueron utilizadas para el diseño de oligos con un tamaño de fragmento esperado para *PvNLP6* de 1026 pb y 1036 pb para *PvNLP4*, para entonces realizar su amplificación y evaluación de los patrones de expresión de ambos promotores comenzando con el diseño de oligos.

6.3. Diseño de oligos para *pNLP4* y *pNLP6*

Para poder realizar la caracterización y evaluación de la expresión espacio-temporal de los genes *NLP4* y *NLP6* durante la infección con se realizó un análisis de promotor. Para esto se seleccionó una regiones de *pNLP4* (1036 pb) y *pNLP6* (1026 pb) río arriba del codón de inicio de la traducción de ambos genes para su amplificación. Se diseñaron oligos específicos para cada promotor tomando como referencia la secuencia codificante y el sitio de inicio de transcripción mediante la herramienta en línea Oligo Calculator versión 3.27 ® <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> y a su vez con el software en línea SIGMA ® <http://www.oligoevaluator.com/>. Las características de los oligos como la temperatura óptima de alineamiento (T_m) y condiciones óptimas para amplificación fueron probadas mediante PCR para la amplificación del promotor *NLP4* y *NLP6*. (Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de oligos para la amplificación del promotor de *NLP4* y *NLP6*.

Gen	Concentración	Dilución (oligo +H ₂ O µL)	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
1. <i>pNLP6</i>	121 pmol/µL	5 µl +95 µL	5´ CAC CGTG GAA CAT GGA GAG GAA C 3´	5´ CAT CTT CCT TCC ACT AAC TAA C 3´
2. <i>pNLP4</i>	146 pmol/µL	5 µl +95 µL	5´CACGTGGAACATGGA GAGGAAC 3´	5´CCATCTTCCTTCCA CTAACTAAC 3´

Datos tomados de la secuencia de los programas Phytozome y oligo Calculator®. La dilución de los oligos depende de la concentración y se realiza con una mezcla de agua inyectable estéril

6.4. Aislamiento y clonación de *pNLP4* y *pNLP6*

Esta primera etapa consiste en la clonación de *NLP4* y *NLP6*, para el cual se realizó el aislamiento del ADN del genoma de *P. vulgaris* y con oligos específicos, la amplificación del promotor a partir del ADN. La amplificación se realizó utilizando el sistema de clonación Gateway con pENTR TOPO. Para ambos promotores se utilizó el vector de destino pBGWSF7.0 para integrar tanto con *pNLP4* como el *pNLP6* en el vector final que fue transformado en *A. rhizogenes* cepa K599. Dichos vectores fueron confirmados por PCR y secuenciación en el Instituto de Biotecnología, UNAM (IBT).

La segunda parte de la metodología consistió en inyectar el constructo en semillas de *P. vulgaris* Negro Jamapa a los 2 días de germinación con la cepa fresca de *A. rhizogenes* K599 que contenía el gen *NLP4* y *NLP6*. Posteriormente, a los 11 días de haber inyectado, las plantas generaron raíces peludas transgénicas. A continuación, se eliminó la raíz principal y se inoculó con *R. tropici* silvestre para inducir la nodulación en las raíces. Se estudió la expresión espacio-temporal del promotor de *pNLP4* y *pNLP6* en diferentes momentos posteriores a la inoculación mediante el ensayo GUS.

6.5. Esterilización de semillas

El protocolo para la esterilización previa a la germinación de semillas, se realizó dentro de una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Para ello, previamente se esterilizó papel aluminio, agua desionizada y Servitoalla de papel en autoclave. El protocolo consiste en lavar las semillas de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa en una solución de 45 mL de etanol al 96 % por 1 min. Posteriormente, se enjuagan con agua estéril y se realizó un segundo lavado con hipoclorito de sodio al 20 % en agitación constante por 5 min aproximadamente. Se removió el cloro y se enjuaga con suficiente agua estéril para eliminar cualquier residuo de etanol o de hipoclorito de sodio por tres ocasiones.

6.6. Germinación de semillas

Las semillas de *P. vulgaris* previamente esterilizadas se colocaron de manera separada en charolas de aluminio o cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas humedecidas con solución Broughton & Dilworth (B&D) (Broughton & Dilworth, 1971) y/o agua desionizada para su germinación. La preparación de la solución B&D se muestra en la sección de anexos en la (Tabla A3). Posteriormente, las charolas/placas Petri se cubrieron con papel aluminio y se colocaron en una cámara de crecimiento en oscuridad a 28 °C durante 2 a 3 días.

6.7. Extracción de DNA genómico de *P. vulgaris*

Se realizó la extracción ADN genómico de puntas de raíces de semillas de frijol variedad Negro Jamapa marca Verde Valle®. Luego de ser germinadas dos días en oscuridad bajo el protocolo mencionado anteriormente. La extracción de ADN de raíz de *P. vulgaris* se realizó triturando las raíces en nitrógeno líquido con el kit DNeasy Plant Pro and Plant siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1:Protocolo de extracción). La calidad del ADN se comprobó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA) (Reyes *et al.*, 2011).

6.8. Amplificación de *pNLP4* y *pNLP6* mediante PCR

Se realizó una amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) para para amplificar los promotores *NLP4* y *NLP6* bajo las siguientes condiciones específicas (Tabla 2). En donde la temperatura de alineamiento óptima para amplificar *NLP4* fue de 58.5 °C y 56.5 °C para *NLP6*. La mezcla de reacción y el programa de PCR empleados se muestran en la Tabla 2. Posteriormente se realizó un gel de electroforesis para visualizar el producto amplificado.

Tabla 2. Condiciones del programa PCR amplificación del promotor *NLP4* y *NLP6*.

Protocolo de PCR para la amplificación de promotor <i>NLP4</i> y <i>NLP6</i>	Condiciones del programa PCR
<p>pNLP4</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA raíz <i>P. vulgaris</i>(2 µL) ▪ Buffer para PCR 5X Superfly (10 µL) ▪ Mix de dNTP 10mM (1 µL) ▪ Oligo pr<i>NLP6</i> For (1 µL) ▪ Oligo pr<i>NLP6</i> Rev (1 µL), ▪ Taq polimerasa Advantage 50X (0.5 µL) ▪ H2O (30 µL) 	<p>La reacción de PCR usando el programa que consistió en las siguientes condiciones:</p> <p>98°C por 5 min.; 30 ciclos a 98°C por 30 seg., 58.5°C por 45 seg. y 72°C por 1 min.; y finalmente a 72° C por 6 min.</p>
<p>pNLP6</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA raíz <i>P. vulgaris</i>(2 µL) ▪ Buffer para PCR 5X Superfly (10 µL) ▪ Mix de dNTP 10mM (1 µL) ▪ Oligo pr<i>NLP6</i> For (1 µL) ▪ Oligo pr<i>NLP6</i> Rev (1 µL), ▪ Taq polimerasa Advantage 50X (0.5 µL) ▪ H2O (30 µL) 	<p>La reacción de PCR usando el programa que consistió en las siguientes condiciones:</p> <p>95°C por 5 min.; 31 ciclos a 95°C por 30 seg., 56.5°C por 45 seg. y 72°C por 1 min.; y finalmente a 72°C por 7 min.</p>

Se usarón los oligos Forward y Reverse específicos de cada promotor. Se amplifica un fragmento correspondiente a 1036 pb para *NLP4* y un fragmento de 1026 pb para *NLP6*.

6.9. Visualización y aislamiento del fragmento

Posteriormente el producto amplificado se visualizó en gel de agarosa al 1.2 % (70 g de agarosa disuelto en 60 mL de TAE 1X) el cual corrió bajo condiciones de electroforesis a 100 V por 25 min. Dicho gel de agarosa permite confirmar que el tamaño del fragmento fuera correcto de acuerdo al marcador 1 kb plus (Gold bio®). Una vez visualizado, el fragmento de promotor esperado de cada promotor se aisló del gel y se purificó usando el kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction® siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1.4). Posteriormente las muestras obtenidas se analizaron en el nanodrop para cuantificar la concentración obtenida del producto de PCR de cada gen.

6.10. Clonación del promotor *pNLP4* y *pNLP6* en el vector pENTR/D- TOPO

El fragmento del promotor de *NLP4* y *NLP6* aislados previamente se clonó dentro del vector de entrada pENTR utilizando el kit pENTR/D-TOPO (Invitrogen), utilizando las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones; es decir, la mezcla de reacción consistió en agregar 5 µL del fragmento aislado de *pNLP4* y *pNLP6* en tubos de PCR independiente, 1 µL de NaCl, 0.5 µL Vector pENTR/D-TOPO y 0.5 µL de H₂O. La reacción de clonación se realizó en un tubo de PCR para cada gen, la cual se incubó a temperatura ambiente (20 °C) durante 16 horas aprox.

6.11. Transformación en *E. coli*

De cada reacción de clonación anterior, denominadas como pENTR/D-TOPO/*pNLP6* y pENTR/D-TOPO/*pNLP4* se tomaron de 5-6 µL para transferirla de manera independiente a células electro competentes por calcio de *E. coli* cepa TOP10 mediante choque térmico bajo el protocolo de (Froger & Hall, 2007) pasando de 4 °C en hielo a 42 °C (Anexo 4). Posteriormente dicho cultivo se plaqueo en agar LB con bajo kanamicina (Kan 50) para obtener colonias aisladas. Posteriormente se realizó una PCR de colonia para confirmar que las colonias obtenidas tuvieran el gen del tamaño esperado para cada promotor *NLP4* (1036 pb) y *NLP6* (1026 pb).

6.12. Aislamiento de plásmido y secuenciación

En seguida, se realizó el cultivo de dichas colonias positivas en medio LB líquido por 12 horas adicionado con kanamicina (100 µg/µL) para posteriormente realizar la extracción del plásmido mediante la técnica de Miniprep con el kit GeneEluted Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich), siguiendo el protocolo contenido (Anexo 3). Finalmente se cuantificó la concentración de ADN plasmídico obtenido de pENTR/D-TOPO/*pNLP6* y pENTR/D-TOPO *pNLP4* con NanoDrop de para ser secuenciado en el instituto de biotecnología de la UNAM (IBT) usando los primers M13.

6.13. Clonación de *pNLP4* y *pNLP6* en el vector destino

Los plásmidos obtenidos de *PvNLP4* y *PvNLP6* se clonaron en el vector destino pBGWFS7.0 usando LR clonasa (Invitrogen)(Déniz Henríquez, 2015). La mezcla de reacción consistió en agregar 6 μL del fragmento *pNLP4* y *pNLP6* de manera independiente con 5 μL del vector pBGWFS7.0 y 1 μL de LR clonasa, para ser incubado durante 16 horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, cada reacción de clonación se detuvo después de agregar 1 μL de Proteinasa K y enseguida cada mezcla de reacción se incubó a 37 ° C por 10 minutos.

6.14. Transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes* en el vector final

Para ello, se realizó nuevamente una transformación del plásmido obtenido de cada promotor pBGWFS7.0/*pNLP4* y pBGWFS7.0/*pNLP6* en células electro competentes de *A. rhizogenes cepa* K599. El antibiótico usado como medio de selección fue espectinomicina al 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ tanto para el agar LB como para el medio LB líquido. El plásmido pBGWFS7.0/ se usó como vector vacío (empty vector:EV) y se transformó en células de *A. rhizogenes* K599 como control.

La transformación se llevó a cabo mediante la inducción de voltaje de 1.8 V en la máquina de electroporación y dicha mezcla se resuspendió en medio LB con espectomicina 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se plaquean en cajas Petri con agar a la misma concentración, enseguida fueron incubadas por 2 días a 28 °C para obtener colonias positivas. En seguida, las colonias positivas fueron seleccionadas con el antibiótico espectinomicina (spec 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se llevó a cabo una PCR de colonia usando primers específicos del promotor para confirmar la presencia del gen y que el tamaño del fragmento correspondiera al esperado, confirmando entonces que fueran colonias positivas. Posteriormente se eligieron dos colonias positivas y se crecieron en LB líquido con espectinomicina (Spec 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 12 horas y se prepararon stocks. Para ello, dichas colonias se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se les agregaron 50 μL de glicerol al 80 % frío y estéril. Dichos stocks se guardaron a -80 ° C, de acuerdo al protocolo de (Nanjareddy *et al.*, 2017).

6.15. Estudio de la expresión espacio-temporal de *pNLP6* y *pNLP4* durante la simbiosis

6.16. Generación de raíces pilosas (hairy roots) en *P. vulgaris*

A partir 200 μ L de los stocks de *A. rhizogenes* que contenían el vector pBGWFS7.0/*pNLP6*, pBGWFS7.0/*pNLP4* y pBGWFS7.0/EV (anteriormente almacenados a -80 ° C), se plaquean en cajas Petri con medio LB adicionada con espectinomicina 200 μ g/ μ L para *NLP4* y *NLP6*. Luego, se incubaron por 12 horas, para entonces con ayuda de una punta y una espátula remover la mayor cantidad de biomasa y ser depositada en tubos eppendorf para cada gen respectivamente.

6.17. Preparación de material para inyección

Para llevar a cabo el sistema de inducción de raíces pilosas (hairy roots) prepararon tubos de vidrio Pyrex que dentro contenían (35 mL) de agua de garrafón estéril y un tubo Falcon con solución nutritiva B&D (14 mL).

El tubo Falcon se cubrió con aluminio perforado con 2 agujeros para colocar dentro la raíz de frijol a inyectar y se tapó el tubo de ensayo Pyrex con una tapa de plástico transparente para permitir el paso de la luz. Además se germinaron semillas de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa con el protocolo antes mencionado (Anexo 5) dos días antes de inyectar los cultivos con el vector final pBGWFS7.0/*pNLP6* y pBGWFS7.0/*pNLP4*.

6.18. Inyección de *A. rhizogenes*

De los tubos previamente preparados con el cultivo, se suspendieron en una mínima cantidad de agua destilada estéril (~200 μ L) y se mezcló para ser introducido en una jeringa de 3 mL. Esto con el objetivo de inyectar los cultivos en el área del hipocótilo de las semillas con 2 días de edad. Dichas semillas inyectadas se colocaron cada una en un tubo Falcon de 15 mL con solución nutritiva B&D y en el tubo de vidrio Pyrex.

Posteriormente, dichos tubos se colocaron en gradillas y se incubaron en la cámara de crecimiento a 28 °C con fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas de oscuridad. Al paso de 4 días, las hojas comenzaron a abrirse y alcanzar el borde del tubo, por lo que se retiró la tapa de plástico y entonces se colocó plástico Parafilm alrededor del tallo sin apretarlo para evitar el rompimiento como sistema de soporte de la planta.

A lo largo del transcurso de los días, se continuó monitoreando el crecimiento de la plantas de ambos promotores, cuidando de mantener que la cantidad de solución nutritiva B&D dentro del tubo falcón de 14 mL para el crecimiento eficiente de la planta. Así mismo, en el sistema de tubo Pyrex, se mantuvo el nivel de agua de garrafón para aportar las condiciones de humedad necesarias.

6.19. Inoculación de *P. vulgaris* con *R. tropici*

Después de 10 días de la inyección, se comenzaron a generar raíces transformadas con *PvNLP4* y *PvNLP6*, entonces se inyectaron alrededor de 25 plantas de cada promotor. Posteriormente se seleccionan las plantas infectadas para cortar las raíces no transformadas con un bisturí estéril, así como la raíz principal.

Dichas plantas compuestas con raíces pilosas transgénicas (hairy roots) se inocularon con *R. tropici*, cuya cepa se puso a crecer en 100 mL de medio PY y se inocularon con 5 mL de la capa por planta directamente en el sustrato y en la raíz. En seguida, se transfirieron a una mezcla de sustrato constituida por vermiculita estéril y PEAT MOSS estéril en proporción 3:1. Finalmente las plantas fueron regadas con solución nutritiva B&D.

6.20. Ensayo de análisis GUS

Para analizar los patrones de expresión de *NLP4* y *NLP6*, se inocularon raíces transgénicas con el buffer GUS que contiene X-gluc (Jefferson, 1987). Para ello, dichas plantas fueron primero retiradas del sustrato limpiándose muy bien con agua para eliminar cualquier residuo de sustrato. Las raíces pilosas (hairy roots) se cortaron y fueron sumergidas por completo en tubos de microcentrífuga con buffer GUS:X-gluc (Anexo Tabla A2). Debido a que la reacción es sensible a la luz, dichos tubos se cubrieron con aluminio para mantener la oscuridad y se incubaron a 37 °C durante la noche.

No se recomienda que la reacción dure más de 16 horas, debido a que se puede dañar el tejido vegetal en la exposición prolongada dentro de la reacción del buffer GUS. Posterior a la incubación las raíces o el tejido vegetal sometido en el buffer GUS fueron secadas en una Servitoalla de papel, para quitar el exceso del buffer y posteriormente fueron enjuagadas con abundante agua hasta eliminar por completo el buffer GUS (Jefferson, 1987).

6.21. Microscopía

El ensayo GUS produce una tinción color magenta indicando los sitios en los que se expresa la actividad de *pNLP4* y *pNLP6* posterior al tiempo de incubación. Los resultados de la actividad de ambos genes se analizaron bajo microscopio y estereoscopio. Principalmente, la tinción ocasionada por el análisis GUS fungió como evidencia de la expresión espacio temporal de *pNLP4* y *pNLP6* el cual se realizó bajo microscopía durante el inicio de la infección, así como las etapas tempranas y tardías del proceso de nodulación.

7. Resultados

7.1. Diseño de oligos para amplificación de *pNLP4* y *pNLP6*

Se obtuvieron los oligos de manera satisfactoria en base a los programas con los que se realizaron (Phytozome y Oligo Calculator). Los oligos que se obtuvieron se diseñaron río arriba de la secuencia codificante incluyendo la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño de oligos finales específicos para la amplificación de *pNLP4* y *pNLP6*.

Tamaño del fragmento <i>pNLP4</i> 1026 pb	Tamaño del fragmento <i>pNLP6</i> 1036 pb
<i>pNLP4</i> Forward 5´ CAC CGT GCT ATC CAT CAA CAA TTA CC 3´	<i>pNLP6</i> Forward 5´ CAC CGTG GAA CAT GGA GAG GAA C 3´´
<i>pNLP4</i> Reverse 5´ CCA CCA CCA TAT TCC ATG CTC TTC 3´	<i>pNLP6</i> Reverse 5´ CAT CTT CCT TCC ACT AAC TAA C 3´

Los oligos se seleccionaron bajo las herramientas en línea de Phytozome y Oligo Calculator.

7.2. Aislamiento y clonación de *pNLP4* y *pNLP6*

Se obtuvo la amplificación de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* mediante una reacción de PCR. En la amplificación se obtuvo el tamaño de banda esperado de 1036 pb para *NLP4* y 1026 pb para *NLP6* (Figura 7). Se realizó la cuantificación en el nanodrop para cada promotor. Para *NLP4* la cuantificación

fue de 93 ng/μL. Para *NLP6* la cuantificación fue de 110 ng/μL. Los productos amplificados se visualizaron mediante un gel de agarosa al 1.2 % posterior. Se utilizaron marcadores de peso molecular diferentes para cada gen. Se obtuvo el tamaño esperado para *NLP6* fue de 1026 pb de acuerdo al Marcador de tamaño molecular 1 kb GoldBio® (*NLP4*) y 1 kb plus thermofisher® (*NLP6*). La visualización de ambos fragmentos esperados de promotor *NLP4* y *NLP6* fue bajo el foto documentador y transiluminador de luz UV, en donde efectivamente coincide con el tamaño esperado (Figura 7). Posteriormente, se logró amplificar ambos genes *NLP4* y *NLP6* de manera satisfactoria así como su clonación en el vector pENTR/D.

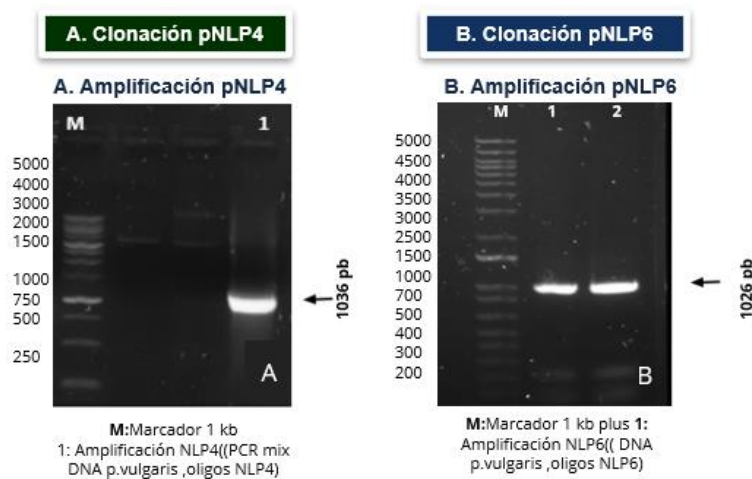


Figura 7. Amplificación por PCR del promotor *NLP4* y *NLP6*. Amplificación de ambos promotores a partir de ADN genómico de *P. vulgaris*. **A.** Amplificación del promotor *NLP4*. El tamaño obtenido en la banda de producto de PCR fue de (1,036 pb) marcado por la flecha. 1: Carril donde se depositó la muestra *NLP4*. en gel de agarosa al 1.2 %. **B.** Amplificación del promotor *NLP6*. El tamaño obtenido en las bandas corresponde al esperado para *NLP6* (1,026 pb) señalado con una flecha. 1 y 2: La muestra se dividió en dos carriles en el gel de agarosa 1.2 %. **M:** Marcador de tamaño molecular 1 kb GoldBio® y 1 kb plus ThermoFisher®.

7.3. Transformación de *E. coli* con el vector de entrada pENTR/D-TOPO en pNLP4 y pNLP6

Posterior a la clonación exitosa de los promotores *NLP4* y *NLP6* en *E. coli* de manera separada, se obtuvo el tamaño esperado de banda para la confirmación de dicha colonia en una reacción PCR usando oligos específicos de cada promotor junto con los oligos M13 forward y reverse. De entre las colonias positivas obtenidas de la transformación se logró aislar el plásmido correctamente. La visualización de los fragmentos en un gel de agarosa al 1 % mediante electroforesis confirmó que la clona era positiva (Figura 8).

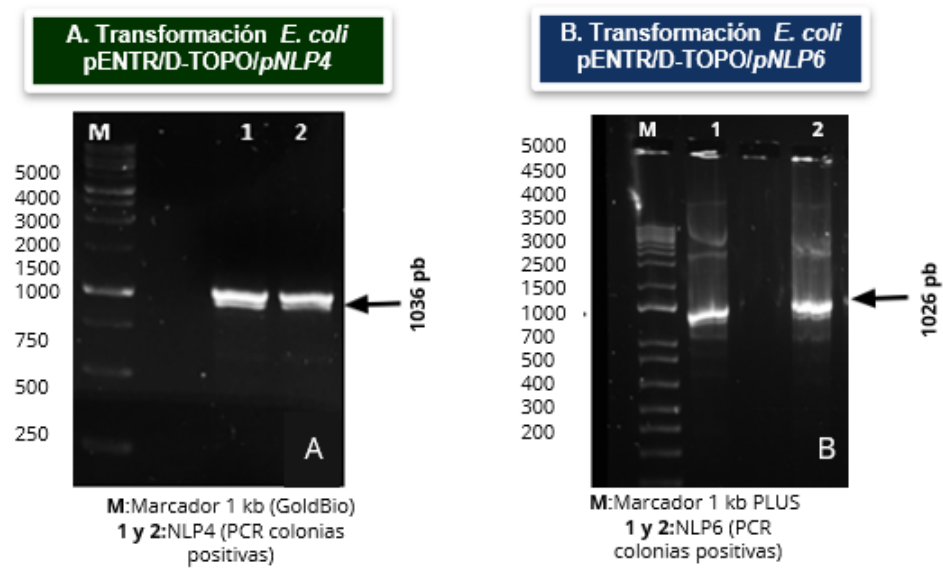


Figura 8. PCR de transformación de *E. coli* con pENTR/D-TOPO/pNLP4 y pENTR/D-TOPO/pNLP6. Ambos promotores se visualizaron en un gel al 1.2 % de agarosa. **A.** Colonias positivas para el promotor *NLP4*. Se obtuvo el tamaño de banda de 1036 pb para Se utilizó el oligo M13 forward del kit pENTR/D-TOPO y el oligo reverse específico para la amplificación. **B.** Colonias positivas para el promotor *NLP6*. Se obtuvo el tamaño de banda de 1,026 pb señaladas con flecha para *NLP6*. **M:** Marcador de peso molecular.

7.4. Transformación de *A. rhizogenes* con el vector final pBGWFS7.0 en pNLP4 y pNLP6

Posteriormente de la obtención de colonias positivas, dichas colonias se transformaron en la cepa K599 de *A. rhizogenes*. De las cuales, se procedió a realizar nuevamente PCR de colonia, esta vez con los oligos específicos del promotor de *NLP6*, obteniéndose nuevamente el tamaño esperado de 1,026 pb para el promotor *NLP6* y 1036 pb para el promotor *NLP4* (Figura 9). Posteriormente se les realizó un miniprep para la extracción del plásmido. El cual se cuantificó bajo el nanodrop, obteniendo concentraciones altas. Para el promotor *NLP4* (110 µg/µL) y *NLP6* (96 µg/µL) respectivamente.

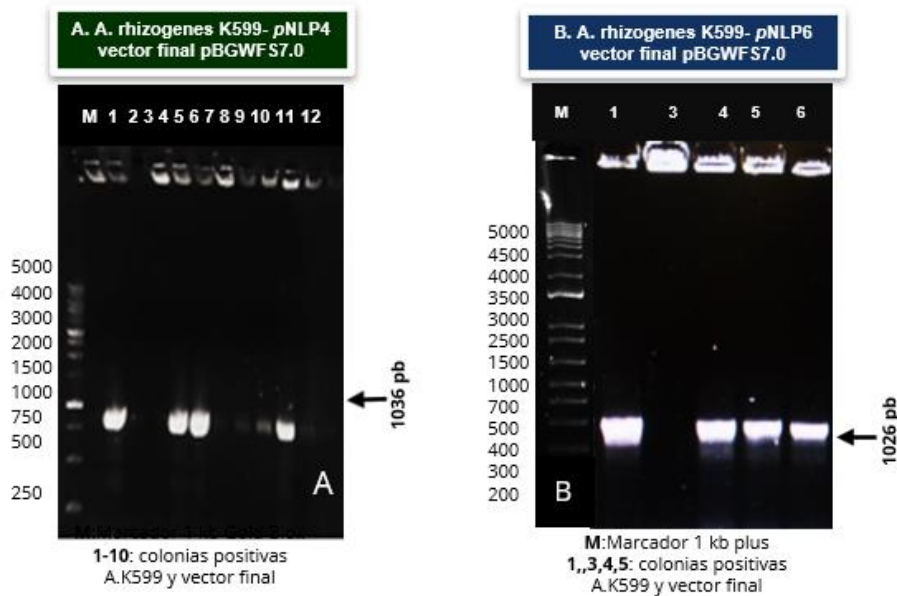


Figura 9. Transformación de *E. coli* y *A. rhizogenes* K599 con el vector final pBGWFS7.0/pNLP6 y pBGWFS7.0/pNLP4. A. Todas las colonias de *NLP6* fueron transformadas positivamente. **A.** Se obtuvieron colonias positivas para *NLP4*. Tamaño esperado 1,036 pb, señaladas con flecha, carriles 1-11. **B.** Colonias positivas de *NLP6*. Se obtuvieron bandas del tamaño esperado de 1026 pb señaladas con flecha, carriles 1-3. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb.

7.5. Inducción de raíces pilosas (hairy roots) de *pNLP4* y *pNLP6*

Se obtuvo de manera exitosa la generación de raíces pilosas (hairy roots). La germinación de semillas de *P. vulgaris* Negro Jamapa a los dos días fue exitosa. Por ello, a tales semillas se les desprendió la testa y se les inyectó los promotores *NLP4* y *NLP6* de manera aislada en el hipocótilo. Se obtuvo un alto crecimiento del cultivo de *A. Rhizogenes* K599 en agar LB con espectomicina 200 µg/µL. Dicho protocolo se realizó para plantas de *P. vulgaris* inyectadas con cada uno de los promotores *NLP4* y *NLP6* (Figura 10).

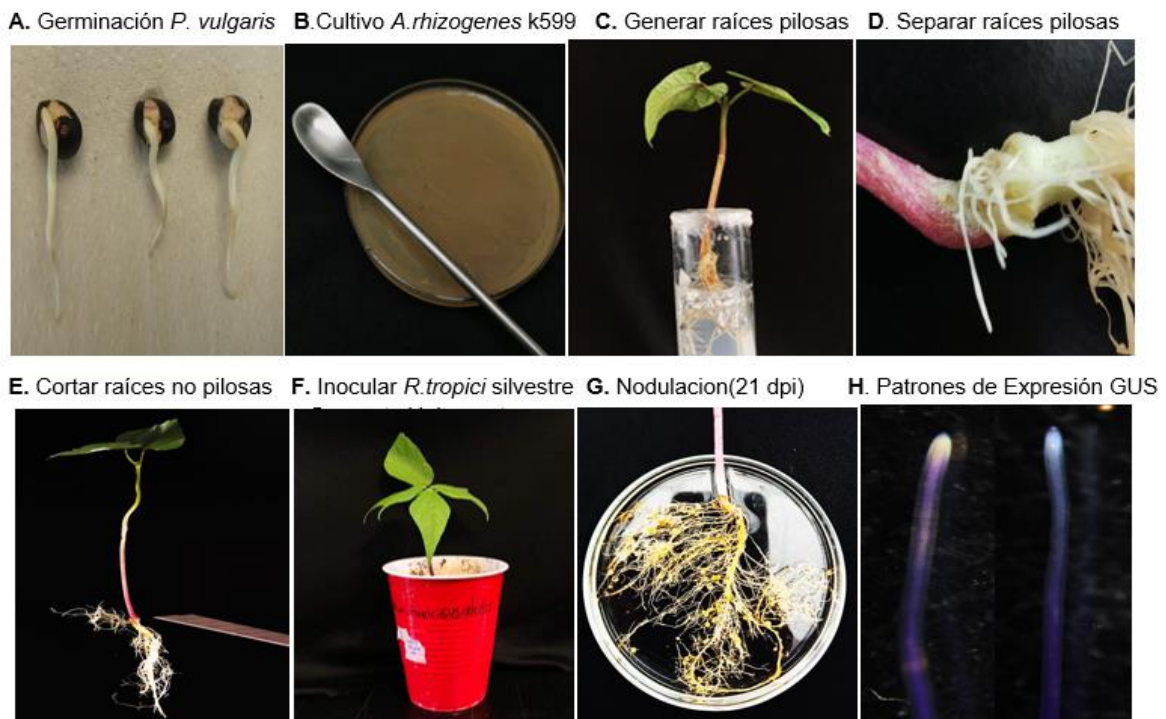


Figura 10: Inducción de raíces pilosas (hairy roots) en *P. vulgaris*. El sistema de inducción se realizó mediante la transferencia de material genético de *A. rhizogenes*. **A.** Semillas *P. vulgaris* Negro Jamapa a los dos días de germinación. **B.** Cultivo de *A. rhizogenes* en caja Petri al spect 200 µg/µL. **C.** Generación de raíces pilosas (hairy roots). **D.** Corte de raíces no transgénicas en las plantas de *P. vulgaris* con *NLP4* y *NLP6*. Es decir se dejaron sólo las raíces peludas transgénicas y se eliminaron todas las demás **E.** Inoculación con *R. tropici* silvestre. **F.** Desarrollo y crecimiento de las plantas de *P. vulgaris* con los promotores *NLP4* y *NLP6* inoculadas con *R. tropici* por 21 días aproximadamente. **G:** Proceso de nodulación de *P. vulgaris* en diferentes etapas. **H:** Análisis GUS y microscopía en raíces y nódulos de *P. vulgaris*. *A. rhizogenes* diluida en agua para inyectar en *P. vulgaris*.

7.6. Sistema de inducción de raíces pilosas (hairy roots) *pNLP4* y *pNLP6*

En ambos promotores, se produce una inflamación en el tallo justo en el sitio de inyección. Dicho evento dará inicio a la formación de raíces pilosas (hairy roots). Las condiciones de calor y humedad son esenciales para la generación eficiente de dichas raíces en el sistema implementado. Posterior a los 9 días de la infección (dpi), las plantas de ambos promotores presentaron callos en el sitio de inyección.

Luego de 11-12 días después de la infección, el sistema ya contaba con hairy roots suficientes para realizar el análisis GUS sin inoculación (Figura 11). De manera general, los promotores *NLP4* y *NLP6* no presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de raíces transgénicas y callos en el sitio de inyección. Ambos promotores presentaron un porcentaje de eficiencia alto del 95 % en relación a las plantas inyectadas y a la generación de raíces pilosas (hairy roots).

De acuerdo a las observaciones realizadas, se concluye que dicho protocolo es eficaz para la generación de raíces peludas en el estudio de la caracterización funcional de los promotores *NLP4* y *NLP6*. Se realizaron al menos tres replicas con cada uno de los promotores. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre los fenotipos de las plantas entre *NLP4* y *NLP6* ya que todas las replicas presentaron un crecimiento normal y al menos 2-3 cm de longitud en las hairy roots a los 11 días después de la inyección (Figura 11).

Finalmente se obtuvo un sistema eficiente para generar con éxito las raíces pilosas (hairy roots) de cada promotor. Presentaron al menos 3-4 callos en el sitio de infección entre los 6-7 días después de la inyección. Posterior a la inoculación con *R. tropici* a los 15 días después de la inyección, el crecimiento se observó de manera progresiva en las plantas y de manera saludable a los 20 días después de la inoculación. Se registro que la temperatura óptima para la generación de las raíces pilosas es entre 28°-30°C en la cámara de crecimiento. En cambio, se obtuvo un mejor rendimiento del crecimiento de las plantas de *P. vulgaris* en invernadero después de la inoculación (Figura 11).

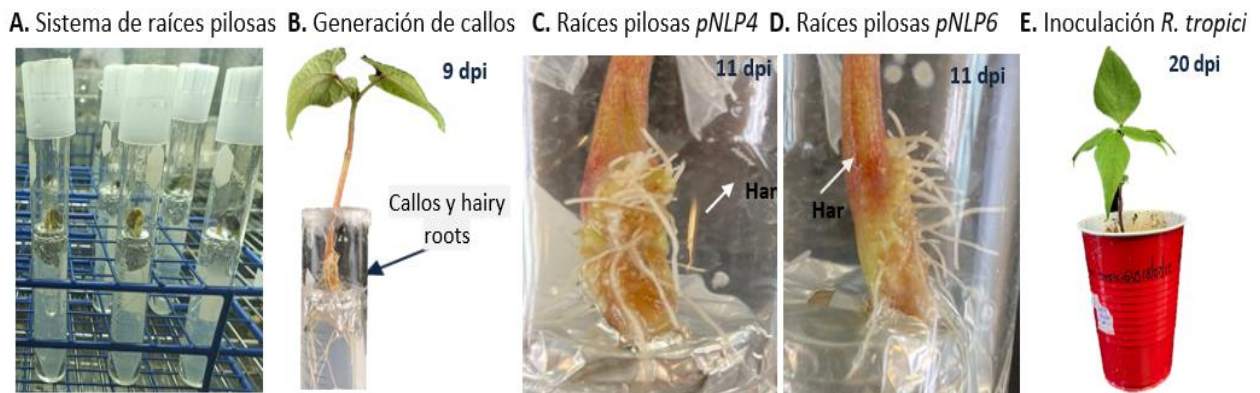


Figura 11. Generación de raíces pilosas (hairy roots) pNLP4 y pNLP6 . **A.** Sistema de inducción de hairy roots. Se realizó el mismo sistema de inducción de manera separada para cada uno de los promotores *NLP4* y *NLP6* como método de generación de raíces transgénicas. **B.** Desarrollo y crecimiento de callos, así como de las raíces transgénicas en el sistema de inducción. Dicho sistema contiene tubos con solución B&D como método de nutrición y agua, manteniendo así las condiciones de calor y humedad necesarios para una generación más rápida y eficiente de dentro de tubos Pyrex. **C.** Hairy roots de *NLP4* con a los 11 días después de la inyección del respectivo promotor. **D.** Hairy roots de *NLP6* con a los 11 días después de la inyección del respectivo promotor. **E.** Posteriormente, se trasplantó dichas plantas a sustrato vermiculita para ser inoculadas con *R. tropici* silvestre.

7.7. Análisis de patrones de expresión en *pNLP4* y *pNLP6* sin *R. tropici* silvestre

Posteriormente a la inyección de cada promotor en plantas compuestas de *P. vulgaris*, se realizaron ensayos GUS para el análisis de la expresión tanto de *NLP4* y *NLP6* en las raíces pilosas (hairy roots) de cada promotor.

A través de los ensayos de microscopia GUS y la clarificación de las raíces peludas de cada promotor se identificaron las zonas en donde se expresaban dichos promotores. Esto se realizó para observar la forma y localización de la expresión de ambos promotores antes de la inoculación, es decir sin *R. tropici* silvestre. Los resultados en la expresión en cada promotor sin inoculación fueron los siguientes:

- **Patrones de expresión *NLP4* en las raíces de *P. vulgaris***

Para el promotor *NLP4*, se obtuvo el caso contrario que *NLP6*. Es decir, sin inoculación la expresión de *NLP4* fue únicamente en la vasculatura de la raíz y no en el tejido meristemático (puntas) de la raíz principal de *P. vulgaris*. La expresión del promotor *NLP4* fue un poco más específica sólo en la zona de elongación que la del *NLP6*.

Asimismo, se encontró que la actividad de *pNLP6* se restringe a la zona de elongación solamente. Por lo que se considera que la expresión de *NLP4* es más específica durante la simbiosis con *R. tropici* silvestre, es decir después de la inoculación. Es decir, sin inoculación, *NLP6* se expresa en zona meristemática y *NLP4* en la vasculatura de la raíz principal (Figura 12).

- **Patrones de expresión *NLP6* en las raíces de *P. vulgaris* sin inoculación**

Los patrones de expresión espacial y temporal del promotor *NLP6::GUS* se analizaron en raíces no inoculadas con *R. tropici* Wild type bajo el análisis histoquímico GUS. Se encontró que la expresión espacio temporal de *NLP6* se muestra fuertemente en el tejido meristemático, es decir en las puntas de la raíz principal a los 11 días de la inyección (11 dpi) del promotor *NLP6* en las plantas compuestas de *P. vulgaris*. Así mismo, las raíces control contienen vector vacío, es decir sin inyección del promotor *NLP6* por lo que no expresan el gen GUS (Figura 12).

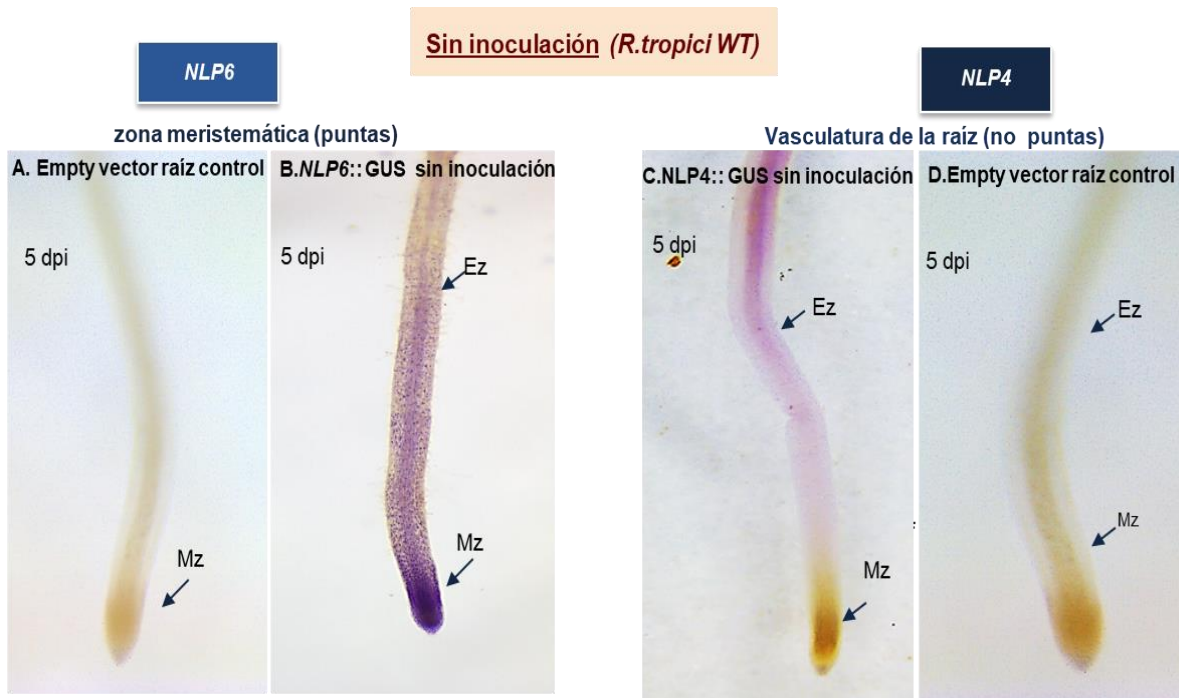


Figura 12. Patrones de expresión espacial y temporal de *pNLP4* Y *pNLP6* sin inoculación (sin *R. tropici* silvestre). Patrón espacial y temporal de expresión del promotor *NLP6::GUS* en raíces no inoculadas con *R. tropici* silvestre. **A y D:** raíces control con vector vacío. **B:** Raíz del *pNLP6* sin inocular, la expresión de *pNLP6* se encuentra activa en las puntas. **C:** raíz no inoculada con *R. tropici*. **Mz:** zona meristemática. **Ez:** zona de elongación de la raíz.

7.8. Análisis de los patrones de expresión en *pNLP4* y *pNLP6* *R. tropici* silvestre

Para analizar la actividad de GUS en las raíces transformadas, las muestras de raíces con tinción GUS se sometieron a un proceso de aclaramiento depositarlas en un recipiente con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 hora para luego visualizarlas en el microscopio óptico. Dicho proceso se realizó para nódulos y raíces teñidas en color morado debido al análisis GUS.

Posterior a la inoculación con *R. tropici* silvestre cepa CIAT 899, se analizó la expresión de ambos promotores en las raíces compuestas de *P. vulgaris* a los 5 días después de la infección (5 dpi). Se realizaron nuevamente ensayos GUS para el análisis de la expresión tanto de *NLP4* y *NLP6* en las raíces principales de cada promotor antes del proceso de nodulación. Los resultados en la expresión de *NLP4* y *NLP6* después de la inoculación fueron los siguientes:

7.9. Expresión del promotor *NLP6* en raíces inoculadas con *R. tropici* silvestre

La expresión espacio-temporal de *NLP4* se observó mediante la tinción magenta con el gen reportero GUS posterior a la inoculación de *R. tropici* silvestre en las raíces de *P. vulgaris*. Se encontró que la actividad de *NLP4* muestra la expresión en zonas de elongación y en tejidos vasculares. Se encontró que la expresión del promotor *NLP4* se restringe solamente a las zonas de elongación. A diferencia de *NLP6*, la expresión es contraria sin inoculación. La actividad del promotor *NLP4* se muestra en las zonas vasculares. Especialmente las zonas más oscuras en color magenta, las cuales corresponden a las áreas en las que ocurre la diferenciación celular de la raíz de *P. vulgaris* (Figura 13 B-C).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que la interacción en la vía

simbiótica entre *R. tropici* y la actividad de los promotores *NLP6* y *NLP4*, promueve la diferenciación de la raíz para la posterior formación de primordios. Estos perfiles de expresión se visualizaron posteriormente a los 7 días posteriores a la inoculación con *Rhizobium*, con la aparición de los primeros primordios nodulares. Dichos eventos, coinciden con la expresión de ambos promotores en los que destaca la diferenciación en el tejido vascular de las raíces en plantas inoculadas.

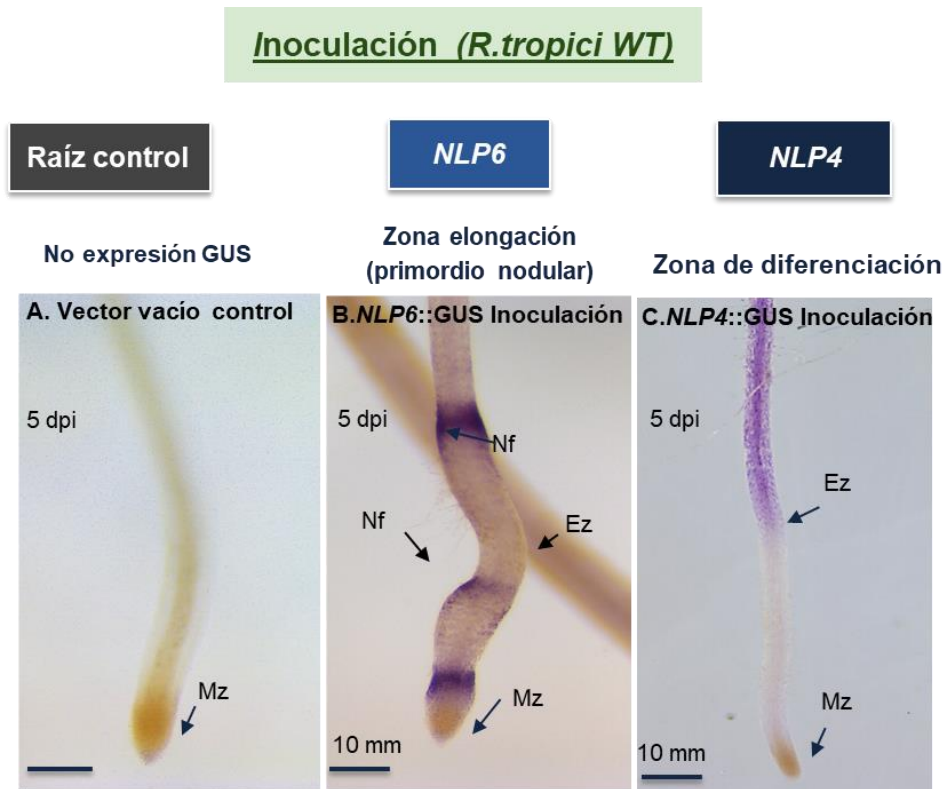


Figura 13. Patrones de expresión espacio temporal de *pNLP4* y *pNLP6* en raíces con inoculación (*R. tropici*). A. Raíz pilosa con vector vacío, usada como raíz control. B. Expresión del gen *NLP6* en raíces pilosas en la fase inicial sin infección por *R. tropici*. La expresión de *NLP6* se muestra en la zona de diferenciación de las raíces pilosas. Las zonas púrpuras indican dónde se induce la formación de nódulos primordiales. C. Expresión de *NLP4* a los 5 dpi con *R. tropici*. La zona en magenta representa la expresión de *NLP4* en diferenciación de la zona de elongación. **Nf**: Zonas de inicio de formación de nódulos. **Mz**: Zona meristemática, **Ez**: zona de elongación.

7.10. Análisis de los patrones de expresión *pNLP4* y *pNLP6* en la nodulación

Se evaluaron los patrones de expresión de *pNLP4* y *pNLP6* a lo largo de las diferentes etapas de la nodulación. Se observó que en el inicio de la nodulación a los pocos días después de la infección. La expresión de ambos promotores se evaluó en distintas etapas a través de la visualización de la tinción magenta proporcionada por el gen reportero GUS. El análisis del inicio de la nodulación en las plantas transformadas de *P. vulgaris* por cada promoción se muestra en orden en las siguientes etapas.

7.11. Infección del pelo radicular en *P. vulgaris* por *R. tropici* silvestre

Se realizó el seguimiento del proceso de la infección en ambos promotores *NLP4* y *NLP6*. Los pelos radiculares liberan flavonoides para atraer a las bacterias y comenzar a formar los hilos de infección. A los 3 días después de la infección (dpi) se observó una fuerte expresión en el pelo radicular de la raíz, indicando satisfactoriamente el inicio de la infección con *R. tropici* en ambos promotores *NLP4* y *NLP6*. En las plantas con los promotores *NLP4* y *NLP6*, se observa la entrada de la bacteria *R. tropici* silvestre a la planta *P. vulgaris* como primera etapa de la infección (Figura 14 A y D).

En ambos, casos la interacción físico-química del pelo radicular con los factores de nodulación (NOD) infectado dará origen a la señalización para la activación de los genes *NLPs* y con ello el inicio de la nodulación mediante la siguiente etapa. Sin embargo, se observó que la actividad de *NLP6* se expresa de forma más general en todas las células durante esta primera etapa en el inicio de la infección (Figura 14 A) .

El promotor *NLP6*, presenta actividad alrededor del hilo de infección en el inicio de la infección. En cambio para *NLP4*, la expresión se muestra más específica sobre el progreso y desarrollo del hilo de infección y no de manera generalizada en todas las células como *NLP6* (Figura 14 D). Este resultado sugiere que el promotor *NLP4* tienen un papel clave en inducir el comienzo de la nodulación temprana (3 dpi). Asimismo, las observaciones sugieren que la expresión de *NLP4* es más específica en etapas tempranas de la nodulación a diferencia del promotor *NLP6*.

7.12. Colonización: Formación de puntos de infección

Como segunda etapa, se observó la colonización de la bacteria *R. tropici*, la cual llega hasta las células corticales creando puntos de infección (3 dpi). Se confirmó la actividad de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* mediante la tinción magenta bajo el análisis GUS. La actividad de *NLP4* y *NLP6* en las zonas magenta se muestra en las células más cercanas a la epidermis, lo que indica que la actividad *NLP4* y *NLP6* inducen la formación de los puntos de infección. Tanto en esta etapa como en la anterior, las células corticales se muestran aun del mismo tamaño y características similares. Las células corticales se muestran de forma alargada y grande, es decir en estado normal sin diferenciar (Figura 14 B y D).

7.13. División de células corticales

En esta última etapa, se observó que la expresión de *NLP4* y *NLP6* induce el proceso de diferenciación celular. En esta etapa, se observa que las células corticales comienzan a dividirse, multiplicándose para dar paso a la formación de primordios nodulares que más adelante se convertirán en nódulos. En este proceso, se muestra que *NLP6* intensifica su expresión alrededor de todas las células corticales, en las que se observa cómo comienzan a dividirse haciéndose más angostas, de menor tamaño y a multiplicarse en cantidad para la formación de nódulos en *P. vulgaris* (Figura 14 C).

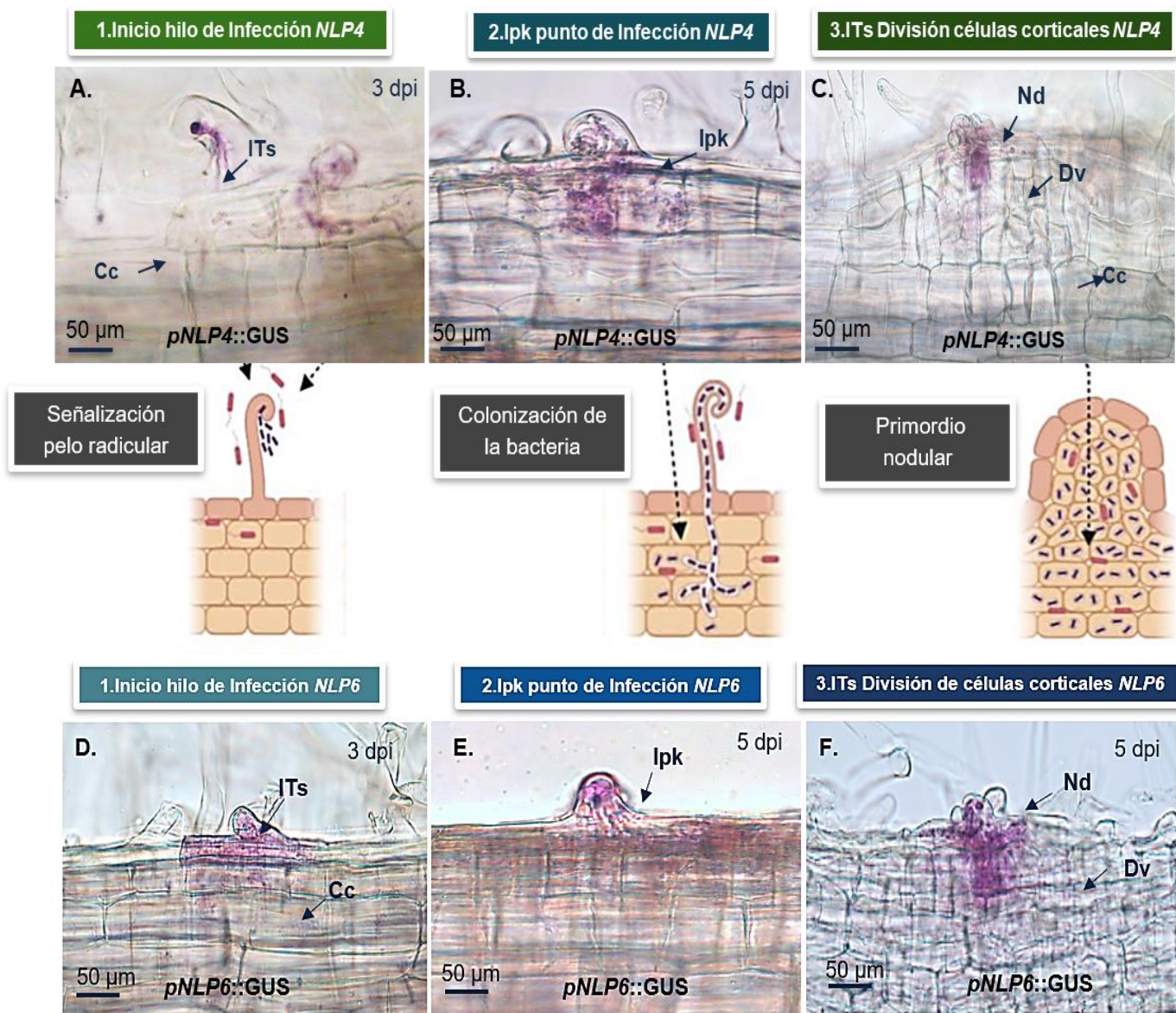


Figura 14. Perfiles de expresión espacial y temporal de *pNLP4* y *pNLP6* en etapas del inicio de la infección. A,B,C: Fuerte expresión (GUS magenta) indica que el gen *NLP6* se expresa en los pelos radiculares durante el inicio de la infección con *R. tropici* silvestre bajo el análisis histoquímico GUS. **D,E,F:** Expresión de *NLP4* en los pelos radiculares con *R. tropici* silvestre bajo el análisis histoquímico GUS. **A,D:** Actividad de *NLP4* y *NLP6* en pelos radicales iniciando el hilo de infección en la etapa temprana 3 dpi con *Rhizobium tropici*. **B,E:** Actividad de la expresión de *NLP4* y *NLP6* en el punto de infección a los 5 dpi. **C,F:** Actividad de *NLP4* y *NLP6* en la división de células corticales a los 5 dpi. **ITs:** hilo de infección. **lpk:** bolsa de infección. **Nd:** primordio nodular. **Cc:** célula cortical. **Dv:** división células corticales. **dpi:** días post inoculación con *R. tropici*.

La expresión del promotor *NLP4* se muestra de manera más específica y puntual solo en el lugar de infecciones la misma forma, la tinción magenta confirma la presencia del promotor *NLP4* en la división de las células corticales en las raíces pilosas (hairy roots) de *P. vulgaris* (Figura 14 C).

Por tanto de manera general, el promotor *NLP6* presenta una fuerte expresión en las células corticales al inducir la división de células corticales. En cambio, el promotor *NLP4* presenta expresión más específica en el inicio de la infección sobre todo en el hilo y punto de infección.

7.14. Análisis de la expresión *pNLP4* y *pNLP6* en el desarrollo de la nodulación

- **Nódulos control:** Se indujo la nodulación en plantas control es decir plantas sin la inyección de *NLP4* y *NLP6* y se realizó de igual manera el seguimiento del proceso de nodulación como comparación con ambos promotores. Los nódulos control expresan un crecimiento regular sin cambios específicos visibles en comparación con los nódulos de los promotores *NLP4* y *NLP6* (Figura 15 C y F).
- **Nódulos *NLP4* y *NLP6*:** Se muestran las etapas de desarrollo de nódulos jóvenes y en maduración, a los 15 y 21 días después de la infección con *R. tropici* silvestre (Figura 15 A y B). Posteriormente, dichos nódulos se someten bajo análisis GUS para observación de la expresión específica de la actividad de *NLP4* y *NLP6* dentro del nódulo. De manera general, la coloración rosada en los nódulos de los promotores *NLP4* y *NLP6* indica el establecimiento de una simbiosis efectiva con la bacteria *R. tropici* silvestre.

- Así mismo, se observó que los nódulos de ambos promotores se encuentran activos en la fijación de nitrógeno. Los nódulos maduros muestran en promedio un tamaño de 2 mm en ambos promotores *NLP4* y *NLP6*, es decir un tamaño regular sugiriendo que el tamaño de los nódulos no varía significativamente respecto a la actividad de cada promotor (Figura 15 A,B,D,E).

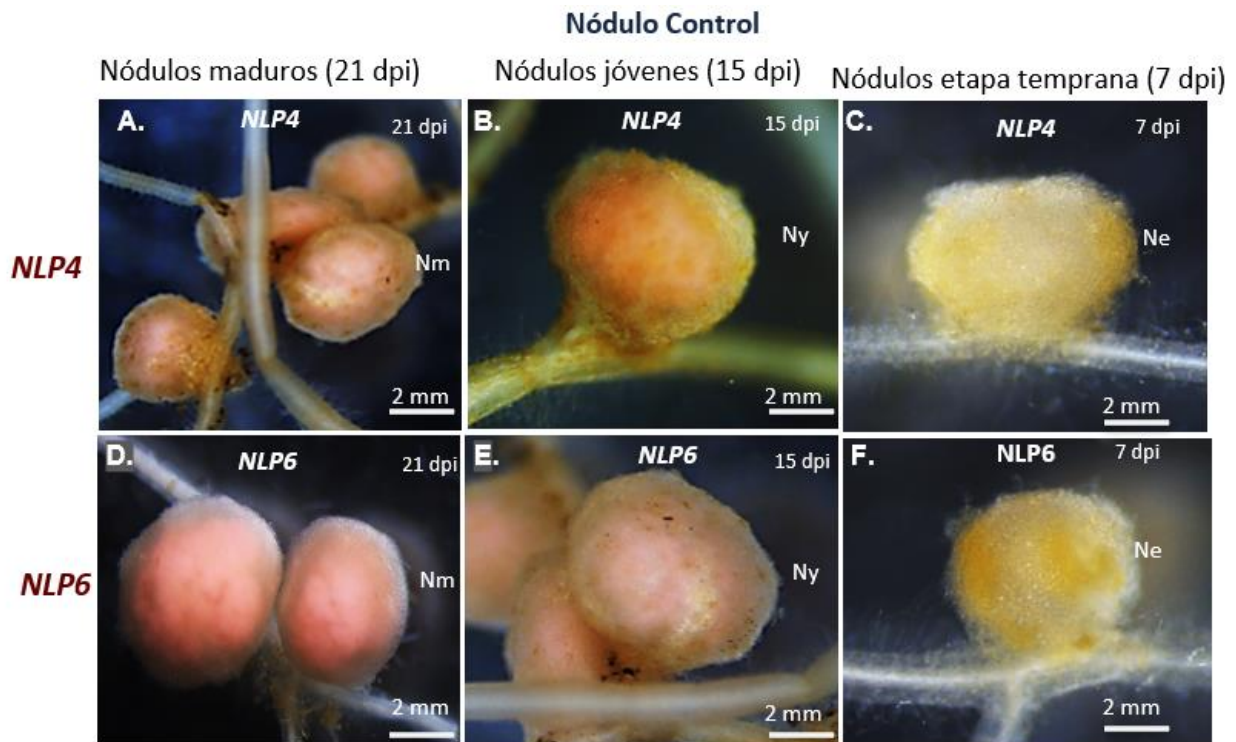


Figura 15. Visualización del desarrollo de nódulos de *pNLP4* y *pNLP6* y nódulos control en etapas intermedias y tardías de nodulación. A. Nódulos control de *NLP4* maduros a los 21 dpi. **B.** Nódulos control de *NLP4* jóvenes a los 15 dpi. **C.** Nódulos control de *NLP4* en etapa temprana a los 7 dpi. **D.** Nódulos control de *NLP6* maduros a los 21 dpi. **E.** Nódulos control de *NLP6* en etapa intermedia a los 15 dpi. **F.** Nódulos control de *NLP6* en etapa temprana a los 7 dpi. **Ne:** nódulo en etapa temprana. **Ni:** nódulo joven. **Nm:** Nódulo maduro. **dpi:** días post inoculación.

7.15. Patrones de expresión del promotor *NLP6* en el proceso de nodulación

Se evaluó la actividad de ambos promotores *pNLP6* y *pNLP4* y se observó bajo análisis GUS y microscopía el desarrollo de los nódulos en diferentes etapas (Figura 16). Las cuales se dividen en las siguientes etapas:

- **En las etapas tempranas (7 dpi):** Se encontró que la presencia del promotor *NLP6* se muestra específicamente en las estructuras del desarrollo del primordio nodular. Se observó que la expresión de *NLP6* es más intensa y más generalizada en los primordios nodulares (Figura 16 A) a diferencia del promotor *NLP4*.
- **En la etapa intermedia (15 dpi):** La tinción magenta debido al análisis GUS, confirma la expresión de *NLP6* de manera general en los nódulos en etapa joven e intermedia a los 15 dpi (Figura 16 B). Bajo estas observaciones, se sugiere que muestra la influencia del promotor *NLP6* se muestra fuertemente de manera general durante todas las etapas tempranas de la nodulación.
- **Finalmente en la etapa tardía (21 dpi):** El promotor muestra una fuerte expresión de GUS en nódulos maduros. Se realizaron cortes transversales en los que se observó que *NLP6* reporta expresión bajo el ensayo GUS en color magenta. La tinción magenta muestra la actividad de *NLP6* de manera general en todas las etapas del proceso de nodulación en *P. vulgaris* (FIGURA 16 C).

7.16. Patrones de expresión del promotor *NLP4* en el proceso de nodulación

- En etapas tempranas (7 dpi), se visualizó la expresión de *NLP4* mediante el ensayo GUS. El resultado del ensayo promotor-GUS muestra la expresión de *NLP4* más tardía que *NLP6* durante la etapa temprana de la nodulación de *P. vulgaris*. Principalmente en la aparición de los primordios a los pocos días después de la inoculación con *R. tropici*, se observó una actividad más específica por parte de *NLP4* que *NLP6* (Figura 16 D).

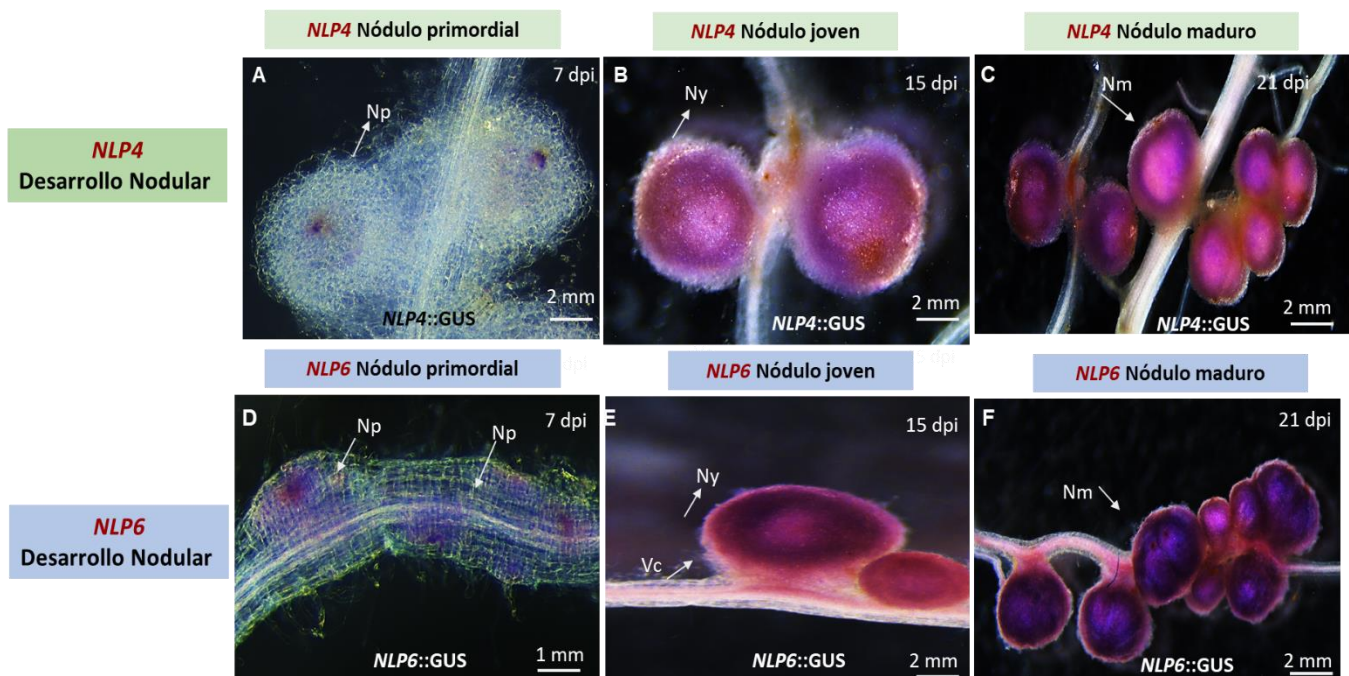


Figura 16. Patrones de expresión espacio temporal de *pNLP4* y *pNLP6* en el proceso de nodulación. Se observan los nódulos de ambos promotores por diferentes etapas. **A.** La tinción magenta muestra la actividad de *NLP4* en los primordios nodulares en la fase inicial a los 7 dpi con *R. tropici*. **B.** Expresión de *NLP4* en nódulos jóvenes a los 15 dpi. **C.** Expresión de *NLP4* en nódulos maduros a los 21 dpi. **D.** Actividad de *NLP6* primordios nodulares. **E.** Expresión de *NLP6* a los 15 dpi en nódulos jóvenes. **F.** Expresión de *NLP6* en nódulos maduros a los 21 dpi. **Ny:** nódulo joven. **vn:** vasculatura de nódulo. **Nm:** nódulo maduro. **vr:** vasculatura radical. **dpi:** días post inoculación.

- **En etapas intermedias (15 dpi)**, es decir en nódulos jóvenes la expresión de *NLP4* se mostró de manera uniforme en la tinción magenta bajo el análisis GUS. Estos resultados sugieren que *NLP4* es más específico en la etapa temprana de nodulación que *NLP6*. A diferencia de *NLP6*, el promotor *NLP4* muestra una mayor expresión en la formación de primordios nodulares y nódulos jóvenes (Figura 16 E).

- **En etapas tardías (21 dpi)**: El promotor *NLP4* muestra expresión en nódulos maduros bajo análisis GUS de manera uniforme y general. De manera general, el fenotipo de ambos promotores se presenta de manera igual en tamaño y crecimiento de los nódulos. Sin embargo la expresión de *NLP6* es más intensa durante las etapas de nódulos maduros (Figura 16 F).

De manera general, los resultados muestran la influencia de *NLP4* y *NLP6* en el desarrollo del proceso de la nodulación de *P. vulgaris*. Así como, la expresión y la interacción de la actividad de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* en el crecimiento nodular durante las diferentes etapas después de la inoculación con *R. tropici* silvestre (15 y 21 dpi: días después de la inoculación).

Dichos resultados, sugieren que existe una fuerte correlación entre la vía simbiótica con *R. tropici* silvestre y la función de ambos promotores durante las etapas de nodulación (Figura 16). Sin embargo las diferencias entre la expresión de ambos promotores indican interacciones diferentes involucradas en la vía autorregulación de la nodulación.

7.17. Análisis de la expresión de GUS en secciones transversales de nódulos *pNLP4* y *pNLP6* en *P. vulgaris*

Para estudiar la actividad de los promotores *NLP4* y *NLP6* dentro de los nódulos, se realizaron cortes transversales en capas delgadas con una navaja. Los nódulos en etapas maduras a los 21 días después de inoculación se observaron bajo el microscopio. Posterior al análisis y toma de fotografías para documentación, las muestras de raíces y nódulos fueron guardadas con glicerol estéril al 40 % para su conservación. Los resultados muestran diferencias visibles entre la actividad de cada promotor durante la nodulación. Las principales diferencias se muestran a continuación.

7.18. Expresión mediada por el promotor *NLP4* en cortes transversales nodulares

- **En nódulos en etapa temprana**, a los 7 dpi se observó la expresión del promotor *NLP4* en las zonas en coloración rosa que muestran las células infectadas que contienen los simbiosoma a los 7 y 15 días después de la infección con *R. tropici* (Figura 17 A).
- En nódulos jóvenes, a los 15 dpi *NLP4* se expresa en la vasculatura del nódulo y no en la zona central. Indicando una expresión contraria el promotor *NLP6*. (Figura 17 B).
- **En nódulos maduros**, a los 21 dpi el promotor *NLP4* muestra la expresión de forma totalmente contraria a *NLP6*. Bajo el análisis GUS a través de la tinción magenta, la expresión de *NLP4* se muestra solo en la periferia del nódulo y no en el centro como *NLP6*. El análisis muestra que el promotor *NLP4* se encuentra activo en nódulos maduros (Figura 17 C).

- Sin embargo su expresión fue más específica en etapas tempranas de la nodulación y no en etapas de maduración. Se observó la expresión del promotor *NLP4* en la periferia del nódulo y no en la parte central como *NLP6*.
- Así mismo, la actividad de *NLP4* se observó mayormente en la membrana plasmática de las células infectadas y no en el citoplasma como en el caso del promotor *NLP6*. Dichos resultados sugieren que el promotor *NLP4* presenta mayor expresión en el inicio de la infección así como la formación de primordios nodulares y no tanto en etapas tardías. En cambio el promotor *NLP6* intensifica su expresión en los nódulos maduros a los 21 dpi.

7.19. Expresión del promotor *NLP6* en cortes transversales nodulares

- **En nódulos en edad temprana**, a los 7 dpi se observó que la expresión de *NLP6* se concentra en la zona central del nódulo. Se observó la actividad del promotor en el nódulo joven mediante la tinción magenta del análisis GUS (Figura 17 D). En nódulos jóvenes, a los 15 dpi *NLP6* se expresó en el córtex del nódulo, señalando las células que contienen simbiosomas bajo el análisis GUS (Figura 17 E). Se observó que la actividad de *NLP6* potenció especialmente en el centro del nódulo.
- **En nódulos maduros**, a los 21 dpi. sugiriendo que los nódulos se encontraban activos en dicho periodo. Los cortes transversales muestran una fuerte expresión en las células infectadas con *R. tropici*. El promotor *NLP6* se expresa principalmente en el citoplasma de las células infectadas que contienen los simbiosomas. Así mismo la expresión de *NLP6* se intensifica en el centro del nódulo, así como la vasculatura y en la zona del nódulo (Figura 16 C).

Tales resultados en los nódulos indican que las plantas transformadas con el promotor *NLP6* llevaron a cabo el proceso de la fijación de nitrógeno en nódulos de etapa madura. Esto debido a posibles condiciones de estrés. La expresión se muestra principalmente en la observación de los patrones de la tinción GUS en un corte transversal del nódulo ya maduro (Figura 17 F).

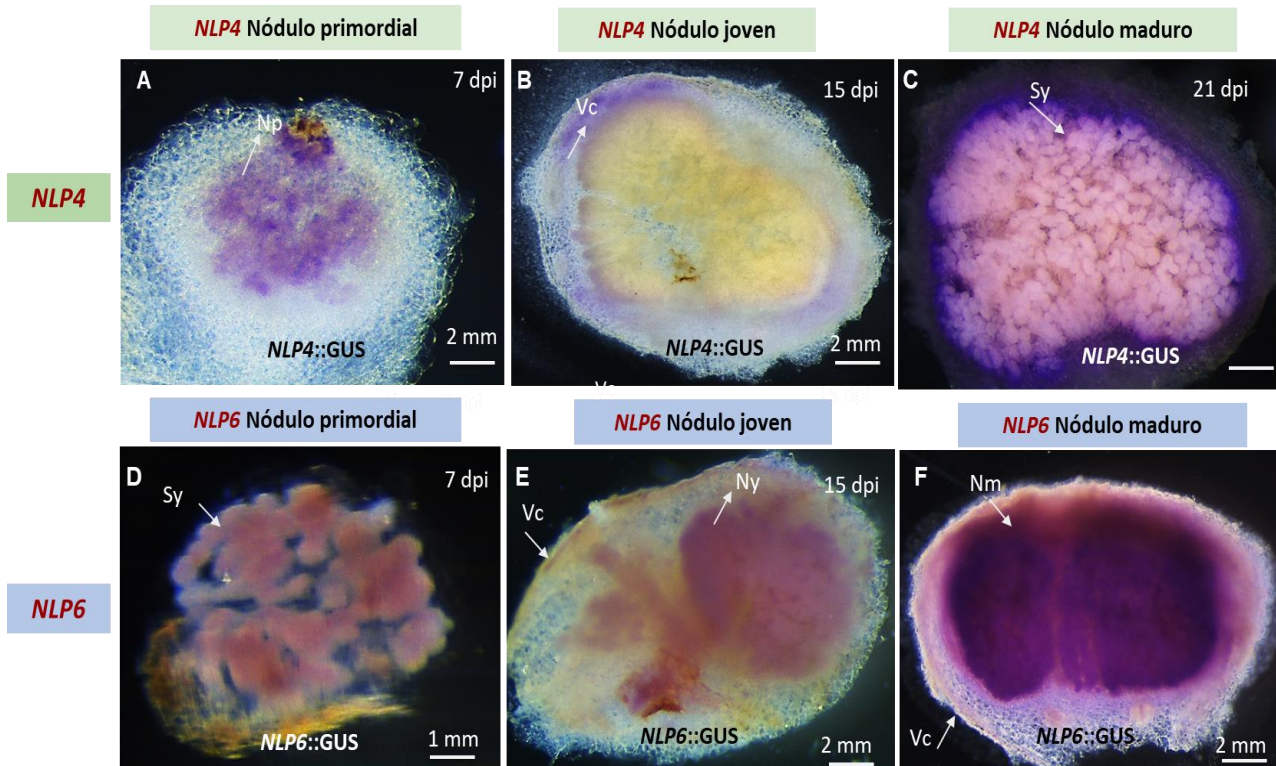


Figura 17. Etapas del desarrollo de la nodulación de *pNLP4* y *pNLP6* en cortes transversales bajo análisis GUS. A. Expresión de la actividad de *NLP4* en cortes transversales de nódulos a los 7 dpi. **B.** Expresión de la actividad de *NLP4::GUS* en fase intermedia a los 15 dpi. No se muestra formación de la vasculatura. **C.** Secciones de cortes transversales de los nódulos *NLP4::GUS* presentando una expresión específica en el centro del nódulo. **D.** Expresión de la actividad de *NLP6* en donde se observa en etapa un poco más tardía y con menor especificidad que *NLP4*. **E.** Expresión de *NLP6::GUS* que muestra las células infectadas que contienen los simbiosomas a los 15 dpi. No se aprecia formación de la vasculatura del nódulo. **F.** Expresión de la actividad de *NLP6::GUS* en la vasculatura del nódulo y no en el centro, de forma contraria a *NLP4* a los 21 días después de la inoculación. **A y D.** Expresión de *NLP4* y *NLP6* a los 7 dpi. **C y F.** Nódulos maduros *NLP4* y *NLP6* a los 21 dpi. **E y F.** Expresión de *NLP4* y *NLP6* a los 15 dpi. **Vc:** Nódulo vascular, **Nm:** Nódulo maduro, **Sy:** simbiosoma, **dpi:** días después de la inoculación.

7.20. Expresión de *pNLP6* y *pNLP4* en la actividad de nódulos maduros

Se realizó la comparación entre la expresión que presentaban los promotores *NLP4* y *NLP6* en cortes transversales de nódulos en etapa intermedia (15 dpi) y en etapa madura (21 dpi). Esto se realizó sometiendo los nódulos de ambos promotores bajo análisis histoquímico con GUS, con el objetivo de analizar los cambios en los nódulos durante el proceso tardío de nodulación. Los cortes transversales muestran un indicativo de la actividad de cada promotor durante el proceso de nodulación y en qué partes se encuentra activa la fijación de nitrógeno. Los resultados fueron los siguientes:

7.21. Expresión del promotor *pNLP6*

▪ Nódulos en edad temprana: primordios y nódulos jóvenes (7-15 dpi)

Se observó la actividad del promotor *NLP6* en la zona central del nódulo, en la cual se muestra una gran colonización de bacteroides a los 15 dpi. Así mismo, *NLP6* muestra una mayor liberación en la cantidad de bacterias que el promotor *NLP4* (Figura 17 A-E). No se muestran cambios significativos en los días de comienzo de la infección ni en la variación del tiempo respecto al inicio de la nodulación. En esta etapa se muestra el proceso de diferenciación de la bacteria y a través de la tinción GUS los bacteroides infectados en el centro y periferia del nódulo. Se observa la actividad del promotor *NLP6* en el córtex y en la vasculatura del nódulo joven (Figura D).

▪ Nódulos en etapa madura y periodo de senescencia (21 dpi)

La actividad del promotor *NLP6* se muestra en la expresión de nódulos radiculares activos y de forma generalizada durante todo el proceso de nodulación en la simbiosis. El desarrollo completo de la vasculatura indica

una etapa apropiada de la maduración del nódulo que incluye el periodo apto para la fijación del nitrógeno. El promotor *NLP6* muestra actividad en el citoplasma de las células infectadas que contienen los simbiosomas. Por lo que, *NLP6* se expresa en el centro del nódulo a los 21 dpi confirma que los nódulos se encontraban activos en dicho periodo (21 dpi). Tales resultados indican que los nódulos *NLP6* se encontraban en actividad de fijación del nitrógeno atmosférico por un periodo de tiempo determinado (Figura 17 G,H). Sin embargo, ambos nódulos de *NLP4* y *NLP6* muestran actividad previa a la senescencia. La senescencia nodular es un conjunto de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y estructurales que son inducidas por envejecimiento natural, o bien, cuando las plantas son sometidas a estrés. Los nódulos de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* fueron determinados en su mayoría.

7.22. Expresión del promotor *pNLP4*

- **En nódulos en edad temprana: primordios y nódulos jóvenes (7-15 dpi)**

Se observó la expresión del promotor *NLP4* en las zonas centrales en donde la coloración rosa mostrada por la tinción GUS muestra la formación de manera gradual las células infectadas que contienen los simbiosomas (Figura 18 A-B). Las imágenes confocales de la sección del nódulo *NLP4* muestran una colonización densa del nódulo.

- **En nódulos en etapa madura y periodo de senescencia (21 dpi)**

El promotor *NLP4* muestra a través de la tinción GUS la expresión en el centro del nódulo, lo cual confirma la actividad de la fijación del nitrógeno. El análisis muestra que los nódulos *NLP4* expresan actividad en la membrana plasmática de las células infectadas al contrario de *NLP6* que presenta en el citoplasma.

En las primeras etapas se muestra la parte central del nódulo *NLP4* en color magenta, sin embargo con el paso de los días de actividad, se observa un cambio de coloración. El cual pasa a ser más oscuro a medida que avanza la edad del nódulo, lo que es un indicativo de la actividad que muestra *NLP4* en la fijación del nitrógeno en la planta. El color rosado (debido a la presencia de la leghemoglobina) pasa a color oscuro debido a la alteración que sufre esta proteína (Figura 18 A,B).

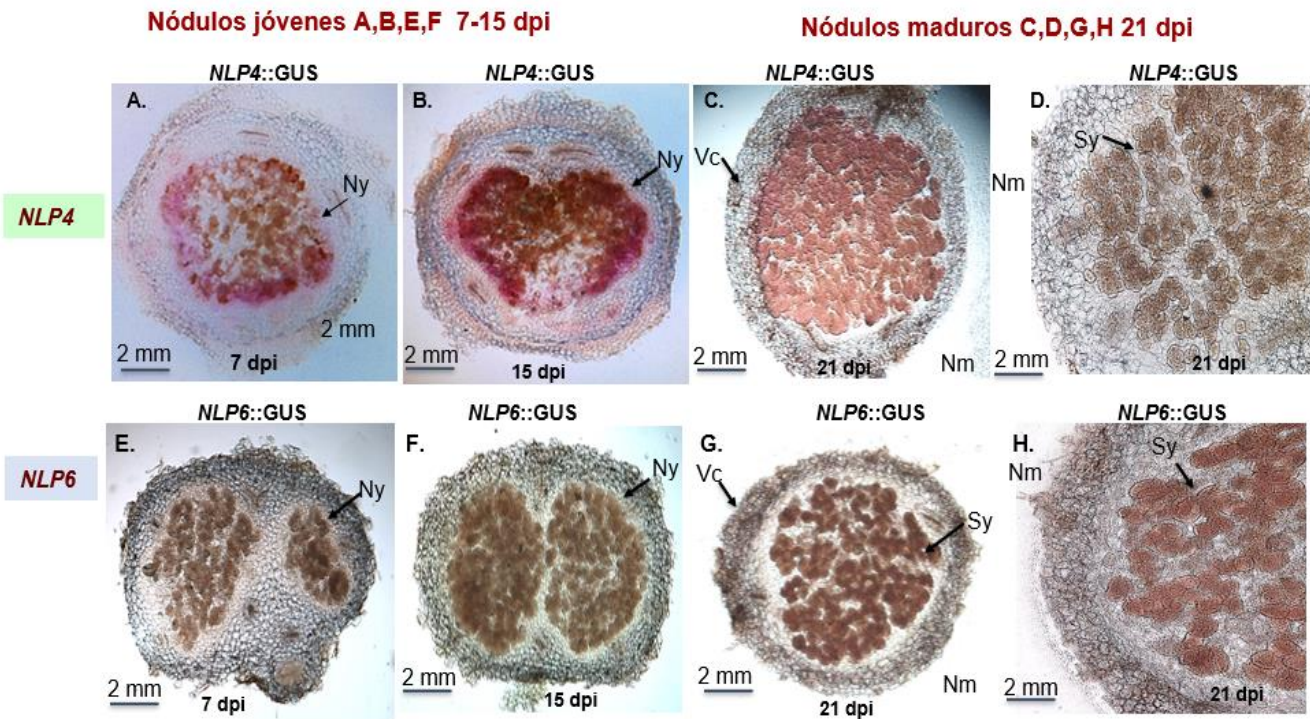


Figura 18. Análisis de la expresión de *pNLP4* y *pNLP6* en nódulos maduros con *R. tropici*. Etapas del desarrollo de la nodulación en cortes transversales de *NLP4* y *NLP6* mediante el análisis histoquímico GUS. **A y B.** Secciones de nódulos *NLP4::GUS* en etapa joven (15 dpi) expresado específicamente en el centro las células infectadas que contienen los simbiosomas. **C y D.** Nódulos *NLP4::GUS* en fase madura (21 dpi). **E y F.** Nódulos maduros *NLP6::GUS* a los 15 dpi. **G y H.** Expresión de *NLP4::GUS* en nódulos maduros a los 21 dpi. La tinción en el centro del corte transversal muestra una actividad indicativa de la fijación de nitrógeno debido a la oxidación de la leghemoglobina. **C,D,G,H:** Cortes transversales de las secciones de nódulos jóvenes (15 dpi) y nódulos maduros (21 dpi). **Vc:** Nódulo vascular, **Nm:** Nódulo maduro, **Sy:** simbiosoma.

De manera general, se observó que el promotor *NLP4* se encuentra activo en nódulos maduros, sin embargo su expresión es menos intensa a comparación del promotor *NLP6*. El promotor *NLP4* se muestra en la membrana plasmática de las células infectadas. Así mismo, los nódulos están formados por células infectadas por *Rhizobium* que adquieren gran tamaño y por células más pequeñas, no infectadas, que son ricas en peroxisomas (Figura 17 y 18).

Estos últimos son relevantes en la producción de los compuestos ureidos derivados de la urea, los cuales se extraen a partir del nitrógeno molecular recién fijado por las células infectadas (Figura 18 C,D,G,H). Los nódulos presentan una zona meristemática que agrega nuevas células permitiendo al nódulo crecer y fijar nitrógeno indefinidamente. Los nódulos jóvenes están invadidos por 1-5 trazas xilemáticas derivadas de la estela de la raíz. Cerca de la periferia del nódulo se forma una endodermis del nódulo, conectada con la endodermis de la raíz (Figura 18 A,B,E,F).

7.23. Variaciones en los patrones de expresión de *pNLP6* y *pNLP4* en nódulos activos

No se identificó variación en su desarrollo nodular y los patrones de expresión de ambos genes *NLP4* y *NLP6* ya que fueron similares durante las etapas jóvenes e intermedias a los 7 y 15 dpi después en el inicio de la nodulación. Sin embargo en etapas maduras a los 21 dpi aunque ambos promotores presentaban actividad de la fijación del nitrógeno, los resultados indican que los patrones de expresión son diferentes (Figura 16).

La morfología de los nódulos de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* fue de apariencia normal en cuanto a tamaño, formación y coloración. En los fenotipos de las plantas y de los nódulos de ambos promotores no hubo diferencias significativas. Durante todo el proceso de nodulación se realizó el seguimiento bajo las mismas condiciones ambientales para ambos promotores. Se concluyó de manera general que su funcionalidad específica puede diferir en la expresión

de cada uno de los promotores de manera aislada. Sin embargo, que la expresión sea diferente no afecta al fenotipo ni morfología visible en la planta.

8. Discusión

En el presente trabajo se estudiaron y analizaron los patrones de la expresión espacio temporal de los promotores *NLP4* y *NLP6* en *P. vulgaris* durante las interacciones simbióticas de la nodulación. Los resultados sugieren que dichos factores de transcripción de la familia *NLPs* muestran un papel contrario en las diferentes etapas de la nodulación de acuerdo a la hipótesis planteada. Las principales diferencias se muestran específicamente en el inicio de la infección con *R. tropici* silvestre. De manera general, el análisis del promotor realizado en la presente investigación, mostró que los genes *NLP6* y *NLP4* juegan un papel clave en el proceso de nodulación durante la simbiosis rizobial. Nuestros resultados concuerdan con dichos tales afirmaciones de acuerdo con otros reportes sobre la función de los *NLPs* en otras especies de leguminosas como *M. truncatula*, *L. japonicus* (Nishida, *et al.*, 2018).

De los miembros de la familia *NLPs* los más estudiados han sido *NLP1* y *NLP7*, sin embargo aún es limitada la información sobre los promotores de esta investigación. En base a las observaciones obtenidas en ambos análisis de *NLP4* y *NLP6*, se sugiere que ambos promotores controlan la simbiosis de los nódulos de la raíz a través de la regulación de nitratos. Así como la Inducción y represión de la expresión génica en las diferentes etapas del proceso de nodulación (Nishida, *et al.*, 2021).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, en los cortes transversales de nódulos en etapa intermedia y madura, se sugiere que los nódulos se encontraban activos llevando a cabo la activación de la fijación de nitrógeno. Así mismo, se considera que su actividad fijadora se produjo debido

a posibles condiciones de estrés, lo que le indicaría a la planta llevar a cabo la regulación de la nitrato reductasa como lo indica (Lin *et al.*, 2018).

Las principales diferencias entre la expresión de los promotores *NLP4* y *NLP6* por etapas se muestran a continuación:

8.1. Patrones de expresión espacio temporal del promotor *NLP6*:

- **Sin inoculación (sin *R. tropici*):** La actividad del promotor *NLP6* se expresa solamente en zona meristemática, es decir en las puntas de las raíces principales transgénicas de *P. vulgaris*.

- **Inoculación con *R. tropici*:** La actividad del promotor *NLP6* se expresa fuertemente en la zona de elongación de raíz. La expresión en estas zonas indica la próxima formación de los primordios nodulares.

- **En el proceso de infección:** El promotor *NLP6* se expresa de manera general y no específica durante el inicio de la infección con *R. tropici* silvestre. La actividad de *NLP6* se muestra fuertemente alrededor de los hilos de infección y puntos de infección (3 dpi). Así mismo, se observó que *NLP6*, induce la división de células corticales durante el proceso de infección (5 dpi). La diferenciación de células posteriormente iniciará la formación de primordios nodulares.

- **Durante la nodulación:** Se observó que la expresión del promotor *NLP6* se expresa durante todo el proceso de la nodulación y de manera general durante nódulos jóvenes e intermedios. En nódulos maduros, el promotor *NLP6* muestra una fuerte expresión en el citoplasma de las células infectadas que contienen a los simbiosomas. El promotor *NLP6* se expresa principalmente en la zona central, en el núcleo y vasculatura del nódulo maduro (21 dpi).

- Lo cual indica la presencia de *NLP6* y que los nódulos se encuentran activos produciendo la fijación de nitrógeno.

8.2. Patrones de expresión espacio temporal del promotor *NLP4*

- **Sin inoculación (sin *R. tropici*):** La actividad del promotor *NLP4* se muestra solamente en la vasculatura de la raíz principal transgénica (hairy root) y no en el tejido meristemático (puntas de la raíz) a diferencia del promotor *NLP6*.
- **Inoculación con *R. tropici*:** La actividad del promotor *NLP4* se expresa fuertemente y cambia a la zona de elongación de la raíz principal tras la infección con *R. tropici* silvestre. La expresión del promotor *NLP4* es mucho más específica durante las condiciones de simbiosis con *R. tropici* silvestre.
- **En el proceso de infección:** El promotor *NLP4* muestra expresión más específica solo en el desarrollo y progresión de los hilos de infección. En este contexto, el promotor *NLP4* se expresa fuertemente durante las etapas tempranas del inicio del proceso de la infección con *R. tropici*, así como la formación de puntos de infección (3 dpi). De igual manera, el promotor *NLP4* induce la división de células corticales a los pocos días de inoculación (5 dpi).
- **Durante la nodulación:** El promotor *NLP4* muestra actividad más específica en primordios nodulares así como nódulos jóvenes. Se observó que el promotor *NLP4* se expresa principalmente en la membrana plasmática de las células infectadas que contienen a los simbiosomas.
- La expresión del promotor *NLP4* se observó en la periferia del nódulo maduro (21 dpi) y no en la parte central a diferencia del promotor *NLP6*. Debido a ello, se sugiere que *NLP4* tiene un papel clave en el desarrollo temprano del proceso de la nodulación y en el inicio de la infección con *R. tropici*.

8.3. Expresión de *pNLP4* y *pNLP6* en nódulos activos en la simbiosis con *R. tropici*

Se ha descrito en la literatura, que en otras especies como *L. japonicus* el promotor *NLP4* desempeña un papel en el control de la modulación inducida por nitratos y actúa como principal regulador de la expresión génica dependiente de nitrato (Nishida *et al.*, 2021). Estos resultados corresponden con el papel que muestra a expresión del promotor *NLP4* al inducir de manera más específica el proceso de infección, así como las etapas tempranas de la nodulación. Así mismo, se ha identificado a través de un análisis del transcriptoma con la purificación por afinidad del ADN que el promotor *NLP4* es parálogo a los genes *NIN*, ya que presentan una unión en los elementos *cis* de *NLP4* que se asemejan a los de *NIN*. Se ha encontrado que la dimerización entre la relación *NLP4* y *NIN* está mediada por *NLP4* en la leguminosa *Lotus japonicus*. Esto muestra una regulación transcripcional bifuncional (Mu & Luo, 2019). Dichos datos proporcionan información sobre el control de la nodulación y el papel de *NLP4* en el funcionamiento del nitrato. Se sugiere que durante la simbiosis de *R. tropici* con *P. vulgaris* se mantiene una regulación génica simbiótica positiva y negativa en la cual el promotor *NLP4* presenta un papel clave en el comienzo de la infección (Nishida *et al.*, 2018).

Así mismo, investigaciones por (Vuong, 2013) han demostrado que el promotor *NLP4* presenta un control pleiotrópico del nódulo de la raíz, debido a la cascada de señalización que combina los factores *NIN-CLE (CLAVATA3/ESR)* que actúan como señales derivadas de la raíz en un mecanismo de autorregulación de la nodulación, el cual está conservado en *M. truncatula* (Laffont *et al.*, 2020). De esta manera, estudios demuestran que en *Lotus japonicus* *NLP4* regula el proceso de iniciación del nódulo induciendo directamente la expresión del mecanismo CLE-RS2. En este contexto, nuestros resultados obtenidos de los patrones de expresión espacio-temporal por GUS concuerdan con la información de (Nishida *et al.*, 2021) en la que se menciona que *NLP4* induce la

infección por rizobios y debido a ellos, dicho gen podría estar encargado en la regulación de otros genes aguas abajo de *CLE-RS2* que controlan procesos involucrados en la simbiosis. De esta manera, los patrones de expresión espacial-temporal concuerdan con lo predicho con los análisis previos por (Nishida *et al.*, 2021), donde se analizó que de los 364 genes, más de la mitad genes dependían del promotor *NLP4* en conjunto con *NLP1* (Vuong, 2013).

Varios estudios señalan que en *Nicotiana benthamiana*. de igual manera el promotor *NLP6* se une a *cis*-elementos activos del gen de la nitrato reductasa *NIA1* y activa la expresión génica dependiente de nitrato. El sitio de unión de *NLP6* corresponde a un potencial motivo regulatorio (Konishi & Yanagisawa, 2011). Asimismo, se encontró (Schauser *et al.*, 2005) que *NLP6* proviene de un evento de duplicación con *NLP3* y *NLP7*. Dicho evento da lugar a la justificación de que dichas funciones regulatorias tomen diferente expresión durante la nodulación de *P. vulgaris*. Se ha reportado que el promotor *NLP6* tiene un papel clave en el crecimiento y desarrollo de los nódulos. Lo cual concuerda con nuestros resultados, a que la expresión de la actividad de *NLP6* fue de forma más general durante todo el proceso de nodulación que *NLP4* (Konishi & Yanagisawa, 2013).

Nuestros resultados indican que la presencia de la expresión del promotor *NLP6* fue en su mayoría de forma contraria a *NLP4*, tanto en nodulación intermedia y tardía. Lo que podría ser un indicativo de que la regulación en la expresiones independiente a pesar de estar implicados en la misma funcionalidad de la señalización temprana. En base a los resultados obtenidos (Figura 16 y 17). Se sugiere, que el promotor *NLP6* tiene un papel clave durante toda la nodulación así como actividad en el metabolismo del nódulo y en el transporte del nitrógeno (Vuong, 2013).

8.4. Expresión *pNLP4* y *pNLP6* antes y después de la inoculación

En cuanto al índice de eficiencia de la generación de raíces pilosas por parte de ambos promotores *NLP4* y *NLP6*, se generó de manera exitosa el crecimiento lateral de las raíces, así como longitud y la densidad de las raíces pilosas (hairy roots), las cuales aumentaron probablemente a las concentraciones de nitrato disponible. Esto concuerda con los resultados presentados en (Shenk *et al.*, 2020), en donde las respuestas morfológicas de la rizobiasis dependen de las vías de señalización de nutrientes que están vinculadas evolutivamente a las distribuciones de nitratos y otros nutrientes en el suelo.

▪ Sin inoculación con *R. tropici* silvestre

De manera general, los resultados obtenidos en la expresión de ambos promotores antes del proceso de inoculación con *R. tropici* silvestre muestran patrones de expresión de manera contraria entre el promotor *NLP4* y el *NLP6* (Figura 13,16,17). Esto concuerda con los resultados obtenidos sobre que el promotor *NLP6* intensifica su expresión de manera general y durante las zonas meristemáticas (puntas de la raíz) debido a su modo de regulación génica (Figura 12). En cambio la expresión del promotor *NLP4* se presentó en la zona de elongación de la raíz y su expresión fue más específica después de la inoculación (Figura 13). Lo cual nos da una perspectiva que coincide con la relación sinérgica entre la expresión y funcionalidad de cada uno de los promotores (Nishida *et al.*, 2021).

▪ Inoculación con *R. tropici* silvestre

Durante dichas fases de experimentación (antes y después de la inoculación con *R. tropici* silvestre), la presencia de *NLP4* y *NLP6* en las zonas vasculares y meristemáticas en las raíces transgénicas confirman la bifuncionalidad independiente entre ambos promotores (Figura 12 y 13). En el análisis de esta investigación, la generalidad de la expresión de *NLP6* después de la inoculación

muestra el cambio de actividad en la zona de elongación donde se formaran los primordios nodulares (Figura 13). En cambio en la expresión de las raíces inoculadas con *NLP4*, la zona de elongación cambio sin embargo de manera gradual. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con la información reportada sobre la funcionalidad directa de *NLP6* al mostrar su expresión de forma general en etapas tempranas de la nodulación (Nishida *et al.*, 2021).

8.5. *NLP4* y *NLP6* como inductores en el inicio de la nodulación con *R. tropici* silvestre

Los resultados encontrados durante las etapas del inicio de la infección sugieren que *NLP4* y *NLP6* inducen la actividad de diferenciación celular en las raíces solo bajo las condiciones de simbiosis con *R. tropici*. Así mismo, los resultados en las primeras etapas de infección muestran que *NLP4* tiene actividad específica en los hilos y puntos de infección. A comparación del promotor *NLP6* que mostró expresión de manera general durante todas las etapas del inicio de la infección (Figura 14 y 15). La expresión específica del promotor *NLP4* se ha relacionado con el papel en la señalización temprana en los pelos radiculares de la raíz (Castaings *et al.*, 2009).

Asi mismo, nuestras observaciones concuerdan con que el promotor *NLP4* está involucrado en el control inducido por nitrato teniendo principal expresión en actividad de la raíz, hilo de infección y crecimiento de nódulos primordiales (Figura 14 D-F) (Nishida *et al.*, 2018). Nuestros hallazgos reportan que *NLP4* y *NLP6* inducen la división de las células corticales y ambos actúan de manera coordinada en las vías de señalización para el aumento de citoquininas correspondiente a la formación del primordio nodular (Figura 14 C y F). En estudios anteriores, se ha propuesto que esta actividad pudiera estar regulada por la familia NIN, de la cual se derivan los factores de transcripción *NLPs*.

Dichos estudios reportan la asociación de división en las células corticales debido a la simbiosis con el género *Rhizobium* (Wang *et al.*, 2020).

Los hallazgos presentes en esta investigación concluyen que la actividad del promotor *NLP4* induce a los rizobios induce un proceso de infección exitoso y con mayor rapidez de la nodulación (Figura 14 A-C). De manera general, se sugiere que el promotor *NLP6* presenta una alta expresión durante la vía simbiótica durante nódulos maduros (Figura 17) interactúan con otros receptores a nivel celular controlando la cascada de señalización para la inducción para la división y alargamiento celular inducida por rizobios (Bu *et al.*, 2020).

8.6. Expresión del promotor *NLP4* y *NLP6* en el proceso tardío de la nodulación

Los nódulos maduros de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* presentan una región central con células infectadas, invadidas por bacteroides de *R. tropici* (Figura 18). Sin embargo, en los nódulos maduros del promotor *NLP6* la expresión espacio temporal se muestra en el centro del nódulo y en el citoplasma de las células infectadas que contienen a los simbiosomas. La expresión de *NLP6* se intensifica en el citoplasma de las células infectadas y en la vasculatura del nódulo (Figura 17 E y F). Estos resultados se relacionan con la forma en la que se lleva a cabo la regulación del promotor *NLP6*, ya que estudios reportan que dicho promotor está más implicado en los procesos de crecimiento y desarrollo de los nódulos que en la inducción de las etapas tempranas de la nodulación (Nishida *et al.*, 2021).

Así mismo, se ha identificado que *NLP6* muestra estructuras representantes de las proteínas NIN (Nodule Inception factor) y RKD de donde proviene la familia de los genes *NLPs*. Dichas estructuras presentan un dominio PB1 rico en glutamina (Q) y una proteína NIT2 rica en aspartato que funciona como un dominio de transactivación los cuales influyen en la actividad de la nitrato-

reductasa y por tanto presentaran mayor expresión en los nódulos activos especialmente en la zona central (Konishi & Yanagisawa, 2014).

Debido a que nuestros hallazgos en esta investigación revelaron que la expresión de *NLP6* se da de manera general durante todo el proceso de nodulación, se sugiere que *NLP6* no tiene una función aislada. Sino que el promotor *NLP6* está implicado en regular las interacciones de otros genes involucrados en la simbiosis. En el promotor *NLP6* la expresión en el citoplasma de las células infectadas se muestra de manera más intensa y general en las etapas intermedias y tardías de nódulos maduros (Figura 17 F).

En cambio el promotor *NLP4* se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas (Figura 17 D). Por lo cual el papel de *NLP4* es más específico en etapas tempranas especialmente en nódulos primordiales y jóvenes y no en etapas tardías de la nodulación fijadora (Figura 17 y 18). Dicha actividad de las funciones del promotor coincide con lo que menciona (Soyano *et al.*, 2013) sobre la influencia de *NLP4* al inducir la organogénesis del nódulo. Se ha reportado que el promotor *NLP6* es responsable de activar transcripcionalmente la señalización de otros genes que actúan río abajo durante la simbiosis, a través de la infección con *R. tropici* silvestre (Yanagisawa, 2014).

8.7. Análisis del promotor *NLP4* y *NLP6* en el transporte de nitrógeno

Como se ha descrito anteriormente, los resultados de la caracterización de ambos promotores se han analizado bajo la endosimbiosis leguminosa-*Rhizobium*. En base a esto, se concluye que los procesos de señalización de rizobios están regidos por el promotor *NLP4* como papel clave en el progreso del hilo de infección (Figura 14 D).

Lo cual concuerda con que el promotor *NLP4* está estrechamente ligado con modular la señalización simbiótica para que ocurra la infección a través de los sitios de unión de *NIN* (Lin *et al.*, 2021) menciona que la expresión de los

factores de transcripción *NLP4* y *NLP6* son necesarios para la simbiosis entre las leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno. Los hallazgos en este trabajo, muestran que ambos promotores están involucrados en las vías de señalización y respuesta de nitrato. Dichos eventos son importantes para que exista un equilibrio en la fijación de nitrógeno (Nishida *et al.*, 2018).

Otros estudios sugieren que los *NLPs* actúan como codificadores en conjunto con otros genes como los *LBD* (Dominio de los órganos laterales) implicados en la expresión de genes detectores de nitrato (Rubin *et al.*, 2009). Si bien se han identificado cada vez más factores involucrados en la respuesta y señalización de nitrato, aún no se ha determinado el factor clave en la regulación de dicho proceso. Los resultados aquí obtenidos concuerdan de manera satisfactoria con lo mencionado por la literatura (Nishida *et al.*, 2018). Ya que se ha descrito que los *NLPs* son proteínas de unión a los elemento *cis* sensible al nitrato (NRE) activadas por transcripción que convierten las señales de nitrato en eventos reguladores de la transcripción y actúan sobre la expresión regulada por nitrato de otros genes involucrados (Roy *et al.*, 2020).

Esta reacción se ha observado también en *Arabidopsis*, *L. japonicus* y *M. truncantula*, debido a que el elemento de respuesta al nitrato *cis* (NRE) se conserva en las secuencias promotoras de los genes *NLPs* de algunas plantas superiores (Wu *et al.*, 2020). Los *NLPs* actúan como proteínas de unión a NRE con funciones de activación transcripcional que convierten la señalización de nitrato en eventos transcripcionales reguladores y que actúan sobre la expresión regulada por nitrato de muchos genes en las leguminosas (Jiang *et al.*, 2021). Cierta literatura señala que estos procesos pueden estar relacionados por los factores de transcripción *NLP4* y *NLP6* debido a que responden principalmente para la transmisión de señales de nitrato (Jagadhesan *et al.*, 2020).

De esta manera *NLP4* y *NLP6* tienen la capacidad de inducir la respuesta a nitratos y por tanto ejerce un papel importante en cómo se desarrolla la

nodulación. Por tanto, los resultados mostrados en esta investigación concuerdan de manera favorable, por lo que se sugiere que ambos promotores *NLP4* y *NLP6* tienen una función crucial relevante en la nodulación de *P. vulgaris* durante la vía simbiótica con *R. tropici* silvestre (Nishida *et al.*, 2018).

9. Conclusiones

Se realizó el aislamiento y transformación de ambos promotores *NLP4* y *NLP6* de manera exitosa generando plantas compuestas induciendo la generación de raíces pilosas (hairy roots) con un índice del 95 % de eficiencia. De acuerdo a lo planteado en la hipótesis, se observó que de manera general que los patrones de expresión espacio temporal del promotor *NLP4* y *NLP6* son de forma contraria antes y después de la inoculación con *R. tropici* silvestre. Así como en la mayoría de las etapas del proceso de nodulación. Durante este estudio, se observó la expresión espacio temporal del promotor *NLP6*, la cual se muestra de manera general durante todo el proceso y desarrollo de la nodulación con *R. tropici*. Especialmente en los nódulos maduros.

En cambio, la actividad del promotor *NLP4* presenta expresión más específica en etapas temprana como el inicio y progresión de los hilos de infección. Así como, la formación de primordios nodulares, nódulos jóvenes y el desarrollo temprano de la nodulación . . Así mismo, se estudió la caracterización de la expresión espacial y temporal de los promotores *NLP4* y *NLP6*, infiriendo que ambos genes son clave en la regulación de la nodulación bajo condiciones de simbiosis. Finalmente, como conclusión general los promotores *NLP4* y *NLP6* podrían ser genes clave en el proceso de simbiosis rizobial en la nodulación de *P. vulgaris*.

9.1. Perspectivas a futuro

Una vez completado el análisis de la expresión espacial y temporal de la actividad de ambos promotores *NLP4* y *NLP6*, se propone realizar estudios de silenciamiento para observar cómo se vería afectado el proceso de nodulación en la vía simbiótica con *R. tropici*. Dichas investigaciones pretenden ampliar el rango de conocimiento sobre la interacción de ambos genes en el desarrollo de la nodulación de *P. vulgaris*.

Debido a los análisis obtenidos, se corrobora que ambos promotores están involucrados en la inducción de la señalización temprana durante la formación de nódulos. Por lo cual, realizar una comparación del silenciamiento de ambos promotores ayuda a obtener información más específica sobre su funcionalidad directa. Es decir, saber si los promotores *NLP4* y *NLP6* funcionan de manera aislada y/o conjunta aporta información de gran importancia. Estos análisis, ayudan a entender cómo se involucran estos promotores en la ruta simbiótica de *P. vulgaris* y otras leguminosas.

Se requieren más estudios para la observación y seguimiento de la dependencia de cada uno de los promotores *NLP4* y *NLP6* con otros genes implicados en las vías de señalización durante el proceso de nodulación. Sería conveniente analizar los patrones de expresión y observar los efectos que tiene sobre las diferentes etapas de la formación de nódulos durante las condiciones simbióticas. Actualmente se está trabajando en ello y se plantea obtener análisis más detallado sobre la potencialidad en general de ambos genes.

10. Productos generados

Los resultados parciales de este trabajo de investigación se han mostrado a la comunidad a través de la participación en dos congresos nacionales y uno internacional. En un futuro se pretende realizar el proceso de escritura para la publicación de artículo en una revista científica de alto impacto.

10.1. Artículos

Se pretende la publicación de un artículo que se encuentra en preparación.

10.2. Congresos

Participación en el congreso Internacional: XVI Latin American International Conference on Natural and applied science-II Bogotá, Colombia.

- Kalpana Nanjareddy, Manoj-Kumar Arthikala, Brenda Flores Moreno (2022). "Caracterización de la expresión espacial y temporal del gen **NLP6** y **NLP4** como nuevos reguladores de la nodulación en *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*". XVI Latin American International Conference on Natural and applied science-II. Bogotá, Colombia 5 - 7 April, 2022.

- **Participación en el 1er Congreso Nacional de Investigación de Posgrado UDLSB (Universidad De La Salle Bajío) León, Gto.**

- Presentación Oral y avances de trabajo de investigación: "Caracterización de la expresión espacial y temporal del gen **NLP6** y **NLP4** como nuevos reguladores de la nodulación en *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*. Congreso Nacional de Investigación de Posgrado UDLSB (Universidad De La Salle Bajío), Campus León, Gto México, 12 y 13 de Agosto, del 2022.

- **Participación como coautora en el Primer congreso Nacional de Ciencias Agropecuarias, recursos naturales y sustentabilidad en la universidad autónoma de Tamaulipas.**

- Presentación en los avances de: **“Protocolo para la generación de plantas compuestas de *Trigonella foenum-graecum* para la caracterización funcional del promotor DR5”** en colaboración con Nataly Palomino, Manoj-Kumar Arthikala, Kalpana Nanjareddy, Lourdes Blanco y Miguel Lara. Modalidad virtual, Cd.Victoria,Tamaulipas, México. Del 31 de agosto al 2 de septiembre del 2022

11. Bibliografía

Aguilar Benítez, Peña valdivia, c. b., Castro rivera, Lara Ávila, j. p., Cruz Crespo & Rojas Velázquez, a. N. (2017). Efecto del vermicompost y estrés hídrico en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): parámetros productivos y relaciones hídricas. CONACYT.

Ávila-Serrano, N. Y., Murillo-Amador, B., Palacios-Espinosa, A., Troyo-Diéguéz, E., García-Hernández, J. L., Larrinaga-Mayoral, J. Á., & Mellado-Bosque, M. (2005). Caracterización y obtención de funciones para producción de biomasa en cinco cultivares de frijol yorimón: I. Método destructivo. Técnica pecuaria en México, 43(3), 449-458.

Ayra, L., Íñiguez, L. P., Ramírez, M., Fuentes, S. I., Leija, A., Salas, M. D. L. P. E., & Hernández, G. (2016) Caracterización funcional de factores de transcripción de frijol en simbiosis con *Rhizobium* (familias AGL, SRS/STY y NF-Ys).

Ballesteros, C. P. S. (1991). Aplicación de la simbiosis microbio-planta (micorrizas y *Rhizobium*-leguminosas) en la revegetación de suelos en zonas áridas (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).

Barbosa Torres, N. C. (2016). Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.). Maestría Ciencias Agrarias.

Berrabah, F., Ratet, P., & Gourion, B. (2019). Legume nodules: massive infection in the absence of defense induction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(1), 35-44.

Bi, Y. M., Wang, R. L., Zhu, T., & Rothstein, S. J. (2007). Global transcription profiling reveals differential responses to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in Arabidopsis. *BMC genomics*, 8(1), 1-17.

Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía costarricense*, 27(1), 19-28.

- Broughton, W. J., & Dilworth, M. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical journal*, 125(4), 1075-1080.
- Bu, F., Rutten, L., Roswanjaya, Y. P., Kulikova, O., Rodriguez-Franco, M., Ott, T., ... & Geurts, R. (2020). Mutant analysis in the nonlegume *Parasponia andersonii* identifies NIN and NF-YA1 transcription factors as a core genetic network in nitrogen-fixing nodule symbioses. *New Phytologist*, 226(2), 541-554.
- Casa Tipán, B. F. (2014). Evaluación de la fijación de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. en invernadero, para arveja (*Pisum sativum*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) y vicia (*Vicia* sp.), Cutuglagua-Pichincha. Tesis de Ingeniero Agrónomo. UCE. Quito: 208 pp.
- Castaigns, L. *et al.* (2009). The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57, 426–435.
- Cervera, M. (2005). Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. In Peña, L. (ed.). *Transgenic Plants: Methods and Protocols in Molecular Biology*. vol 286. Humana Press. pp. 203-213 <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203>
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34(3), 407-415.
- Chaudhary, M. I., Adu-Gyamfi, J. J., Saneoka, H., Nguyen, N. T., Suwa, R., Kanai, S., ... & Fujita, K. (2008). The effect of phosphorus deficiency on nutrient uptake, nitrogen fixation and photosynthetic rate in mashbean, mungbean and soybean. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 537-544.
- Chiu, C. H., & Paszkowski, U. (2020). Receptor-like kinases sustain symbiotic scrutiny. *Plant Physiology*, 182(4), 1597-1612.
- Clúa, J. (2018). Bases moleculares de la interacción simbiótica eficiente entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli* (Tesis doctoral, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular Universidad Nacional de La Plata, Argentina).
- Cornelio Chimborazo, M. M. (2015). Adaptabilidad de cinco variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), en la finca Angamarca la vieja del cantón Pangua, provincia

- de Cotopaxi año 2013 (Tesis de licenciatura en Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador LA MANÁ/UTC/2015). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/3551/1/T-UTC-00828.pdf>
- Crawford, N. M. & Forde, B. G. (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: Somerville C. R., Meyerowitz E. M. (Eds). The Arabidopsis Book 2002;1:e0011.doi: 10.1199/tab.0011. Epub 2002 Mar 27., American Society of Plant Biologists Bethesda.
- Déniz Henríquez, C. (2015). Cloning and structural analysis of the promoter region of cucumber genes encoding Metal Transport Proteins MTP6 and MTP9, Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna, Tenerife
- Duarte Medina, M. (2012). Reproducción de palo fierro (*Olneya tesota* a. gray) e interacción de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el desierto de altar, sonora.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., ... & Sánchez, F. (2006). Agrobacterium rhizogenes transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19(12), 1385-1393.
- Fernández-Luqueño, F., & Espinosa-Victoria, D. (2008). Biochemistry, Physiology and Morphology of Nodule Senescence: a Critical Review. Terra Latinoamericana, 26(2), 133-144.
- FLORES, M. L. (2015). El cultivo del frijol en México.
- Folch Mallol, J. L. (1994). Estudio de los genes de nodulación y la síntesis de lipooligosacáridos en *Rhizobium tropici* CIAT 899. Tesis doctora en Farmacia, Universidad de Sevilla
- Forde, B. G. (2002). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. Annu. Rev. Plant Biol. 53, 203–224.
- Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (6), e253.

- Gan, Y., Bernreiter, A., Filleur, S., Abram, B. & Forde, B. G. (2012). Overexpressing the ANR1 MADS-Box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant Cell Physiol.* 53, 1003–1016.
- García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás*, (3), 173-186.
- Gojon, A., Nacry, P., & Davidian, J. C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 328-338.
- Gowri, G., Kenis, J. D., Ingemarsson, B., Redinbaugh, M. G. & Campbell, W. H. (1992). Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of *maize* to environmental nitrate. *Plant Mol. Biol.* 18, 55–64.
- Guan, P., Ripoll, J. J., Wang, R., Vuong, L., Bailey-Steinitz, L. J., Ye, D., & Crawford, N. M. (2017). Interacting TCP and NLPs transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2419-2424.
- He, H., & Jia, G. (2013). Research Progress in early symbiotic signal transduction in legumes. *Chinese Bulletin of Botany*, 48(6), 665.
- Hernández-Reyes, C., Lichtenberg, E., Keller, J., Delaux, P. M., Ott, T., & Schenk, S. T. (2022). NIN-Like Proteins: Interesting Players in Rhizobia-Induced Nitrate Signaling Response During Interaction with Non-Legume Host *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(3), 230-243.
- Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. & Tsay, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138, 1184–1194 (2009).
- Hu, H. C., Wang, Y. Y. & Tsay, Y. F. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *Plant J.* 57, 264–278 (2009).
- Hull, G. A., & Devic, M. (1995). The β -glucuronidase (*gus*) reporter gene system. *Plant Gene transfer and expression protocols*, 125-141.

- Jagadhesan, B., Sathee, L., Meena, H. S., Jha, S. K., Chinnusamy, V., Kumar, A., & Kumar, S. (2020). Genome wide analysis of *NLPs* transcription factors reveals their role in nitrogen stress tolerance of rice. *Scientific Reports*, 10(1), 9368.
- 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.
- Jiang, S., Jardinaud, M. F., Gao, J., Pecrix, Y., Wen, J., Mysore, K., ... & Murray, J. D. (2021). NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules. *Science*, 374(6567), 625-628.
- Konishi, M. & Yanagisawa, S. (2010). Identification of a nitrate-responsive *cis*-element in the *Arabidopsis NIR1* promoter defines the presence of multiple *cis*-regulatory elements for nitrogen response. *Plant J.* 63, 269–282.
- Konishi, M. & Yanagisawa, S. (2011). Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive *cis*-element in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 708–713.
- Konishi, M., & Yanagisawa, S. (2013). Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nature communications*, 4(1), 1-9.
- Konishi, M., & Yanagisawa, S. (2014). Emergence of a new step towards understanding the molecular mechanisms underlying nitrate-regulated gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5589-560.
- Lattanzi, F. A., Schnyder, H., & Thornton, B. (2004). Defoliation effects on carbon and nitrogen substrate import and tissue-bound efflux in leaf growth zones of grasses. *Plant, Cell & Environment*, 27(3), 347-356.
- Lin, J. S., Li, X., Luo, Z., Mysore, K. S., Wen, J., & Xie, F. (2018). NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*. *Nature Plants*, 4(11), 942-952.
- Lin, J., Roswanjaya, Y. P., Kohlen, W., Stougaard, J., & Reid, D. (2021). Nitrate restricts nodule organogenesis through inhibition of cytokinin biosynthesis in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 12(1), 1-12.

- Liu, J., & Bisseling, T. (2020). Evolution of NIN and NIN-like genes in relation to nodule symbiosis. *Genes*, 11(7), 777.
- Liu, M., Chang, W., Fan, Y., Sun, W., Qu, C., Zhang, K., ... & Lu, K. (2018). Genome-wide identification and characterization of *NODULE-INCEPTION-Like Protein (NLP)* Family genes in *Brassica napus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2270.
- Martín Munguía-Ortiz, M. M., Elsa-Herminia Quezada, E. H., Isaac Zepeda-Jazo, I., Kalpana Nanjareddy, K., Manoj-Kumar Arthikala, M. K. (2019). Genome-wide identification of RWP-RK transcription factor family genes in nodulated roots of bean. XVIII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology, Sociedad Mexicana de Bioquímica & XI Symposium México/USA & 1st ASPB México Section Meeting held in Mérida Yucatán México, October 28-31, 2019. Poster 100.
- Mu, X., & Luo, J. (2019). Evolutionary analyses of NIN-like proteins in plants and their roles in nitrate signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(19), 3753-3764.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Aguirre, A. L., Gómez, B. M., & Lara, M. (2017). Plant Promoter Analysis: Identification and Characterization of Root Nodule Specific Promoter in the Common Bean. *Journal of Visualized Experiments: J Vis Exp*, (130), e56140.
- Nápoles García, M. C., Cabrera Pino, J. C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández Forte, I., Martínez González, L., & Núñez Vázquez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44.
- Nishida, H., Nosaki, S., Suzuki, T., Ito, M., Miyakawa, T., Nomoto, M., ... & Suzaki, T. (2021). Different DNA-binding specificities of *NLPs* and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation. *The Plant Cell*, 33(7), 2340-2359.

Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., ... & Suzuki, T. (2018). A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 9(1), 1-14 449.

Oldroyd, G. E., & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519-546.

Otori, K., Tanabe, N., Maruyama, T., Sato, S., Yanagisawa, S., Tamoi, M., & Shigeoka, S. (2017). Enhanced photosynthetic capacity increases nitrogen metabolism through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 130(5), 909-927.

Ott, T., Sullivan, J., James, E. K., Flemetakis, E., Günther, C., Gibon, Y., ... & Udvardi, M. (2009). Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 800-808.

Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas.

Pedraza, R. O., Teixeira, K. R., Scavino, A. F., de Salamone, I. G., Baca, B. E., Azcón, R., ... & Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.

Pérez Téllez, R. (2019). La productividad de la industria tabacalera en México y la problemática del tabaco en Chiapas. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma Chapingo.

Pinilla, J. M. S. (2001). Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis rhizobium-leguminosa (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).

Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Sautter, C., Schrott, M., & Spangenberg, G. (1998). Genetic engineering of crop plants. *Agricultural biotechnology*, 119-159.

Ramírez, H., Lentini, Z., & Vallejo Cabrera, F. A. (2009). Evaluación y selección de un protocolo vía *Agrobacterium* para la incorporación de resistencia al

cogollero en la variedad de tomate Unapal-Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(2), 61-68.

Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., ... & Gojon, A. (2006). The Arabidopsis NRT1. 1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19206-19211.

Reyes Martínez, A., Barriada Bernal, L. G., Rivera Rodríguez, D. M., Pajarito Ravelero, A., Delgado Alvarado, E. A., Almaraz Abarca, N., ... & Naranjo Jiménez, N. (2011). Comparación de dos métodos para obtener adn total de *Phaseolus vulgaris* para análisis de istr. *Vidsupra Vol.3 No.1*, p.23-29

Reynoso, M. (2013). Análisis del traductoma en etapas tempranas de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Roth, L. E., & Stacey, G. (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *European journal of cell biology*, 49(1), 13-23.

Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., ... & Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15-41.

Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., & Scheible, W. R. (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. *The plant cell*, 21(11), 3567-3584.

Sakakibara, H., Takei, K. & Hirose, N. (2006). Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.* 11, 440–448.

Sakakibara, H., Takei, K. & Sugiyama, T. (1996). Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize uroporphyrinogen III methyltransferase, an enzyme involved in the synthesis of siroheme, which is prosthetic group of nitrite reductase. *Plant J.* 10, 883–892.

Sánchez, E., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2016). Compuestos nitrogenados indicadores de estrés en respuesta a las dosis tóxicas y deficientes de Nitrógeno en frijol ejotero. *Nova scientia*, 8(16), 228-244.

Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. & Stougaard, J. (1999) A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* 402, 191–195.

Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., & Stougaard, J. (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature*, 402 (6758), 191-195.

Scheible, W. R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., Muller-Rober, B., Caboche, M., & Stitt, M. (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*, 9(5), 783-798.

Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., ... & Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant physiology*, 136(1), 2483-2499.

Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., ... & Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant physiology*, 136(1), 2483-2499.

Schwember, A. R., Schulze, J., Del Pozo, A., & Cabeza, R. A. (2019). Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules. *Plants*, 8(9), 333.

Sigala Rodriguez, J. A., Uscola, M., & Oliet Pala, J. A. (2019). El papel del nitrógeno orgánico en el desarrollo de mecanismos de resistencia a estrés en especies del género *Pinus*: resultados preliminares= The role of organic nitrogen in promoting mechanisms of stress resistance in *Pinus* species: preliminary results. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, 45(2), 71-86.

Singh, A., Singh, N. B., Yadav, V., Bano, C., Khare, S., & Yadav, R. K. (2021). Nod factor signaling in legume-Rhizobium symbiosis: Specificity and molecular

genetics of nod factor signaling. In: Vijay Pratap Singh, Samiksha Singh, Durgesh Kumar Tripathi, Sheo Mohan Prasad, Renu Bhardwaj, Devendra Kumar Chauhan (eds.) *Abiotic Stress and Legumes. Tolerance and Management.* (pp. 33-67). Academic Press.

Spagnoletti, F. N., Fernandez di Pardo, A., Tobar Gómez, N. E., & Chiocchio, V. M. (2013). Las micorrizas arbusculares y *Rhizobium*: una simbiosis dual de interés. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 131-132.

Sprent, J. I., & James, E. K. (2007). Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in?. *Plant physiology*, 144(2), 575-581.

Stewart, V. (1994). Dual interacting two-component regulatory systems mediate nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 145, 450–454.

Stitt, M. (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current opinion in plant biology*, 2(3), 178-186.

Szczyglowski, K., Shaw, R. S., Wopereis, J., Copeland, S., Hamburger, D., Kasiborski, B., ... & de Bruijn, F. J. (1998). Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(7), 684-697.

Todd, C. D., Zeng, P., Huete, A. M., Hoyos, M. E. & Polacco, J. C. (2004). Transcripts of MYB-like genes respond to phosphorus and nitrogen deprivation in *Arabidopsis*. *Planta* 219, 1003–1009.

Traubenik, L. S. (2020). Regulación dinámica del traductoma de *Medicago truncatula* durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. 2020. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol*, 64(1), 781-805.

Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(5), 383-403.

- Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Piñero, J. L., Palomo, J. L., Mateos, P. F., Rivas, R., ... Martínez-Molina, E. (2005). The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(12), 1325-1332.
- Vuong, L. K. (2013). NLP6 and NLP7 Bind to Cis-acting Elements of the NIA1 Nitrate Reductase Gene and Activate Gene Expression in a Nitrate-dependent Manner. MSc in Biology Thesis dissertation. University of California, San Diego.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X., & Crawford, N. M. (2003). Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant physiology*, 132(2), 556-567.
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., ... & Crawford, N. M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 136(1), 2512-2522.
- Wang, Z., Wang, L., Wang, Y., & Li, X. (2020). The NMN Module Conducts Nodule Number Orchestra. *iScience*, 23(2), 100825.
- Wu, Z., Liu, H., Huang, W., Yi, L., Qin, E., Li, Y., ... & Qin, R. (2020). Genome-wide identification, phylogeny, and expression profiling of RWP-RK gene family under low nitrogen and nodulation in *Arabidopsis* and legumes.
- Yanagisawa, S. (2014). Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Science*, 229, 167-171.
- Yi, Y., Peng, Y., Song, T., Lu, S., Teng, Z., Zheng, Q., ... & Ye, N. (2022). NLP2-NR module associated NO is involved in regulating seed germination in rice under salt stress. *Plants*, 11(6), 795.
- Yin, M., Zhang, Z., Xuan, M., Feng, H., Ye, W., Zheng, X., & Wang, Y. (2020). Conserved Subgroups of the Plant-Specific RWP-RK Transcription Factor Family Are Present in Oomycete Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1724.

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

Zhang, H., & Forde, B. G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of experimental botany*, 51-59.

12. Anexos

Protocolos, tablas, figuras como material suplementario de esta investigación:

12.1. ANEXO 1: Extracción del ADN genómico de semillas de *P. vulgaris*.

Procedimiento: 1º Protocolo: kit DNeasy Plant Pro and Plant®.

Extracción del ADN genómico de semillas de *P. vulgaris*.

Notas antes de empezar: Si la solución Buffer APP contiene precipitados, calentar a 60 °C hasta que se disuelva el precipitado. Realice todos los pasos de centrifugado a temperatura ambiente (15–25 °C). Consulte el manual del kit para conocer el método de homogeneización óptimo en el paso 2.

Procedimiento

1. Agregue de 5 a 100 mg de tejido vegetal fresco o congelado y 500 µL de Solución CD1 a un tubo de disrupción de tejido de 2 mL. Vortex brevemente para mezclar. Nota: Si su muestra tiene un alto contenido de compuestos fenólicos, agregue 450 µL de solución CD1 y 50 µL de solución PS.

2. Homogeneizar a máxima velocidad durante 10 min. Homogeneizar el tejido durante 1 ciclo a la velocidad adecuada según el tipo de muestra durante 2 min.
3. Centrifugue los tubos de disrupción de tejido a 12.000 x gramos durante 2 min.
4. Transfiera el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 mL (incluido). Nota: Espere 350–450 μ . El sobrenadante aún puede contener algunas partículas vegetales.
5. Agregue 200 μ L de Solución CD2 y agitar en vórtex durante 5 s. Nota: Para muestras problemáticas, agregue 250 μ L de Solución CD2.
6. Centrifugar a 12.000 x gramo durante 1 min a temperatura ambiente. Evitando el sedimento, transfiera el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 mL (incluido). Nota: Espere 400–500 μ L.
7. Agregue 500 μ L de Buffer APP y agitar en vortex durante 5 s.
8. Cargue 600 μ L de lisado en una MB Spin Column. Centrifugar a 12.000 x gramos durante 1 min.
9. Deseche el fluido y repita el paso 8 para asegurarse de que todo el lisado haya pasado por la columna de centrifugación MB.
10. Coloque la columna de centrifugación MB en un tubo de recogida limpio de 2 mL.
11. Agregue 650 μ L de tampón AW1 a la columna de centrifugación MB. Centrifugar a 12.000 x gramos durante 1 min. Deseche el flujo continuo y vuelva a colocar la columna de centrifugación MB en el mismo tubo de recogida de 2 mL.
12. Agregue 650 μ L de tampón AW2 a la columna de centrifugación MB. Centrifugar a 12.000 x gramos durante 1 min.

Deseche el flujo continuo y coloque la columna de centrifugación MB en el mismo tubo de recogida de 2 mL.

13. Centrifugar hasta 16.000 x gramos durante 2 min. Coloque la columna de centrifugación MB en un tubo de elución nuevo de 1,5 mL (incluido).

14. Agregue 50–100 µL de Buffer EB al centro de la membrana del filtro blanco.

15. Centrifugar a 12.000 x gramos durante 1 min. Deseche la columna de giro MB. El ADN ahora está listo para aplicaciones posteriores.

12.2. ANEXO 2: Extracción de ADN fragmento *pNLP4* y *pNLP6*.

Procedimiento: 2°Protocolo:kit Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction®

1. Extirpar la rebanada de gel que contiene el fragmento de ADN utilizando un bisturí limpio o una cuchilla de afeitar. Cortar lo más cerca posible del ADN para minimizar el volumen del gel. Coloque la rebanada de gel en un tubo de 1,5 mL previamente pesado. Registrar el peso de la rebanada de gel.

2. Nota. Si el fragmento purificado se utilizará para reacciones de clonación, evite dañar el ADN, mediante la exposición a la luz UV. Minimice la exposición a la luz UV en unos pocos segundos o mantenga la rebanada de gel en una placa de vidrio o plástico durante la iluminación UV.

3. Añada un volumen 1:1 de Binding Buffer a la rebanada de gel (volumen: peso)(por ejemplo, añadir 100 µL de Binding Buffer por cada 100 mg de gel de agarosa).Nota. Para geles con un contenido de agarosa superior al 2%, añada 2:1 volúmenes de Binding Buffer a la porción de gel.

4. Incubar la mezcla de gel a 50-60 °C durante 10 minutos o hasta que la rebanada de gel esté, se disuelva completamente. Mezclar el tubo por inversión cada pocos

minutos para facilitar el proceso de fusión. Asegúrese de que el gel está completamente disuelto. Agitar brevemente la mezcla de gel brevemente antes de cargarlo en la columna.

5. Compruebe el color de la solución. Un color amarillo indica un pH óptimo para la unión del ADN para la unión del ADN. Si el color de la solución es naranja o violeta, añada 10 μ L de solución de acetato de sodio 3M, acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y mezclar. El color de la mezcla se volverá amarillo. Para ≤ 500 bp y > 10 kb. Opcional: utilice este paso sólo cuando el fragmento de ADN sea ≤ 500 pb o > 10 kb de longitud.1.

6. Si el fragmento de ADN es ≤ 500 pb, añada 1 volumen de gel de isopropanol al 100% a la solución de gel solubilizada (por ejemplo, deben añadirse 100 μ L de isopropanol a 100 mg de rebanada de gel solubilizada en 100 μ L de Binding Buffer).

7. Transfiera hasta 800 μ L de la solución de gel solubilizada (del paso 3 o 4) a la columna de purificación y Centrifugar durante 1 minuto. Deseche el flujo de la columna y vuelva a colocar la columna en el mismo tubo de recogida. Nota. Si el volumen total supera los 800 μ L, la solución puede añadirse a la columna en las etapas. Después de cada aplicación, centrifugar la columna durante 30-60 s y desechar el flujo después de cada centrifugado. Repita la operación hasta que se haya aplicado todo el volumen a la membrana de la columna. No exceda de 1 g de gel de agarosa total por columna.

8. Añadir 100 μ L de Binding Buffer a la columna de purificación GeneJET. Centrifugue durante 1 minuto. Deseche el flujo y vuelva a colocar la columna en el mismo tubo de recolección (1.5 o 2 mL).

9. Añada 700 μ L de tampón de lavado (diluido con etanol como se describe en la pág. 3) a la columna de purificación GeneJET. Centrifugar durante 1 minuto. Descartar el flujo de la columna y volver a colocar la columna en el mismo tubo de

recogida. Centrifugue la columna de purificación GeneJET vacía durante 1 minuto más para eliminar completamente el tampón de lavado residual. Nota. Este paso es esencial para evitar el etanol residual en la solución de ADN purificada. La presencia de etanol en la muestra de ADN puede inhibir las reacciones enzimáticas posteriores.

10. Transfiera la columna de purificación GeneJET a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 mL. Añada 50 µL de tampón de elución en el centro de la membrana de la columna de purificación. De la columna de purificación. Centrifugar durante 1 minuto. Nota. Para cantidades bajas de ADN, los volúmenes de elución pueden reducirse para aumentar la concentración de ADN.

11. Para aumentar la concentración de ADN. Un volumen de elución entre 20-50 µL no reduce significativamente el rendimiento de ADN. Sin embargo, no se recomiendan los volúmenes de elución inferiores a 10 µL. Si el fragmento de ADN es >10 kb, precaliente el tampón de elución a 65 °C antes de aplicarlo a la columna. Si el volumen de elución es de 10 µL y la cantidad de ADN es ≤ 5 µg, incube la columna durante 1 min a temperatura ambiente antes de centrifugar.

12. Deseche la columna de purificación GeneJET y almacena el ADN purificado a -20 °C.

12.3. ANEXO 3: Extracción del plásmido bacteriano mediante Miniprep

Procedimiento: 3° Protocolo: kit GeneEluted Plasmid Miniprep (Sigma Aldrich)®

1. Cosecha de células Pellet 1-5 mL de un cultivo *de E. coli* recombinante de una noche por centrifugación. El volumen óptimo de cultivo a utilizar, depende del plásmido y de la densidad del cultivo. Para obtener el mejor rendimiento, siga las instrucciones de la nota siguiente. Transfiera el volumen

adecuado del cultivo de *E. Coli* recombinante a un tubo de microcentrífuga y pellet las células a $\geq 12.000 \text{ g}$ durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante.

2. Nota: Para obtener los mejores resultados con *E. coli* recombinante cultivada en LB (caldo Luria), utilice de 1 a 3 mL para plásmidos de baja copia. Volúmenes mayores pueden causar una reducción en el rendimiento.
3. Resuspender las células y verifique que el volumen apropiado de solución de RNasa A se haya añadido a la solución de resuspensión. Resuspender completamente el pellet bacteriano con 200 μL de la solución de resuspensión. Vortex o pipeta arriba y abajo, para resuspender completamente las células hasta que sean homogéneas. Una resuspensión incompleta dará lugar a una mala recuperación.
4. Lisar las células resuspendidas añadiendo 200 μL de la Solución de Lisis. Mezclar inmediatamente el contenido mediante una suave inversión (6-8 veces) hasta que la mezcla se vuelva clara y viscosa. No agitar. La mezcla brusca cizalla el ADN genómico lo que provocaría la contaminación del ADN cromosómico en el ADN plasmídico final recuperado. No permita que la reacción de lisis supere los 5 minutos. Una lisis alcalina prolongada puede desnaturalizar permanentemente el ADN plasmídico superenrollado, lo que puede hacerlo inadecuado para la mayoría de las aplicaciones posteriores.
5. Precipitar los restos celulares añadiendo 350 μL de la solución de neutralización/vinculación. Invierta suavemente el tubo 4-6 veces. Pelear los restos celulares centrifugando a $\geq 12.000 \times g$ o a la máxima velocidad durante 10 minutos. Los restos celulares, las proteínas, lípidos, SDS y ADN cromosómico deben salir de la solución como un precipitado turbio y viscoso. Si el sobrenadante contiene una gran cantidad de partículas flotantes después de la centrifugación, vuelva a centrifugar el sobrenadante antes de proceder al paso 6.

6. Prepare la columna Introduzca una columna de unión GenElute Miniprep en un tubo de microcentrífuga suministrado, si no está ya montada. Añada 500 μ L de la solución de preparación de la columna a cada columna de minipreparación y centrifugue a $\geq 12.000 \times g$ durante 30 segundos a 1 minuto. Deseche el líquido de flujo. Nota: La solución de preparación de la columna maximiza la unión del ADN a la membrana, lo que da lugar a rendimientos más consistentes.
7. Cargar el lisado despejado Transferir el lisado despejado del paso 3 a la columna preparada en el paso 4 y centrifugar a $\geq 12.000 \times g$ durante 30 segundos a 1 minuto. Deseche el líquido de flujo. Añada 500 μ L de la solución de lavado opcional a la columna. Centrifugar a $\geq 12.000 \times g$ durante 30 segundos a 1 minuto. Deseche el líquido de flujo.
8. Columna de lavado: Compruebe que se ha añadido etanol a la botella de solución de lavado 2 .Añadir 750 μ L de la Solución de Lavado diluida a la columna. Centrifugar a $\geq 12.000 \times g$ durante 30 segundos a 1 minuto.
9. El paso de lavado de la columna elimina la sal residual y otros contaminantes introducidos durante la carga de la columna. Descartar el líquido de flujo y centrifugar de nuevo a máxima velocidad máxima durante 1 a 2 minutos sin ninguna solución de lavado adicional para eliminar el exceso de etanol.
10. Solución para eliminar el exceso de etanol (4 mL de Agua desionizada estéril + 1 mL de etanol al 96 %) .
11. Eluir el ADN Transferir la columna a un nuevo tubo de recogida. Añadir 100 μ L de solución de elución o de agua reactiva de biología molecular a la columna. Para la secuenciación del ADN y otras aplicaciones enzimáticas, utilice agua o Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, como eluyente. Centrifugar a $\geq 12.000 \times g$ durante 1 minuto. El ADN está presente en el estudiante y está listo para su uso inmediato o almacenar a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

12.4. ANEXO 4: Figuras

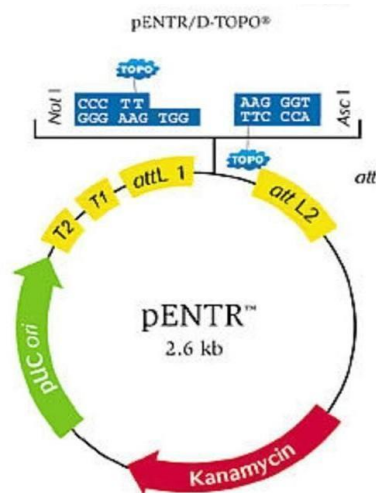


Figura A1 Reacción para la inserción del promotor de *NLP4* y *NLP6* en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Esta reacción resulta en la inserción direccional del fragmento dentro del vector, debido al inicio CACC previamente sintetizado en el fragmento.

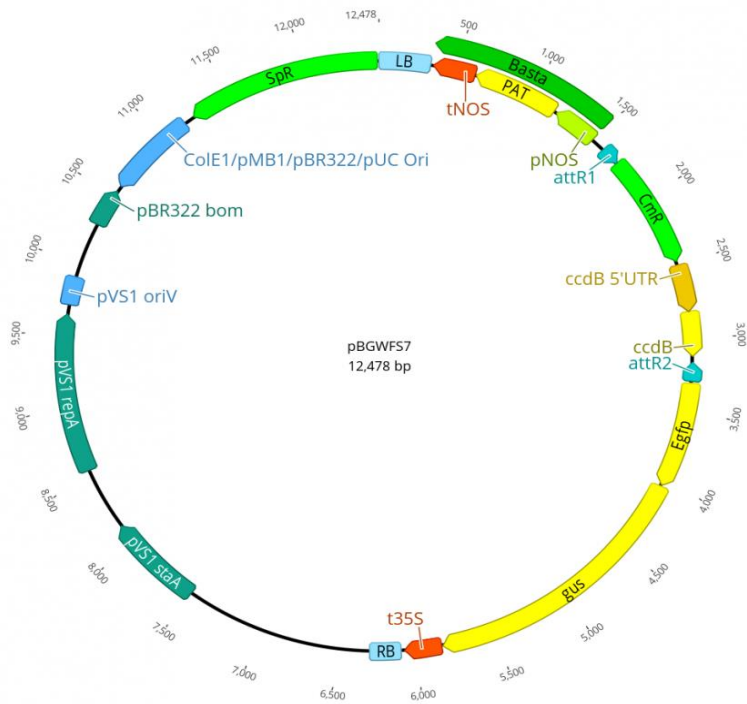


Figura A2. Composición del vector pBGWFS7.0. El tamaño del vector corresponde a 12,478 pb. Dicho vector fue usado para la clonación y transformación de los promotores *NLP4* y *NLP6*.

12.5. ANEXO 4:Tablas

Tabla A1.Composición de solución B&D.

Solución stock	Componentes	Molaridad final	Fórmula
Solución A	Ca	1000 μ M	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Solución B	P	500 μ M	KH_2PO_4
Solución C	Fe	10 μ M	C_6H_5
Solución D	Mg	250 μ M	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	K	1500 μ M	K_2SO_4
	S	500 μ M	SO_2
	Mn	1 μ M	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	B	2 μ M	H_3BO_4
	Zn	0.5 μ M	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Cu	0.2 μ M	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
	Co	0.1 μ M	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	Mo	0.1 μ M	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Tabla A2. Composición del medio PY sólido para cultivo de *Rhizobium tropici* K599.

Reactivo	Concentración
1. Peptona	5 g/L
2. Extracto de levadura	3 g/L
3. Agar	15 g/L
4. Cloruro de Calcio	700 mM
5. Ácido nalidixico (1 M)	20 µL/mL

Tabla A3. Composición del buffer GUS:X-gluc para un volumen de 10mL.

Reactivo	Volumen	Molaridad final
K_2HPO_4	0.615 mL	100 mM
$KHPO_4$	0.385 mL	100 mM
EDTA	200 µL	10 mM
Triton X	10 µL	0.1%
$K_3Fe(CN)_6$	50 µL	0.5 mM
$K_4Fe(CN)_6$	50 µL	0.5 mM
X-gluc	100 µL	1 mM
H ₂ O destilada	8.59 mL	

Tabla A3. Composición del buffer GUS:X-gluc para un volumen de 10 mL.

Reactivo	Volumen	Molaridad final
K_2HPO_4	0.615 mL	100 mM
$KHPO_4$	0.385 mL	100 mM
EDTA	200 μ L	10 mM
Triton X	10 μ L	0.1%
$K_3Fe(CN)_6$	50 μ L	0.5 mM
$K_4Fe(CN)_6$	50 μ L	0.5 mM
X-gluc	100 μ L	1 mM
H ₂ O destilada	8.59 mL	0.5 mM

Tabla A4. Concentraciones de la clonación con el vector final al promotor de *NLP4* y *NLP6*.

Reactivos	1X
Templado pr <i>NLP6</i>	0.5 μ L
10X Roche PCR Buffer + Mg	2 μ L
10 mM dNTP Mix	0.5 μ L
Oligo p <i>NLP6</i> For	0.5 μ L
Oligo pr <i>NLP6</i> Rev	0.5 μ L
50X Taq polimerasa Advantage	0.5 μ L
H ₂ O	15.5 μ L

12.6. Programas PCR

Tabla A5. Programa y componentes de reacción de PCR para la amplificación del promotor *NLP4* y *NLP6*.

<p><i>pNLP6</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA raíz <i>P. vulgaris</i> (2 μL) ▪ Buffer para PCR 5X Superfly (10 μL) ▪ Mix de dNTP 10mM (1 μL) ▪ Oligo prNLP6 For (1 μL) ▪ Oligo prNLP6 Rev (1 μL), ▪ Taq polimerasa Advantage 50X (0.5 μL) H₂O (30 μL) 	<p>La reacción de PCR usando el programa que consistió en las siguientes condiciones:</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;"><u>95° C</u></td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">98° C</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">56.5° C</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">72° C</td> <td style="text-align: center;"><u>72° C</u></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">5 min</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">30 seg</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">45 seg.</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">1min</td> <td style="text-align: center;">6 min</td> </tr> <tr> <td colspan="5" style="text-align: center; border-top: 1px solid black;"> <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div> </td> </tr> </table>	<u>95° C</u>	98° C	56.5° C	72° C	<u>72° C</u>	5 min	30 seg	45 seg.	1min	6 min	<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div>				
<u>95° C</u>	98° C	56.5° C	72° C	<u>72° C</u>												
5 min	30 seg	45 seg.	1min	6 min												
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div>																
<p><i>pNLP4</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA raíz <i>P. vulgaris</i> (2 μL) ▪ Buffer para PCR 5X Superfly (10 μL) ▪ Mix de dNTP 10mM (1 μL) ▪ Oligo prNLP6 For (1 μL) ▪ Oligo prNLP6 Rev (1 μL), ▪ Taq polimerasa Advantage 50X (0.5 μL) ▪ H₂O (30 μL) 	<p>La reacción de PCR usando el programa que consistió en las siguientes condiciones:</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;"><u>95° C</u></td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">98° C</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">58.5° C</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">72° C</td> <td style="text-align: center;"><u>72° C</u></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">6 min</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">30 seg</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">45 seg.</td> <td style="text-align: center; border-right: 1px solid black;">1min</td> <td style="text-align: center;">6 min</td> </tr> <tr> <td colspan="5" style="text-align: center; border-top: 1px solid black;"> <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div> </td> </tr> </table>	<u>95° C</u>	98° C	58.5° C	72° C	<u>72° C</u>	6 min	30 seg	45 seg.	1min	6 min	<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div>				
<u>95° C</u>	98° C	58.5° C	72° C	<u>72° C</u>												
6 min	30 seg	45 seg.	1min	6 min												
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> } 30 ciclos </div>																

12.7. Secuencias de los promotores *NLP4* y *NLP6*

Promotor *NLP4* (1036 pb) Phytozome online

>Phvul.008G291800

TATGTCACTATTTTGGATATTATTTATTTAATTGGTTAGAAATTGAAAGAAGATTCCCTTCGCCGACC
TATTTGTTAAAAGGGATTTGTTTCGTTCAATCACTAATTACTAATTACTGTGCATGCGTAAGCCC
ATTAACCATCATCCACCTCAACACAAAGTACACTTCGTTAAGGAATTAATTATTTTAATAATTCAT
TACCACTCTTATTATTTTAAAAAATCAAATCAAATCACTTTATTTTATTTTATTTTATTGTCAGAGA
CCACAATTCACCTTTCTTTCTAATATAAAATCCAATCTTCAAACACACAACATACTCCTTTTATTTT
TTTTTTTTATTTTTTTTTTTTCGAATTCTGAAATTTAAAGTGGACCAAGTGCTATCCATCAACAATTACC
TTGTTTCTTGATTTCATACAATGGGAATAATTAGGGGAAAGAAGGCATCGATAATGAAAATGATA
ATTTATGATTAGTGAGAAATTAAGAATAAAAAAAGTATAATGCAGTCCATTTTCATGACAGATG
TGAGAATAAAAATGCTTCTTCGTATACCAATTTATGTATTATTTTGAAGAAATGTATGAATAAAT
GATGTGTGTAAGGGTGATTAATGTTATAAACAAAAGTAATTAATGATTAATGTTGACTTGTGAT
GTGGAAATGCGAAATCCATTAACCTATAGGAGTAAAAATTTCTGAAAAGGTAATAATCATGAATA
AGTATTTAAACTTATGAGAATTATAAAATGAATATGTTATATTTGTGATGTTAATTAAGCAATGA
AACAGAGAAGAATGTTTTGTTTTTTTTAAAAAAGAGTGTATAGTATATATGAAACATGGTGCC
ATGTATTATAGTTTGCTATGGAATTGCCACGTGGCGCAGAGCGAGGAAGTGAGGGTTATGATC
TCCCCTATTATGCAGCCGCTTCTTCTTCTGCATATTTATATTCTTATTTATTATCTCAAATAAT
ATGTATAAATATTATTATTTATTGCTCCTACATAATTAATTAATAATTTTTTTACTAAAGTTTTCCA
ATAAATAAACACCGGCGGCCACCGTGAGAGGCACCAGAGAGAGTAACCTCACTTTCCGCATTT
GCTTATTCTGCTCCTCCTGGGTCCCCTCCAAACTATAATTTTTCTTTTCTGTTTCTTCTCTC
TCTCTATATATATATGCATGTTGAGTTGTGTTGAGTTGAATCAGGTACTCATTTTGTGAAGCAAT
TTCATTCAATTTCTTCTTACTCTCTATAATCTTGGATCCGGAGAAAGCTTTATCTGGGTAAG
TGAGTCAGTGCCCATGCTTATTTTTCTCTCTCGCTGCTTAATTGCTTACTTGTATATGTAAT
GTGAAATCATATAAGAGCATGGAATATGGTGGTGGG

Oligos: *NLP4* Expected product size 1036 bp

prNLP4-For : 5' CAC CGT GCT ATC CAT CAA TTA CC 3'

26 nt; 46 GC%; 66C TM; None

prNLP4-Rev : 5'CCA CCA TAT TCC ATG CTC TTC 3'

24 nt; 50 GC%; 65C TM; None

Promotor *NLP6* (1026 pb) Phytozome online.

> Phvul.009G115800

ATAAATTATTTCTAGTTTATTTTATTCAAACAACCTCATTCTGAAACTTTGATATCATTATGAAAATTACCT
TTAAATTTTGTGGAATTAATAAAAAAATAAAACTATCACTACGAGAAAATCATTAAATAGAAACCAATTT
TAGAGAAAAAATAAATTAGTTGTTATAGTGACTAAATTATAAACCATTTTAAAGACTAAAAAATTATT
GGTTTCTAAATTAGTTTCTATTATTGATAAATAATTTCTAAATTGGTATTTAATTAGCTACCAAGGTTTTA
ACTACCAATTATTTAGATTCTAAATTTGGTAATTAATTAGATACCAATTTAGAAACCAATTTATCAATAGTA
GAAACAAATTTAGAAACCAATAATTTTTGTAGCATTAAATGATCTATAATTTAGTTATTATAACAACCTA
ATTATTTTTGTTCTCTAAAATTAGTTTCTATTTAATGATTTTCTTATGGTATATTTAAAATTGAAGTTTTAA
GTTTACAAGTAAAAATTTTTCTATTAATATTTATAGATAAAAATTATATATATAATAAAAAATGTATAATA
TATATAACTCTTTGCTTTAAATAAAATTTTTAAAAATCGCTCTCAAATATATTTTAAATCTCACTCATCGT
TCTACCTATCCTTGAAATCTTGTAATACCTATCTTGCGCATGTTTTCCAACCTTCTATTAAGCCCACTT
AATAATGAATCATCCCTTAACTAAAATAAGCACAATTAATCTTAAACGTAATAGAATCTCTGCTAACAAG
TTGTTTGATGTTGATCCTTATTCGTGTGTGTTTATATATATATATTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA
AATGTGCTTAAGTGAAAGTGATCTATATGAGTTGTCTGAGAATCTTATTTCAACAAATCTCAGCAATAA
GAATTATCCCTTTCAATTTCAAAGAAACCTAAAACCACCCATCTCTCTAGCTTGCATAACCATGCCCA
AGGTTTAAACAACAGTTCTTATTTTGTTTAAATTTTCGGGATGCTTCCGTCAATTCATCCACCAATCAAT
GGGATCCATTTTCTTTTACGGTATCAACTTGGAAATTCGCATGACGCGGTGCAATATCATTAAAACCTT
TTTTTAAATCTCGTATTACTCTAATTTATTTAACACTTTTTCACTAAATTTCTACGACTGCCAC**GTGGAA**
CATGGAGAGGAACTCTCTCCAGTTTAAATAAAAAATGTTCACCTCACATAAATCGGACTGCAAACCTCCA
GGGAAACTCTCCAATTTATAATTTATGTTTGTGTTTGTTCGCAAATCCACATTGAATATATATATATA
TATATATATATATAATGATACAAATCTCACTTTATCAATCAGTTTTATAAACTGAGTTTAGTAATTTTT
GTAATAATTCTAAATCCTTACTAAATATATATATAAACTATCTTGCATATAAGAAATTTACTTTATTA
TTAAATACATTGTTTTCTTCTATAGCTCCCCAAAATGGTATGTGTTTTGTTTGTAAACATCACATGAATT
TTCCAATTAATAAAGCTCTCAAAATATAAATCTATAGTTTTAGCAGGAATGTTTTGTAAGTTGGTATAA
TGGGGAGTGAGGCCCTCCTTTCTAACTTGTGGTCTACTGACACTGTAGACAATTTGCAGTTGTCT
CGGAGTCATTAATAGAAGAGTTCGATGAGCAGGTGAGTACTGTATAAGCAAAGCAGCGCCCTCGCC
AGATCGATCACTTCAGCAACATTCCTTTCTTTCTTCTACCTCTTTTTCTCTCCACAACCTTTTCTCTT
CTTCATCGCACTTTATTAAGAATCTGTAAGGTGAGGGAGTCTCCTACTTCATCCCCATTCCTCCTTCTA
TCTCTGTCTCTCTGCTTGCATGCTAATGTTAACTTCATTTATCTCTCACCATTGTTAATATATGCATTT
ATATATCAATTATCGACCTAAGATACAACATACTTCAGGCTCCAAGTGCTATACCAGACAATAAAACGC
TTCTGATTTAGTCTCGCAACATACTTAATGTTTGTCTTACTTCATTGAATGTTAATTTTGGATGCTATA
TGCTAAGATATTTATTGTGTTTATTGAGTGAGTGGAATAAAGCTATAAATAAATTATATACAGGATCAG
TGGAGATAGGGGTGTTAGTTAGTTA**GTTAGTGGAAGGAAGATG**

Oligos: *NLP6* Expected product size 1026 bp

***pNLP6-For* : 5' CAC C GTG GAA CAT GGA GAG GAA C 3'**

23 nt; 53 GC%; 58C TM; None

***pNLP6-Rev* : 5' CAT CTT CCT TCC ACT AAC TAA C 3'**

22 nt; 41 GC%; 59C TM; None