UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“La participación de la Proteína de Autofagia ATG8 en la simbiosis nodular de raíces de *Phaseolus vulgaris*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN CIENCIAS

(BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)

PRESENTA:

MARIA DEL CARMEN FLORES NAVARRETE

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Georgina Estrada Navarrete

Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS JUNIO, 2024

AGRADECIMIENTOS

A Leo, mi principal motor para mi desarrollo profesional.

A mis padres, por su amor y apoyo durante todo este proceso, y por ser un ejemplo de determinación, superación y fortaleza.

A todos mis amigos, en especial a Sofí, Mich y Lez, a quienes conocí en esta carrera y me apoyaron en momentos de dificultad.

A Geo, por brindarme un espacio para realizar mi tesis y motivarme a continuar en la escritura.

A los integrantes del Lab. 19 del IBt, por todo el apoyo y consejos para continuar con los experimentos.

A los doctores integrantes de mi comité sinodal, por sus observaciones y sugerencias para que el desarrollo del proyecto se realizara de la mejor manera.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Apoyo técnico por el mantenimiento del cepario a Biol. Olivia Santana Estrada.

En la síntesis de oligos a Eugenio Bustos y Paul Gaytan.

Por su expertis en Microscopía confocal a Xóchitl Alvarado Affantranger del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del IBt.

Al Dr. Jorge Solís, por el apoyo en los experimentos de clonación.

1 RESUMEN

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en células eucariotas, en el cual proteínas y orgánulos son secuestrados en vesículas de doble membrana (autofagosomas) y liberados dentro de la vacuola para su descomposición y eventual reciclado. La formación de las vesículas está regulada por complejos proteicos entre los cuáles participa la proteína ATG8, la cual se une a la membrana de los autofagosomas hasta que son degradados, por lo que esta proteína es considerada un marcador de autofagia. A diferencia de levadura donde ATG8 es codificada por un solo gen, en plantas como en otras eucariotas superiores, tienen una familia multigénica. *Arabidopsis thaliana* tiene 9 miembros, mientras que plantas como soja (*Glycine max*) y frijol (*Phaseolus vulgaris)* se predicen 12 y 6 miembros, respectivamente. Estas últimas pertenecen a las leguminosas y tienen la capacidad de llevar a cabo simbiosis con rizobacterias para llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico.

En 2016 nuestro grupo de trabajo publicó que el silenciamiento de genes de autofagia como Atg6 y PI3K disminuyen la nodulación y los niveles de transcrito de Atg8. Sin embargo, se desconoce si la diversidad estructural de ATG8 está relacionada con especificidad de tejido o con su funcionalidad durante la simbiosis. Después de analizar la secuencia de la familia ATG8 de frijol para su clasificación, así como la detección por PCR en los nódulos y raíces de frijol, el objetivo de este trabajo es determinar si hay especificidad de alguno de los miembros de ATG8 en el proceso simbiótico. Se llevará a cabo el análisis de la expresión del gen Atg8 de *P. vulgaris* (PvATG8), mediante el uso de su región promotora fusionada al gen reportero (GFP / GUS), en el sistema de raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Así como la expresión de pPvATG8:GFP:GUS durante la interacción simbiótica *P. vulgaris-Rhizobium tropici*. Posteriormente se llevará a cabo su localización por medio de microscopía confocal, utilizando la construcción RFP-ATG8 en nódulos de raíces transgénicas de frijol. Así mismo se estaría confirmando que la autofagia participa en el proceso simbiótico de la planta.

Tabla de contenido

1 RESUMEN 3

2 LISTA DE ABREVIATURAS 6

3 INTRODUCCIÓN 7

3.1 Proceso de señalización del reconocimiento entre leguminosas-rizobios y organogénesis del nódulo 8

3.2 Tipos de nódulos 10

3.3 Nódulos Indeterminados 11

3.4 Nódulos determinados 11

3.5 Autofagia 11

3.6 La proteína ATG8 15

4 ANTECEDENTES 17

5 JUSTIFICACIÓN 21

6 HIPÓTESIS 21

7 OBJETIVO GENERAL 22

8 OBJETIVOS PARTICULARES 22

9 METODOLOGÍA 22

9.1 Análisis bioinformático de-ATG8 en el genoma de *P. vulgaris* 22

9.2 Diseño de primers y clonación 23

9.3 Construcción de plásmidos 24

9.4 Material biológico 24

9.5 Generación de plantas de frijol con raíces transgénicas 25

9.6 Análisis de la actividad de promotor 25

9.7 Medición de los niveles de transcritos por RT-qPCR 26

9.8 Análisis microscópico y de imágenes 27

10 RESULTADOS 27

10.1 Análisis in silico de los genes PvAtg8 de frijol 27
10.1.1 Identificación de la familia PvAtg8 27
10.1.2 Análisis de la expresión de los genes Atg8 de frijol 30
10.1.3 Análisis de motivos de regulación NOD y ROOT en las secuencias promotoras 31
10.2 Niveles de transcrito de PvATG8 durante el proceso de nodulación 32
10.3 Actividad de promotores PvAtg8d y PvAtg8f2 en raíces transgénicas de frijol 33
10.3.1 Búsqueda y análisis de la secuencia promotora de PvAtg8d 33
10.3.2 Amplificación del promotor PvAtg8-d mediante la técnica PCR..... 35
10.3.3 Clonación del promotor PvATG8-d en el vector pENTR/D-TOPO 35
10.3.4 Recombinación del vector pENTR-proPvAtg8-d con el vector destino pBGWFS7,036
10.3.5 Transformación del vector pBGWFS7,0-proPvAtg8-d en células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 37
10.3.6 Búsqueda y análisis de la secuencia promotora de PvAtg8-f2 38
10.3.7 Amplificación del promotor PvAtg8-f2 mediante la técnica de PCR..... 39
10.3.8 Clonación del promotor PvATG8-d en el vector pENTR/D-TOPO 39
10.3.9 Reacción del producto de recombinación del vector destino pBGWFS7-proPvAtg8-f2 40
10.3.10 Transformación con el vector pBGWFS7-proPvAtg8-f2 en células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 41
10.4 Actividad de promotores PvAtg8-d y PvAtg8-f2 en raíces transgénicas de frijol. 41
10.5 Evaluación de la expresión de los genes PvAtg8 en condiciones con y sin déficit de nitrógeno. 43
11 DISCUSIÓN..... 45
12 CONCLUSIONES 47
13 PERSPECTIVAS 48
14 REFERENCIAS 48
15 MATERIAL SUPLEMENTARIO 56

2 LISTA DE ABREVIATURAS

ATG: Proteína involucrada en autofagia (del inglés: Autophagy related protein)

Dpi: Días post-inoculación

GFP: Proteína Verde Fluorescente (del inglés, Green Fluorescent Protein)

GUS: β-Glucuronidasa

NOD: Factores de nodulación

PE: Fosfatidil etanolamina

ProPvAtg8:GFP-GUS: Promotor del gen ATG8 de P. vulgaris fusionado a la proteína verde fluorescente y a la β - glucuronidasa

PvAtg8: Gen ATG8 de Phaseolus vulgaris

g: Gramo

nm: Nanómetro

ml: Mililitro

µm: Micrómetro

M: Molar

mM: Milimolar

µM: Micromolar

Sp: espectinomicina

3 INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es una leguminosa originaria del continente americano de las más importante para el consumo humano y tiene un papel en la agricultura sostenible debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico.

En nuestro país, en la región Mesoamericana es considerado como uno de los principales centros de origen y domesticación de diversos cultivares de frijol, siendo uno de los principales el *Phaseolus vulgaris*. A nivel mundial, el frijol común es la leguminosa de mayor consumo, aportando hasta un 15% del total de calorías diarias y el 36% de la proteína diaria total, en partes de África y América (Schmutz et al., 2014). La biología molecular, ha permitido el estudio de las funciones que desempeñan los genes, cuya expresión está involucrada en vías de señalización, que son inducidas durante eventos como las interacciones biológicas y el estrés abiótico. Para sobrevivir en condiciones estresantes, las plantas han desarrollado múltiples estrategias para aliviar el daño. Una de las estrategias es eliminar las proteínas y los orgánulos dañados (Su et al., 2020). La autofagia, es un proceso constitutivo evolutivamente conservado en eucariotas, que involucra algunos sistemas de degradación y tráfico vesicular, así como también del reciclaje de compuestos de reserva (Hanamata et al., 2014). Desde su descubrimiento en los años sesenta, la autofagia ha sido ampliamente estudiada a través de técnicas como la microscopía electrónica y confocal, utilizando marcadores bioluminiscentes que son específicos de autofagia. Por medio de estas técnicas, se puede observar en células únicas, la presencia de autofagosomas y autofagolisosomas, que pueden visualizarse como estructuras vesiculares de doble membrana de aproximadamente 900 nm de diámetro ("*Fluorescence-Based Tools For Investigating Autophagy, Cells Under Stress",* 2016). Esta vía que regula la degradación ha sido muy estudiada en diferentes organismos y se ha vinculado su actividad al mantenimiento de la homeostasis celular. Es inducida por señales ambientales y estímulos durante el desarrollo. Los estudios moleculares realizados en algunas plantas modelo, han demostrado la gran importancia, que desempeña la autofagia en las células vegetales (Reumann et al., 2010). Hace algunos años se pensaba que la autofagia en plantas era un mecanismo de degradación inespecífico. Sin embargo, los nuevos

estudios interpretan a la autofagia, como un proceso multifuncional, dinámico y altamente selectivo. Estudios en plantas modelo como Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) y más recientemente en maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), etc., ha demostrado que la autofagia está mediada por proteínas ATG (*Autophagy-related*). Aunque no parece ser esencial, es importante durante la senescencia natural y supervivencia en condiciones limitantes de nitrógeno y de fijación de carbono, proporcionando un mecanismo dinámico para conectar la autofagia estrechamente al estado nutricional de una planta(Li & Vierstra, 2012). En algunas plantas de la familia de las leguminosas, como *Phaseolus vulgaris*, muestran que un proceso relacionado con la autofagia es crucial para las interacciones mutualistas de *P. vulgaris* con microorganismos beneficiosos como *Rhizobium tropici* y *Rhizophagus irregularis* (Estrada-Navarrete et al., 2016). La relación simbiótica que se establece entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno, de los géneros *Rhizobium, Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, han sido objeto de investigación. Para establecer una interacción con éxito, las leguminosas secretan compuestos isoflavonoides en las raíces de la planta que son detectados por las bacterias y atraídas hacia el pelo radical por un fenómeno de quimiotaxis. Una vez situadas las bacterias en el pelo radical de la raíz, inicia el proceso de infección, que activa un intercambio de señales moleculares entre la bacteria y la planta, que conlleva a la formación de nódulos que serán efectivos para la fijación del nitrógeno (Liu & Murray, 2016). La nodulación resulta ser un modelo fascinante de diferenciación celular, del desarrollo en plantas y de la interacción de leguminosas con microorganismos simbiontes del suelo. En esta interacción planta-microorganismo, la autofagia, podría jugar un papel importante en el tráfico vesicular para el reciclamiento intracelular, además de contender con la demanda energética que el proceso simbiótico requiere.

3.1 Proceso de señalización del reconocimiento entre leguminosas-rizobios y organogénesis del nódulo

La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por procariotas utilizando un complejo enzimático denominado nitrogenasa y hace que el N_2 atmosférico se reduzca a formas de nitrógeno asimilable para la planta, como el amoníaco. Debido a que el nitrógeno es un factor limitante clave para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La capacidad de las leguminosas para entrar en simbiosis con rizobios fijadores de nitrógeno, les proporciona una clara ventaja sobre otras especies de plantas. La formación del nódulo inicia en las raíces de la planta huésped que secretan compuestos isoflavonoides fenólicos hacia la rizosfera, los cuales son detectados por los rizobias. Cada rizobio responde a flavonoides particulares, determinando la especificidad de la relación simbiótica y estos a su vez activan la expresión de genes nod (nodulación). Lo que lleva a la producción y secreción de compuestos que son de tipo lipo-quitooligosacáridos, llamados factores Nod (FN). Estos son reconocidos por la planta atrayendo a las bacterias hacia la parte apical de los pelos radicales emergentes. A su vez, estos producen una serie de cambios, de tal manera que se interrumpe su crecimiento simétrico polar y se desvía la punta del pelo formando un enroscamiento donde se colonizan las bacterias, iniciando el proceso de infección. El ingreso de estas se da a través de la hidrólisis de la pared celular y posteriormente la invaginación de la membrana citoplasmática, dando lugar a una estructura de forma tubular llamada hilo de infección, que actúa como un pasaje para las bacterias, desde la epidermis hacia las células corticales de la planta. Al mismo tiempo se activa la división de las células del córtex para dar origen al primordio del nódulo. Los hilos de infección una vez que avanzan y alcanzan el primordio del nódulo; las bacterias son liberadas al citoplasma de estas células vegetales, en un proceso similar al de la endocitosis y la bacteria queda rodeada por una porción de membrana derivada de la planta, que recibe el nombre de membrana peribacteroidal, que forma lo que se conoce como simbiosoma (Figura 1) (Ferguson et al., 2010). En su interior, las células bacterianas son capaces de dividirse, y diferenciarse en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. Es entonces cuando el primordio nodular se convierte en un nódulo maduro (Maunoury et al., 2010).

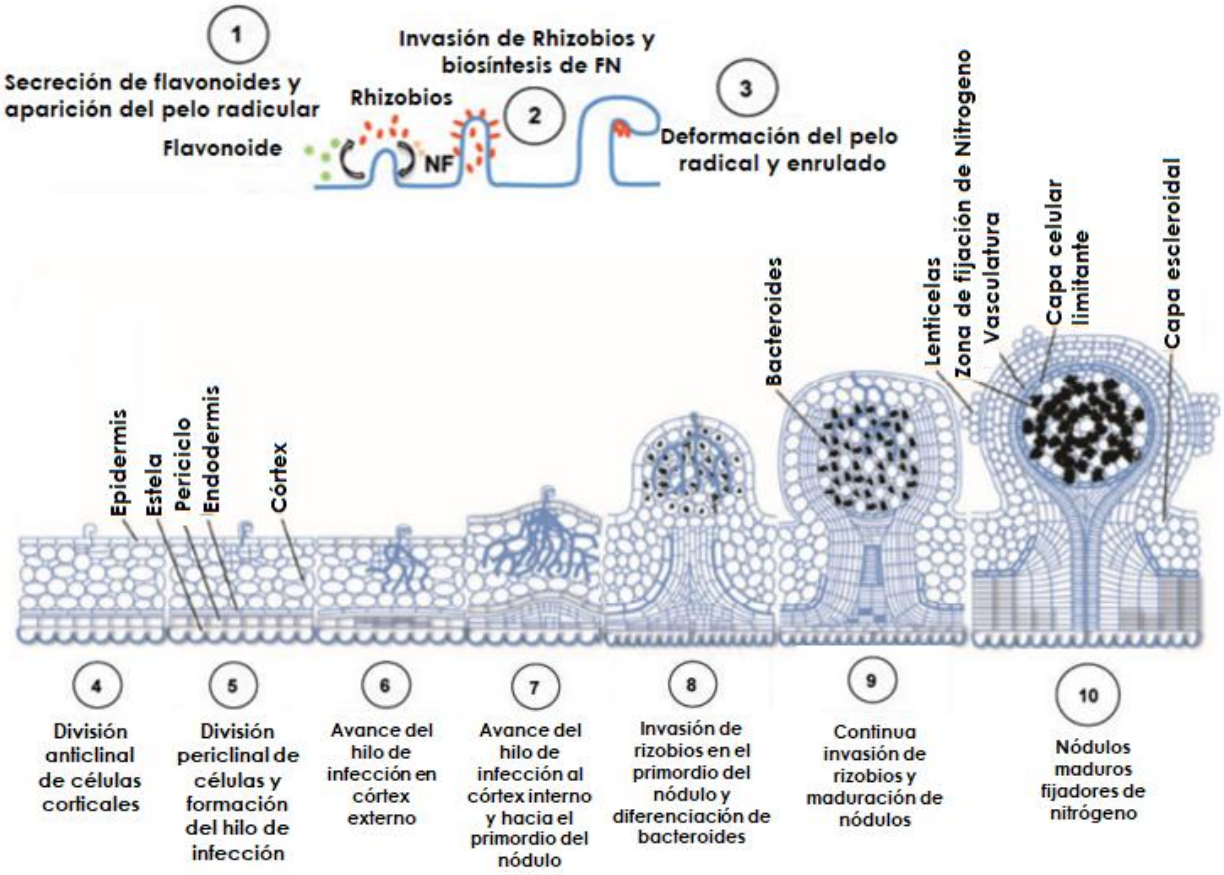

Figura 1. Etapas del desarrollo de un nódulo determinado. (1-3) En las etapas tempranas se observan las respuestas al rizobio en el pelo radical para la formación del hilo de infección. **(4-10)** Así como las diferentes etapas de avance de la infección en las células de la epidermis hasta la formación de un nódulo maduro fijador de nitrógeno. Se indican los eventos celulares en relación con los diferentes tejidos de la raíz. Modificado de Ferguson et al., 2010.

3.2 Tipos de nódulos

Existen dos tipos morfológicos de nódulos en leguminosas: determinados e indeterminados. El tipo de nódulo lo determina la planta huésped. Las principales diferencias entre los dos tipos de nódulos son el mantenimiento de una región meristemática, forma de los nódulos maduros, la vía de asimilación del amonio y en el tipo de metabolitos nitrogenados que exportan (Ferguson et al., 2010).

3.3 Nódulos Indeterminados

Los nódulos indeterminados, presentes en leguminosas como alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium repens*), guisante (*Pisum sativum*) y *Medicago truncatula*, tienen un meristemo persistente, lo que da como resultado nódulos de forma cilíndrica. El meristemo apical produce continuamente nuevas células que se infectan con bacterias (Ferguson et al., 2010). Debido a que están creciendo activamente, los nódulos indeterminados manifiestan zonas que demarcan diferentes etapas de desarrollo; estos nódulos se desarrollan en el córtex interno de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de amidas.

3.4 Nódulos determinados

Los nódulos determinados están presentes predominantemente en leguminosas de especies tropicales y subtropicales, como la soja (*Glycine max*), haba de la india (*Pongamia pinnata*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), suelen ser esféricos, carecen de un meristemo persistente y no muestran un gradiente de desarrollo. En los nódulos determinados maduros se observa una población relativamente homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, ya que la diferenciación de las células infectadas se produce de forma sincrónica, seguida de senescencia. Estos nódulos se desarrollan en el córtex externo de la raíz y exportan el nitrógeno en forma de ureidos (Ferguson et al., 2010).

3.5 Autofagia

La autofagia es una antigua vía de tráfico de membranas que media el reciclaje celular durante el estrés y la diferenciación celular. Esta vía se caracteriza por secuestrar y transportar porciones citoplasmáticas u orgánulos completos a la vacuola para su reciclaje o a la membrana plasmática y su secreción. A diferencia del sistema ubiquitina (Ub) – proteasoma relativamente inmóvil, la autofagia es capaz de transportar moléculas, complejos proteicos e incluso orgánulos a larga distancia (Marshall & Vierstra, 2018). La característica morfológica que distingue a la autofagia, comparada con otros procesos de tráfico intracelular mediado por vesículas, es la formación de *novo* de vesículas de doble membrana, que

secuestran el material citoplasmático a degradar por la vacuola (Porta & Jiménez-Nopala, 2019) Inicialmente, la autofagia se descubrió como un mecanismo de degradación masiva no selectiva que proporciona energía y componentes básicos para la supervivencia durante el estrés por inanición. Sin embargo, ahora está bien establecido que la autofagia es altamente selectiva y está estrictamente regulada (Signorelli et al., 2019).

En plantas se han identificado dos tipos de autofagia con distintos mecanismos: microautofagia y macroautofagia. Sin embargo, aunque se han identificado tanto la macroautofagia como la microautofagia, se estudia mejor la función y el mecanismo de la macroautofagia (Pu et al., 2017). En este trabajo la autofagia en lo sucesivo se refiere a la macroautofagia (Figura 2). Durante la microautofagia, los componentes citoplásmicos se agrupan en la superficie de la vacuola y son absorbidos a través de la invaginación del tonoplasto. Luego, el tonoplasto sufre una escisión para liberar cuerpos autofágicos, que son vesículas intravacuolares que contienen el material citoplasmático a degradar. Por otra parte, cuando se activa la macroautofagia, se forma una estructura de membrana en forma de copa llamada fagóforo, en plantas proviene principalmente del retículo endoplásmico (RE) y plastidios, entre otros. El fagóforo secuestra los componentes citosólicos, se expande y finalmente se sella como una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma, en la cual, su membrana externa finalmente se fusiona con el tonoplasto y se libera un cuerpo autofágico a la vacuola. Tanto para la microautofagia como para la macroautofagia, la ruptura de la membrana autofágica expone el contenido luminal a hidrolasas vacuolares, que degradan la carga en sus partes constituyentes para exportarla de regreso al citoplasma. Además, la levadura y posiblemente las plantas usan vesículas autofágicas más pequeñas para entregar una carga funcional a la vacuola a través de una ruta de dirección de citoplasma a vacuola (Marshall & Vierstra, 2018).

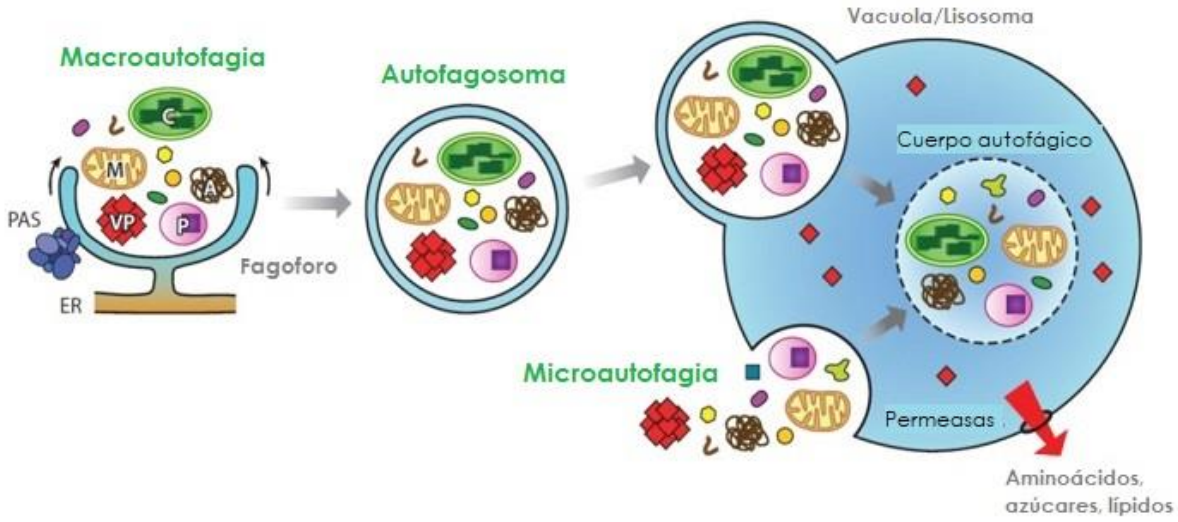

Figura 2. Tipos de autofagia en plantas. Durante la microautofagia los componentes citoplásmicos se agrupan en la superficie de la vacuola y son absorbidos a través de la invaginación del tonoplasto, mientras que la macroautofagia se forma una estructura de novo en forma de copa que se irá elongando alrededor de la carga, para ser transportada a la vacuola. (Modificado de Marshall & Vierstra, 2018.

La formación de autofagosomas incorpora los productos de muchos genes de autofagia (ATG). Los genes ATG se descubrieron por primera vez en la levadura y posteriormente, se encontraron genes homólogos en plantas y animales. De los 50 genes ATG descubiertos en levadura, se encontró que 18 son esenciales para la formación de autofagosomas y forman parte de la ruta canónica de la autofagia (Bassham, 2015; Klionsky et al., 2021). En *Arabiposis*, se han identificado todos los genes de la maquinaria central, los cuales se encuentran como genes únicos o pertenecen a una familia génica (Yu et al., 2018). Varios de estos factores se ensamblan en complejos que promueven jerárquicamente la inducción de la autofagia en función del estado nutricional y desarrollo de la planta.

El proceso autofágico puede ser ordenado de la siguiente manera: I) Eventos tempranos que involucran una cascada donde la quinasa TOR1 (Target of Rapamycin) inhibe el proceso, en condiciones ricas de nutrientes, TOR y otras quinasas inducen la hiperfosforilación de ATG13 y la hipofosforilación de ATG1

impidiendo la formación del complejo ATG1/ATG13. Bajo condiciones de estrés o inanición, este proceso se invierte, lo que permite que el complejo se ensamble y active. II) La quinasa ATG1 activada promueve inserción de lípidos mediada por ATG9 y la activación del complejo PI3K (Vps34) /ATG6 (Beclin1) /ATG14/ Vps15. La interacción de PI3K clase III y ATG6 media la nucleación de vesícula y decora el pre-autofagosoma con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), el cual atraerá a diversas proteínas que provocan la evaginación y desprendimiento de las porciones de membrana. III) La conjugación de las proteínas ATG8 con fosfatidiletanolamina (PE) para formar ATG8-PE que decora la membrana del autofagosoma y es esencial para la expansión y maduración del fagóforo (Figura 3). IV) El autofagosoma es transportado hacia la vacuola donde se fusiona con el tonoplasto. La membrana externa del autofagosoma se incluye en el tonoplasto y la vesícula resultante se descarga en el interior de la vacuola como un cuerpo autofágico. Este último libera su contenido para su degradación y la posterior generación de materiales para su reutilización (Marshall & Vierstra, 2018).

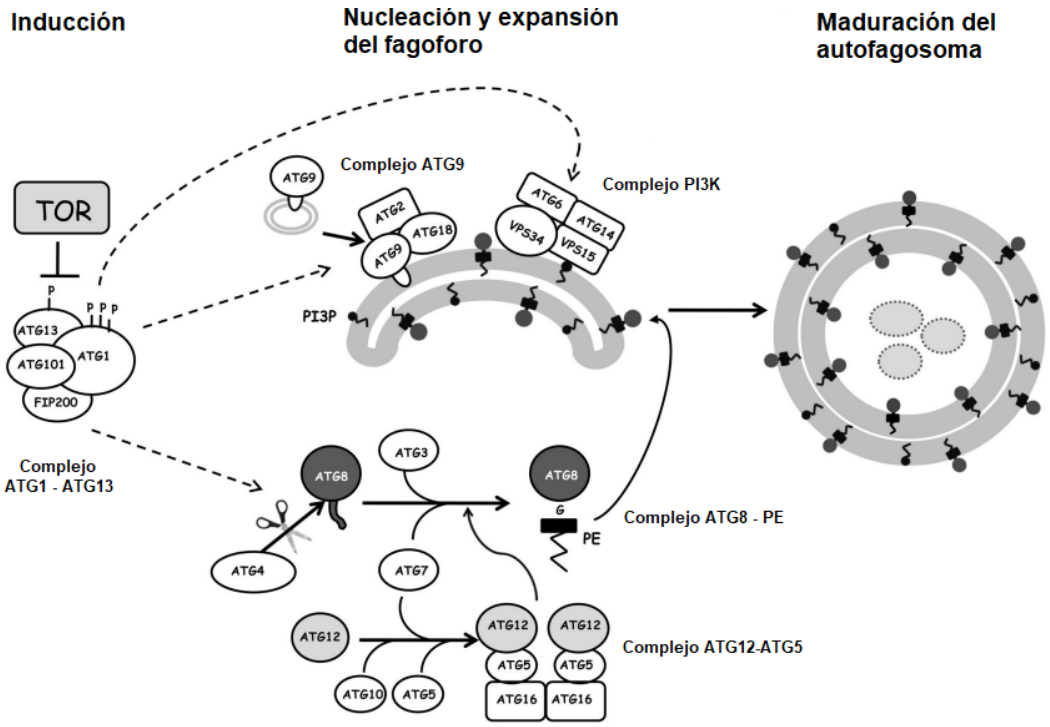

Figura 3. Proceso de formación de autofagosomas. Inducción: en condiciones de inanición o escasez de nutrientes, se llevará a cabo la inhibición del regulador negativo TOR quinasa, que da

como resultado la desfosforilación de ATG13. ATG13 se une a ATG1 y forma el complejo ATG1-ATG13, iniciando así la formación de autofagosomas, por medio de activación de complejos. **Nucleación y expansión del fagóforo**: el complejo proteico ATG9 libera lípidos; La nucleación es proporcionada por PI3K que produce PI3P. Dos complejos similares a la ubiquitina, ATG12-ATG5 y ATG8-PE, regulan el tamaño, la curvatura y la velocidad de expansión del autofagosoma. **Maduración del autofagosoma**: después de la formación del autofagosoma, las proteínas implicadas en la formación del autofagosoma se disocian. El autofagosoma maduro decorado con ATG8 se transporta a la vacuola para su fusión y liberación de cuerpos autofágicos. Modificado de *Ryabovol & Minibayeva, 2014.*

3.6 La proteína ATG8

ATG8 es una proteína tipo ubiquitina que se encuentra decorando la membrana externa e interna del autofagosoma por lo que ha sido ampliamente utilizado como marcador de autofagosomas, cuando se fusiona a la proteína verde fluorescente. Además, es esencial en todas las etapas del proceso autofágico y el reclutamiento selectivo de carga. Se ha visto directamente involucrada durante la expansión del fagóforo, tráfico y fusión vacuolar de autofagosomas. ATG8 se identificó por primera vez en *S. cerevisiae* y guarda homología con las proteínas LC3 y GABARAP de mamíferos. En total, el genoma humano contiene siete genes Atg8 funcionales (LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2). Sin embargo, en plantas, el número de ortólogos Atg8 varía de 1 gen en las algas a 22 genes en algunas angiospermas, en plantas como *Arabidopsis thaliana* y la soja (*Glycine max*), se han encontrado 9 y 12 genes Atg8, respectivamente. La caracterización genética de los genes Atg8 sugiere que son funcionalmente redundantes. Sin embargo, estudios recientes han revelado la especialización funcional de las variantes de ATG8 en humanos, lo que nos demuestra que cambios sutiles en las isoformas de Atg8 pueden proporcionar diferentes propiedades funcionales (Martens & Fracchiolla, 2020).

Las proteínas ATG8 generalmente contienen un dominio ubiquitina, un sitio N-terminal de unión a microtúbulos que permite el transporte del autofagosoma a la vacuola, un sitio de unión a ATG7 y un residuo de glicina (G) en su extremo C-terminal necesario para la lipidación de ATG8 (Figura 3; Ryabovol & Minibayeva,

2016). ATG8 se expresa como precursor citosólico con una secuencia adicional en su extremo carboxilo terminal y requiere de modificaciones postraduccionales. La proteína ATG4 realiza un corte en el extremo carboxilo-terminal para exponer un residuo de glicina (G). Este residuo se requiere para unir covalentemente ATG8 a fosfatifiletanolamina (PE) mediante dos sistemas de conjugaciones que involucran ATG7, ATG10, ATG3, ATG5, ATG12 y ATG16 (Figura 4) (Johansen & Lamark, 2020).

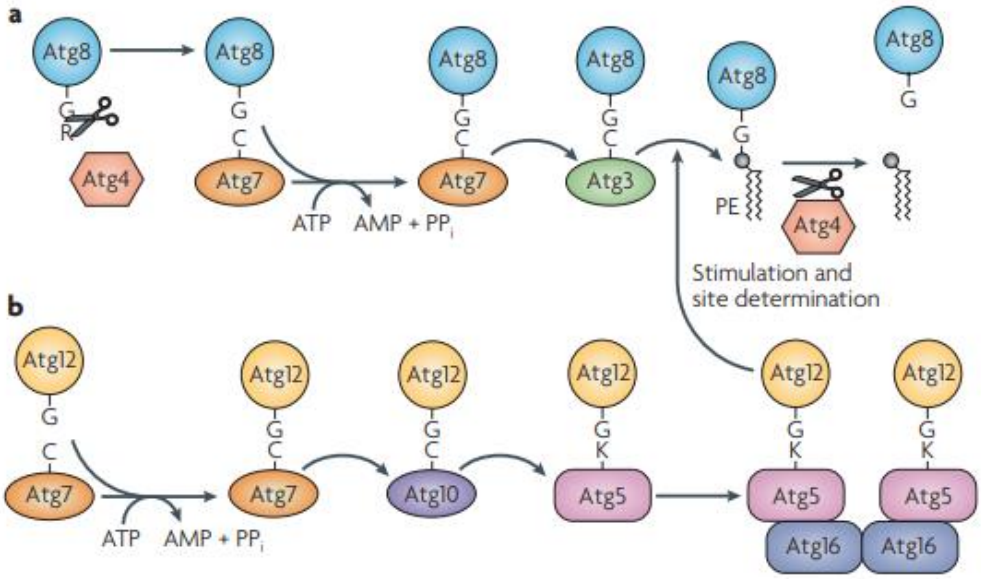

Figura 4. Vías de conjugación de ATG8. a) Para la conjugación de Atg8 a PE, primero, Atg4 corta el residuo arginina (R) del extremo carboxilo-terminal para exponer un residuo de glicina (G). Después, Atg8 es activado por Atg7 (una enzima E1) utilizando energía en forma de ATP y se transfiere a Atg3 (una enzima E2) y finalmente se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE). Atg4 también escinde el enlace amida entre Atg8 y PE para liberar la proteína de las membranas. **b)** El sistema de conjugación de Atg12. Atg12 se conjuga con el residuo lisina (K) específico de Atg5 de una manera similar a la reacción de conjugación de Atg8, excepto que Atg10 funciona como la enzima E2 en este sistema en lugar de Atg3. El conjugado Atg12 – Atg5 interactúa con Atg16 y forma un oligómero. La reacción de transferencia de Atg8 a PE, es impulsada por este complejo. Modificada de Nakatogawa et al., 2009.

La conjugación de las proteínas ATG8 con fosfatidiletanolamina (PE) es esencial para la expansión de la membrana del autofagosoma, ya que reclutan factores para

su maduración. Son importantes para el tráfico y fusión con la vacuola, además de convertir la membrana del autofagosoma en un objetivo fácil para las hidrolasas vacuolares.

4 ANTECEDENTES

La autofagia se ha monitoreado mediante el uso de marcadores moleculares, genes o proteínas reporteras fusionados a proteínas específicas de autofagia. Como se describió, ATG8 se encuentra decorando la membrana del autofagosoma, la proteína más apropiada para el monitoreo de autofagia. Pu & Bassham, 2016, nos muestran que ATG8 fusionado con proteínas fluorescentes puede utilizarse como un marcador específico de autofagosomas. Así como algunos colorantes acidotrópicos como monodansylcadaverine (MDC), que tiñen compartimientos celulares ácidos, entre ellos los autofagosomas (Figura 5). Y que además el uso de inhibidores de autofagia, como la Concanamicina A (inhibe a las hidrolasas elevando el pH vacuolar), puede facilitar la visualización de autofagosomas.

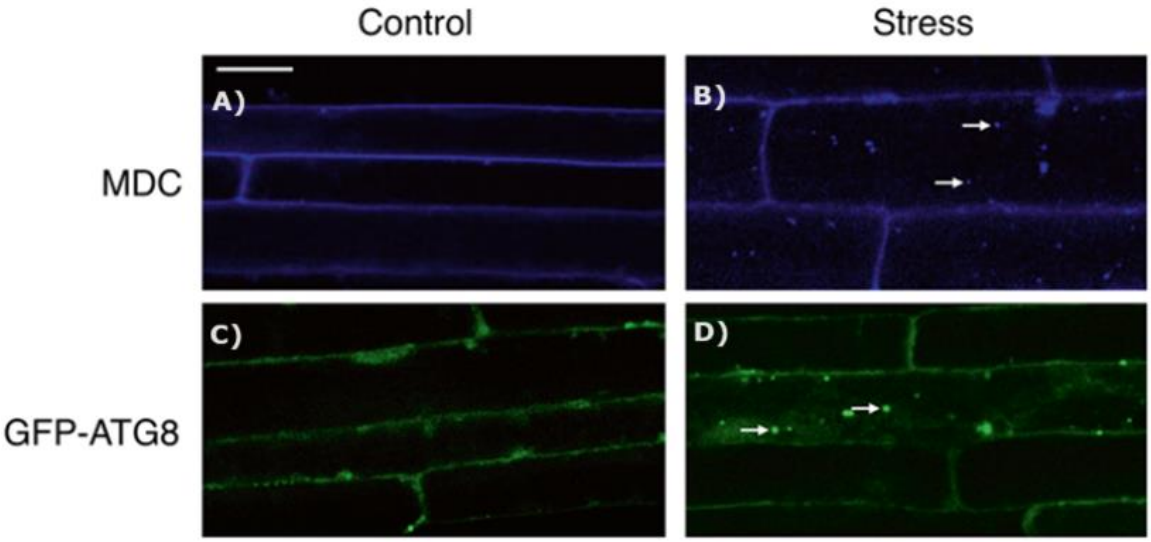

Figura 5. Imágenes de autofagosomas en células de la raíz de Arabidopsis. A-B) Las muestras fueron teñidas con Monodancil-cadaverina (MDC) **C-D)** o marcados con GFP-ATG8e y observadas por microscopía confocal. **B y D)** En las células de Arabidopsis con el tratamiento de estrés, se observaron autofagosomas en la zona de elongación de la raíz. Los puntos fluorescentes azules y verdes están indicados por flechas blancas. Barra de escala = 20 µm *(Pu & Bassham, 2016)*.

El estudio de la autofagia en los sistemas vegetales es un tema importante, ya que se le ha asociado ampliamente como una respuesta al estrés abiótico, más comúnmente por falta de nutrientes y que además ha sido poco estudiado en leguminosas. En el trabajo de soya (*Glycine max*; Xia et al., 2012) se identificaron once isoformas en su genoma, actualmente 12 (GmATG8a-k), también se examinaron los niveles de transcrito de las GmATG8s que podrían ser inducidos por un estado de privación de nitrógeno. Mediante RT-PCR se detectó un ligero incremento de transcrito en hojas primarias de todos los GmATG8s en plántulas de soja privadas de nitrógeno durante 3 días. Cuando el tiempo de inanición se prolongó a 6 días, se observó el pico más alto en la GmATG8c (Figura 6). Lo que indicaba que GmATG8c era un gen que respondía en condiciones de estrés por falta de nitrógeno (Xia et al., 2012).

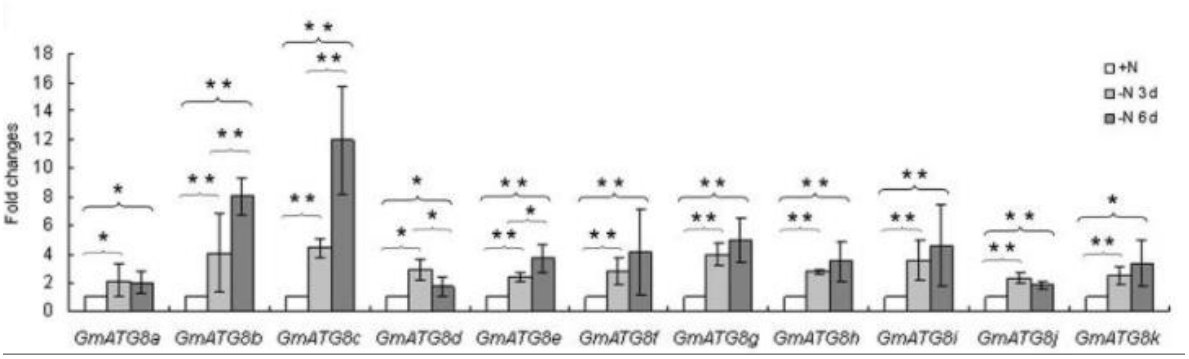

Figura 6. Niveles de expresión de los once parálogos de ATG8 en *Glycine max*, durante un periodo de privación de nitrógeno de 3 y 6 días. Se muestran diferencias significativas entre la presencia (+) y deficiencia (-) de Nitrógeno (N), así como un incremento en los niveles más altos de expresión del transcrito de GmATG8c (Xia et al., 2012).

La expansión de ATG8 puede haber facilitado la especialización funcional proporcionado ventajas selectivas para el estilo de vida sésil de las plantas (Kellner et al., 2017). Esto lo demostró Sláviková et al., 2005, donde logró analizar en plantas de Arabidopsis cinco construcciones diferentes de Atg8´s con su promotor (proAtAtg8-GUS). Se observaron patrones de expresión diferencial en distintos

tejidos, que implican que las proteínas cumplen múltiples funciones no redundantes en plantas (Figura 7).

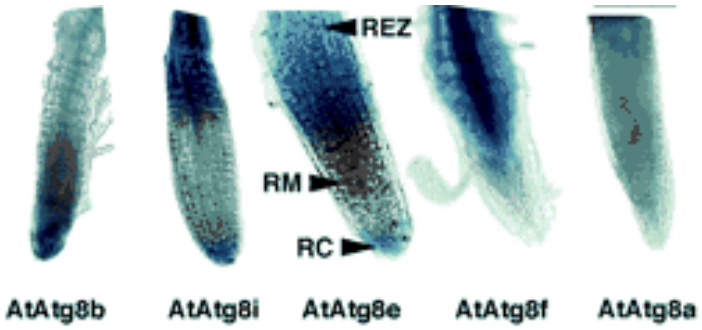

Figura 7. Expresión de cinco isoformas de ATG8 en raíces de Arabidopsis thaliana. Imagen de los tejidos de la raíz utilizando cinco construcciones de ATG8´s con su promotor, con el ensayo histoquímico de Glucuronidasa (GUS). REZ, zona de elongación de la raíz; RM, meristemo de raíz; RC, cofia de raíz. (Sláviková et al., 2005).

También se ha reportado que la expresión de los genes de autofagia como ATG9, ATG4 y ATG8 incrementa durante el inicio de la senescencia foliar, lo cual confirma que la autofagia tiene un papel importante durante el estrés (Htwe et al., 2011).
Nuestro grupo de trabajo también publicó que la autofagia podría estar involucrada en interacciones simbióticas, ya que durante el silenciamiento de genes de autofagia como Atg6 y PI3K-del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se inhibe la simbiosis. Con PI3K-RNAi se vieron afectados el número de hilos de infección y los niveles de transcrito de Atg8, así como los componentes del complejo PI3K-claseIII (Vps15 y Ayg6) (Figura 8 A). Mientras que con Atg6-RNAi disminuyó el número de nódulos (Figura 8 B y C). Por otro lado, Nanjareddy et al., 2016, demostró mediante RT-qPCR que la regulación negativa de PvTOR (RNAi-PvTOR) indujo significativamente la expresión de los genes ATG1, ATG13 y ATG8 (Figura 3D). Estos resultados indican que TOR regula negativamente los genes de autofagia en raíces del frijol (Figura 8 D).

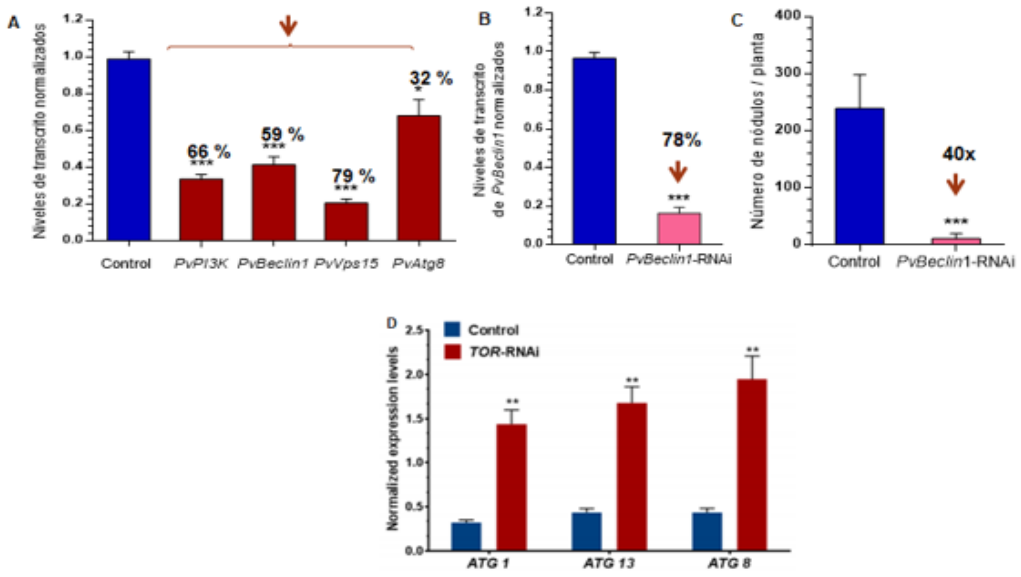

Figura 8. La pérdida de función de PvPI3K disminuye los niveles de transcrito de los genes de autofagia PvBe1/Atg6, PvVps15 y PvAtg8. Mientras que en la pérdida de función de PvTOR aumentan Atg1, Atg13 y Atg8. A) El análisis de la cuantificación por qPCR de los niveles de transcrito mostró que los genes de autofagia Pv-Beclin1, Pv-Vps15 y Pv-Atg8 se regula negativamente por la pérdida de función de Pv-PI3K. **B**) Los niveles de transcrito de PvAtg6-RNAi disminuidos un 78%. **C**) afectan la nodulación drásticamente comparados con las raíces control. Por el contrario, el análisis de RT-qPCR muestra un aumento en los niveles de expresión de ATG1, ATG13 y ATG8 en las raíces TOR-RNAi en relación con las raíces transgénicas control (Estrada-Navarrete et al., 2016; Nanjareddy et al., 2016).

En Arabidopsis el grupo de Guiboileau y col., 2012 mostró que la autofagia es esencial para la removilización del Nitrógeno y para el llenado de semillas. La misma característica fue demostrada en el maíz por Li y col., 2015. Más recientemente, por medio de la sobreexpresión de ATG8 bajo diferentes promotores en *Arabidopsis*, Chen y col., 2019 demostraron que la sobreexpresión de la autofagia se ve relacionado con la eficiencia de la removilización del nitrógeno en condiciones de nitrato completo. Particularmente en las construcciones UbQ-ATG8a y UbQ-ATG8g, que también tuvieron un rendimiento superior en términos de %N de semilla y les quedaba menos Nitrato en sus restos secos. Esto se suma a otros estudios que

sugieren que aumentar la expresión de genes de autofagia puede proporcionar beneficios para el rendimiento de la planta, entre ellos, un mejor aprovechamiento de nutrientes.

5 JUSTIFICACIÓN

El estudio bioinformático y las técnicas moleculares aplicadas en diferentes plantas modelo, como *A. thaliana*; han demostrado la importancia que desempeña ATG8 en la autofagia en las células vegetales. La actividad de la proteína ATG8 está involucrada en el tráfico vesicular y acoplamiento de fosfolípidos a la membrana del autofagosoma (Yamaguchi et al., 2010), así como en el reconocimiento y fusión con la vacuola. En plantas leguminosas los estudios de autofagia son muy limitados, por ende, el planteamiento y desarrollo de este trabajo contribuirá en la caracterización de este proceso en plantas de cultivo de interés nutricional. Específicamente en el modelo biológico de la leguminosa *P. vulgaris* en interacción con la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium tropici*.

6 HIPÓTESIS

Dado que el silenciamiento de dos genes que forman parte del complejo PI3K-claseIII de autofagia, PvAtg6 y PvPI3K disminuyen la nodulación de frijol y además PI3K disminuye los niveles de transcrito de ATG8. El estudio filogenético de la familia Atg8 de frijol y la fusión de la región promotora de Atg8 a las proteínas reporteras, la verde fluorescente y β-glucuronidasa (proPvAtg8-GFP:GUS), permitirá analizar su expresión durante el proceso de autofagia en la simbiosis. Mediante la interpretación de los patrones de expresión de PvATG8 ya reportados y en los tejidos de raíces transgénicas de *Phaseolus vulgaris* durante el proceso de interacción simbiótica podemos conocer sobre su participación.

7 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los genes PvAtg8 de autofagia bajo déficit de nitrógeno y en condiciones de simbiosis nodular de *Phaseolus vulgaris*.

8 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar “in silico” la agrupación de los miembros de autofagia de la familia PvAtg8 mediante el análisis filogenético con otras especies de plantas.
2. Evaluar la expresión de los genes PvAtg8 en condiciones con y sin déficit de nitrógeno y en condiciones simbióticas de frijol.
3. Obtener una construcción con el promotor de PvAtg8 fusionado a un gen reportero (GUS) que permita visualizar su regulación en la nodulación de frijol.

9 METODOLOGÍA

9.1 Análisis bioinformático de-ATG8 en el genoma de *P. vulgaris*

Para determinar las secuencias homólogas de AtATG8s en el genoma de *P. vulgaris*, se llevó a cabo una búsqueda informática utilizando el algoritmo BLASTP en la base de datos de PHYTOZOME v12.1. Posteriormente, las secuencias codificantes se compararon con las recopiladas en el trabajo de Kellner et al., (2017). Para poder darle nombre a los genes Atg8 de *Phaseolus vulgaris*, se realizó un árbol de secuencias de aminoácidos de proteínas ATG8. A continuación, se alinearon mediante el algoritmo de MUSCLE las secuencias ATG8’s de 7 algas verdes, el musgo *Physcomitrella patens* y 6 angiospermas (*Arabidopsis thaliana, Glycine max, Phaseolus vulgaris, medicago truncatula, Nicotiana bethamiana y Zea Mays*) de diferentes familias, tomando a *Saccharomyces cerevisiae* como raíz. El árbol filogenético se realizó por máxima verosimilitud mediante la paquetería MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) con 1000 repeticiones de confiabilidad.

Para determinar la distribución de las cajas o motivos de regulación de expresión de genes PvAtg8's en su región promotora, se realizó el análisis de esta con el programa en línea PlantPAN (Chang et al., 2008). Se encontraron cajas de regulación durante la nodulación (NOD) y desarrollo de raíz.

Por último, para seleccionar genes Atg8 de frijol con función potencial durante el proceso de nodulación, se analizaron los niveles de acumulación de transcritos de los diferentes genes de la familia génica de los Atg8's en el Atlas de Expresión génica de *P. vulgaris* (O'Rourke et al., 2014).

9.2 Diseño de primers y clonación

Para cuantificar los niveles de transcritos de los genes Atg8 en raíces y nódulos de frijol, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada secuencia utilizando el programa SnapGene. Para la generación de las construcciones destinadas al análisis de la actividad del promotor de los genes PvAtg8-33d y PvAtg8-96f2, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar 2.1 kb y 1.2 kb, respectivamente, río arriba del inicio de la traducción. Dado que la clonación de estos fragmentos se llevó a cabo inicialmente en el vector PENTR-D-TOPO de Invitrogen (Hartley et al., 2000), se añadió en el extremo 5' del oligonucleótido Forward la secuencia CACC, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para asegurar una correcta direccionalidad del fragmento a clonar. Se utilizó la tecnología GatewayR para clonar secuencias de ADN destinadas al análisis funcional y expresión en múltiples sistemas (Catálogos números 12535-019 y 12535-027).

Debido al tamaño considerable de los promotores y a la complejidad de su amplificación, se diseñaron oligonucleótidos específicos internos para cada promotor (véase la Tabla S1). Esto permitió la amplificación de regiones más pequeñas que pudieran confirmar la presencia del promotor dentro de los diferentes vectores.

9.3 Construcción de plásmidos

Río arriba del sitio de inicio de traducción de PvAtg8-33d y PvAtg8-96f2, se amplificaron 2.1 kb y 1.2 kb de la región promotora, respectivamente. A partir de ADN genómico de frijol utilizando los oligonucleótidos específicos de cada promotor, se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector pENTR-D-TOPO (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó la transformación por choque térmico en células de *E. coli* Top10 (Invitrogen), y se crecieron en placas de agar LB con kanamicina (el plásmido tiene el gen de resistencia a este antibiótico, Km) para su selección. A continuación, se realizó PCR en colonia para detectar cuales tenían el fragmento de interés y a las colonias positivas, se les realizó una extracción de ADN plasmídico utilizando un kit de purificación de ADN Miniprep (Fermentas). Las construcciones se verificaron por PCR y secuenciación de DNA. La reacción Gateway LR se realizó de manera independiente entre los vectores de entrada pENTR-D-TOPO-proPvAtg8-96f2 y pENTR-D-TOPO-proPvAtg8-33d con el vector destino pBGWSF7.0, que permite la expresión de la proteína reportera β-glucoronidasa (GUS), en fusión con la proteína GFP, bajo el control del promotor de interés (Karimi et al., 2002), según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Por último, se realizó una transformación del vector binario para obtener pBGWSF7.0-proPvAtg8-96f2:GFP-GUS y pBGWSF7.0-proPvAtg8-33d:GFP-GUS en *Agrobacterium rhizogenes* K599 para el análisis de promotor en plantas compuestas de frijol.

9.4 Material biológico

Para poder obtener material para el análisis de la acumulación de transcritos y la generación de raíces compuestas, se germinaron semillas de frijol WT (*P. vulgaris*) cv. Negro Jamapa. Para esto se realizó una desinfección lavando con agua estéril cuatro veces y una vez con etanol al 90% por un minuto. Se repitió el lavado con agua estéril y finalmente se dejaron en una solución de cloro al 20% por 5 minutos. Después de haber desinfectado las semillas, se colocaron en una charola, sobre toallas de papel humedecidas con 200 ml de agua estéril. La charola se cubrió con papel aluminio y se incubó en una cámara de germinación a una temperatura de

28ºC durante dos días post-germinación (dpg). Para los análisis en raíces silvestres (WT) con nitrógeno, las plantas de 2 dpg se transfirieron a pequeñas macetas con sustrato vermiculita estéril y se mantuvieron en riego cada tercer día con 40 ml de medio B&D (Broughton & Dilworth, 1971). Con diferentes concentraciones de nitrógeno (0.1 mM, 2mM, 5 mM y 10 mM de nitrógeno) y sin nitrógeno como plantas control, hasta el momento de su colecta.

9.5 Generación de plantas de frijol con raíces transgénicas

Para obtener raíces transgénicas con las construcciones de interés, se empleó el protocolo descrito por Estrada-Navarrete et al., 2007 con algunas modificaciones. Primero se germinaron las semillas de frijol, con el protocolo descrito anteriormente. A continuación, se seleccionaron plantas de 2 dpg y se les realizó una herida en la raíz debajo del cotiledón; sobre la herida se infectó con alícuotas que contiene *Agrobacterium rhizogenes K599* transformada con la construcción deseada. Las plántulas se pasaron a tubos con medio líquido B&D sin nitrógeno y se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 24ºC, hasta que se observó la emergencia de raíces pilosas en la zona de la herida (aproximadamente 10 a 12 días post infección). Las raíces pilosas o raíces transgénicas que expresan los vectores proPvAtg8-96f2:EGFP-GUS y proPvAtg8-33d:EGFP-GUS se seleccionaron utilizando un estereomicroscopio de epifluorescencia basado en la fluorescencia de las proteínas roja (mRFP) y verde (EGFP) fluorescente, respectivamente.

9.6 Análisis de la actividad de promotor

Para determinar la actividad espaciotemporal del promotor de PvAtg8 de interés en raíces transgénicas de frijol durante el proceso de nodulación; se generaron raíces transgénicas, siguiendo el protocolo antes mencionado. Las plantas seleccionadas por fluorescencia se transfirieron a pequeñas macetas con vermiculita y se inocularon con la bacteria *R. tropici* CIAT899. La colecta de plantas se realizó a 7, 10, 14 y 21 días post inoculación (dpi). La actividad del promotor se analizó a través del gen reportero GUS, mediante una tinción GUS (Lee & Schöffl, 1997). Las raíces

seleccionadas se limpiaron y se colocaron en cajas Petri. Posteriormente se lavaron con la solución I (NaH_2PO_4 0.5 M, Na_2HPO_4 0.5 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0.1 M, $K_4Fe(CN)_6$ 0.1 M) y solución II (solución I, EDTA 0.5 M, TRITON 10%) durante 5 min a temperatura ambiente y se dejaron incubar en la solución de tinción GUS (Solución II, X-Gluc 100 mM) de 30 min a 3 hrs, dependiendo como se observa el avance de la reacción. Para detener la reacción colorida, las raíces se lavaron con agua destilada estéril y se aclararon con cloro al 1%. Finalmente, las raíces se almacenaron en glicerol 30%-DMSO 2%, hasta su observación al microscopio de campo claro.

9.7 Medición de los niveles de transcritos por RT-qPCR

Para poder evaluar los niveles de transcrito de los genes PvAtg8 en los distintos tratamientos, se realizó una extracción de RNA de tejidos de raíz y nódulos y se analizó por RT-qPCR.

Para los análisis en raíces de frijol silvestre (WT), seleccionamos plántulas de 2 dpg y se trasplantaron en pequeñas macetas con vermiculita. Las plántulas se inocularon con *R. tropici* CIAT899 o únicamente con medio B&D para el tratamiento sin inocular. A los tiempos seleccionados (3, 5, 7, 9, 14, 21 dpi) se colectaron las raíces de las plantas y se congelaron en nitrógeno líquido hasta el momento de extracción de RNA.

Para obtener peso seco de raíz y hojas, así como para la medición de transcritos de Atg8 en plantas crecidas con diferentes concentraciones de nitrógeno, se seleccionaron plántulas de 2dpg y se trasplantaron en pequeñas macetas con vermiculita; se les adiciono cada tercer día 40 ml de medio B&D adicionado con nitrato para los análisis de 0.1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM de nitrógeno; los tejidos de raíz y hojas se colectaron a 7, 14 y 21 días después y parte del tejido se utilizó para obtener el peso fresco y peso seco y la otra parte del tejido de la raíz se congeló en nitrógeno líquido, hasta el momento de extracción de RNA.

Para la extracción de RNA, se utilizó el protocolo con TRIzol® Reagent (Molecular Research Center, Inc. Cat. No. 15596-018), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras se incubaron en DNAsa libre de RNAsas para eliminar el

ADN contaminante, y la concentración e integridad del RNA se midió en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Nanodrop, Thermo Scientific) y se observó su integridad por electroforesis. Se sintetizó el cDNA utilizando un kit de la Transcriptasa Reversa (RevertAid Reverse Transcriptase 200 U/µl), siguiendo las indicaciones del proveedor (Thermo Scientific, Co).

La cuantificación de los niveles de transcritos de Atg8-96f2 y Atg8-33d se realizó mediante PCR semicuantitativa utilizando el gen del "Factor de elongación" (EF) como control constitutivo. La acumulación de transcritos de los genes Atg8 se cuantificó utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés), utilizando oligonucleótidos específicos (ver Tabla S1) y el fluoróforo SYBR Green (Thermo Scientific). Para corroborar la especificidad de cada oligonucleótido, se realizó un alineamiento de su secuencia en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

9.8 Análisis microscópico y de imágenes

Las raíces y los nódulos seccionados se analizaron en fresco, de raíces transgénicas colectadas a los 7, 10, 14 y 21 dpi bajo un microscopio óptico Olympus SZX7, (Japan). Las raíces transgénicas portadoras de la construcción se observaron en un DF PLAPO 1X con acercamientos desde 0.8×, 1.0, 1.25, 1.6, 2, 2.5, 3.2, 4, 5× y 5.6×.

10 RESULTADOS

10.1 Análisis in silico de los genes PvAtg8 de frijol

10.1.1 Identificación de la familia PvAtg8

Con el objetivo de realizar un análisis filogenético de los 6 genes Atg8 en frijol, se llevó a cabo una comparación con los genes Atg8 de *Arabidopsis thaliana*, que fueron los primeros en ser caracterizados y se utilizaron como referencia para la anotación. Se incluyeron 59 secuencias de Atg8´s de 14 diferentes organismos, tales como; 7 algas verdes, el musgo *Physcomitrella patens* y 6 angiospermas de

diferentes familias (*Arabidopsis thaliana, Glycine max, Phaseolus vulgaris, Medicago truncatula, Nicotiana bethamiana* y *Zea mays*), tomando a *Saccharomyces cerevisiae* como raíz. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9**, donde se observa que las 59 secuencias se agruparon en 2 clados principales, tal como se demostró previamente en el trabajo de Kellner et al., 2017. El clado I incluye la mayoría de los miembros de la familia de proteínas ATG8 en plantas y está estrechamente relacionado con los hongos. El clado II es más similar a los homólogos de ATG8 en animales. Curiosamente, algunas isoformas de ATG8 en plantas, como AtATG8h y AtATG8i en Arabidopsis, carecen de residuos de aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal después del residuo de glicina, lo que indica que estas proteínas ATG8 podrían interactuar con la membrana del autofagosoma sin necesidad de procesamiento por ATG4. Dentro del clado I, se identificaron las proteínas codificadas por los genes Phvul.002G062200 (Pv 22002 en azul turquesa) y Phvul.003G219600 (Pv 96001 en azul turquesa), los cuales están filogenéticamente cercanos al gen de la proteína AtATG8F (marcado en círculo azul turquesa). Por lo tanto, se decidió nombrar a las proteínas de frijol en relación con su distancia filogenética como PvAtg8-22-f1 y PvAtg8-96-f2, respectivamente. La proteína AtATG8d (círculo naranja) de *A. thaliana* se encuentra filogenéticamente cercano a la proteína de frijol del gen Phvul.011G103300 (Pv 3300 1 en naranja). Por lo tanto, se le asignó el nombre de PvAtg8-33d. Las proteínas de frijol codificadas por los genes Phvul.006G149640 (Pv 1600 1 en azul marino) y Phvul.003G079300 (Pv 9300 1 en azul marino) están filogenéticamente cercanos a AtATG8C. En consecuencia, se decidió nombrar las proteínas de frijol en relación con su distancia filogenética como PvAtg8-16-c1 y PvAtg8-93-c2, respectivamente. Finalmente, dentro del clado II se encuentra el gen Phvul.007G210800 (Pv 0800 1 en magenta), el cual está filogenéticamente cercano al gen AtATG8I (círculo magenta). Por lo tanto, se le asignó el nombre de PvAtg8-108i (**Figura 9**).

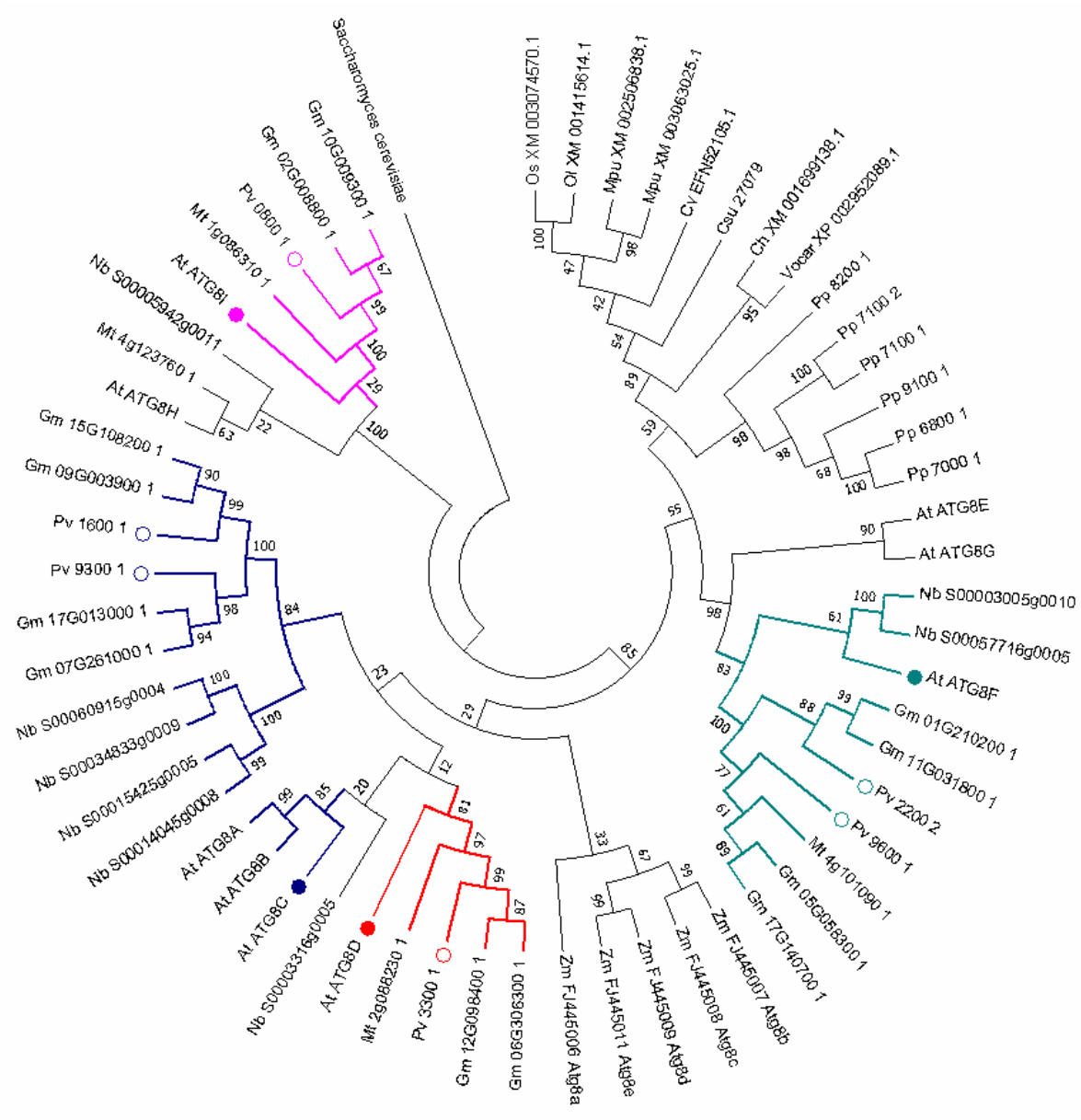

Figura 9. Árbol filogenético de la familia Atg8 de P. vulgaris comparada con diferentes organismos. La connotación de las isoformas de frijol se hizo conforme a los clados de la familia Atg8 de *Arabidopsis thaliana*; AtAtg8C (punto azul), AtAtg8D (punto rojo), AtAtg8F (punto verde), AtAtg8I (punto rosa). Los miembros correspondientes de la familia PvAtg8 de *P. vulgaris* se distingue con los círculos con el color de cada isoforma; PvAtg8-16001-c1 y PvAtg893001-c2 (círculos azules), PvAtg33001-d (círculo rojo), PvAtg8-22002-f1 y PvAtg896001-f2 (círculos verdes) y PvAtg808001-i (círculo rosa). El análisis filogenético se hizo utilizando las secuencias de aminoácidos de 65 Atg8´s de diferentes organismos. Las de plantas identificadas en la base de datos *Phytozome* utilizando el proceso de unión de vecinos en MEGA 11.

10.1.2 Análisis de la expresión de los genes Atg8 de frijol

Con la finalidad de seleccionar genes de la familia génica de Atg8 de frijol con una función potencial durante la nodulación, se realizó un análisis *in silico* del perfil de expresión en diferentes tejidos de frijol, de acuerdo con lo reportado en el PvGEA (Atlas de Expresión Génica de Phaseolus vulgaris, https://www.zhaolab.org/PvGEA/; O'Rourke et al. 2014). Se observó que los genes PvAtg8-96-F2, PvAtg8-93-C2, PvAtg8-108-I y PvAtg8-33-d presentan la expresión más alta en nódulos inefectivos (NI, en rojo) recolectados a los 21dpi. A diferencia de lo que se observó en las isoformas PvAtg8s en nódulos efectivos (NE, en azul), así como en tejidos de raíz a diferentes tiempos de recolección (**Figura 10**). Es por este resultado es que fueron seleccionadas PvAtg8-96-F2 y PvAtg8-33-d para su posterior análisis funcional con N2 y en simbiosis.

GeneID	N5	NE	NI	RF	R5	RE	RI	RT
Phvul.003G219600.1 **(PvAtg8-F2)**	54	115	205	127	127	143	142	46
Phvul.003G079300.1 **(PvAtg8-C2)**	30	55	204	71	85	79	92	32
Phvul.007G210800.1 **(PvAtg8-I)**	37	56	201	105	124	127	132	68
Phvul.002G062200.2 **(PvAtg8-F1)**	23	33	100	41	39	44	47	15
Phvul.011G151600.1 **(PvAtg8-C1)**	9	8	46	10	17	15	16	18
Phvul.011G103300.2 **(PvAtg8-D)**	125	147	417	200	248	187	235	105

Figura 10. Perfiles de expresión in silico de la familia ATG8 de *P. vulgaris*. La generación del mapa de calor de la expresión de los seis genes PvAtg8 (GeneID del Phytozome 13, P. vulgaris v2.1), se obtuvo a partir de los datos del transcriptoma que incluye varios tejidos del Atlas de expresión génica de *P. vulgaris* (PvGEA). Se utilizaron los valores de Fragmentos por kilobase del modelo de exón por millón de lecturas mapeadas (FPKM) para cada gen Atg8. N5, Nódulos pre-fijación (efectivos) colectados 5 días después de la inoculación. NE, Nódulos que fijan colectados 21 días después de la inoculación. NI, Nódulos fijadores ineficaces colectados 21 días después de la inoculación. RF, Raíces enteras de plantas fertilizadas colectadas, al mismo tiempo que RE y RI. R5, Raíces enteras separadas de pre-nódulos fijadores de 5 días de edad. RE, Raíces enteras separadas de nódulos fix+ colectados 21 días después de la inoculación. RI, Raíces enteras separadas de nódulos fix- colectados 21 días después de la inoculación. RT, puntas de raíz, de 0,5 cm de tejido, recogidas de las plantas fertilizadas en la 2da etapa trifoliada del desarrollo. Los máximos (+) niveles de transcrito están indicados en rojo y los mínimos niveles (-) en azul.

10.1.3 Análisis de motivos de regulación NOD y ROOT en las secuencias promotoras

Se realizó un análisis de las seis secuencias promotoras de PvAtg8s (2 kb) con el fin de identificar cajas de regulación NOD que se sabe están relacionadas con los eventos de nodulación de raíz. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa en línea PlantPAN (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/). Según se muestra en la Tabla 1, se encontraron tres tipos diferentes de cajas de regulación: NODCON1GM (5'-AAAGAT) excepto para PvAtg8-96fc2, NODCON2GM (5'-CTCTT) y numerosos ROOTMOTIF TAPOX1 (5'-ATATT). Estos hallazgos proporcionan información valiosa para la selección de promotores a estudiar. Se ha demostrado en estudios realizados en soya (Stougaard et al., 1990), que las cajas de regulación NODCON1GM y NODCON2GM regulan la expresión de ciertos genes en células infectadas durante el proceso de nodulación. Por otro lado, la caja de regulación ROOTMOTIFTAPOX1 regula la expresión de genes involucrados en la organogénesis de la raíz, según investigaciones previas (Zhang et al., 2008). Los motivos de interacción con la proteína TGA9 (TGACG) que regula la expresión positiva de autofagia en *Arabidopsis* (Wang et al., 2020). Se encontró un motivo TGACG en la PvAtg8-22-f1 y en PvAtg8-96-f2 y 2 motivos en la PvAtg8-108-i.

Promotores 2kb	Caja de regulación NODCON1GM (AAAGAT)	Caja de regulación NODCON2GM (CTCTT)	Caja de regulación ROOTMOTIF TAPOX1 (ATATT)	Motivo de interacción de factores de transcripción TGA (TGACG)
PrPvAtg8_96(f2)	1	3	22	1
PrPvAtg8_33(d)	1	6	14	0
PrPvAtg8_108(i)	2	2	18	2
PrPvAtg8_93(c2)	0	4	15	0
PrPvAtg8_22(f1)	1	2	16	1
PrPvAtg8_16(c1)	2	5	22	0

Tabla 1. Análisis de motivos de regulación NOD, ROOT y TGA en los promotores de la familia Atg8 de *P. vulgaris*. El número de motivos encontrados en la secuencia promotora de las 6 isoformas de PvAtg8 se indican en la tabla.

10.2 Niveles de transcrito de PvATG8 durante el proceso de nodulación

El análisis de expresión de PvAtg8 se llevó a cabo en raíces inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 en etapas tempranas y tardías de la nodulación. Con el objetivo de determinar la expresión de PvATG8 durante la organogénesis del nódulo se realizó el análisis de la acumulación de transcrito por PCR tiempo real (RT-qPCR) durante eventos tempranos y tardíos post-inoculación, así como en raíces no inoculadas. Cabe resaltar que solo se realizó una réplica del ensayo, sin embargo, este resultado nos ayudó a dilucidar con qué genes trabajar. El análisis se llevó a cabo en raíces inoculadas y no inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899 durante etapas tempranas (0-144 hpi) y tardías (7-21 dpi). Durante las etapas tempranas no se encontraron diferencias significativas entre raíces inoculadas y no inoculadas (datos no mostrados). Sin embargo, en etapas tardías, al analizar raíces desnoduladas y nódulos, se observaron diferencias significativas, principalmente en los transcritos de PvAtg8-f1, en la cual hay un mayor número de transcrito en la raíz desnodulada que en nódulos. Mientras que principalmente los niveles de transcrito de los genes PvAtg8-d y PvAtg8-f2 mostraron un mayor número de transcritos en los nódulos (**Figura 11**). Estos 2 últimos genes fueron seleccionados para analizar su función, durante la nodulación, para ver si de alguna manera se especializaron como transcritos órgano-específicos.

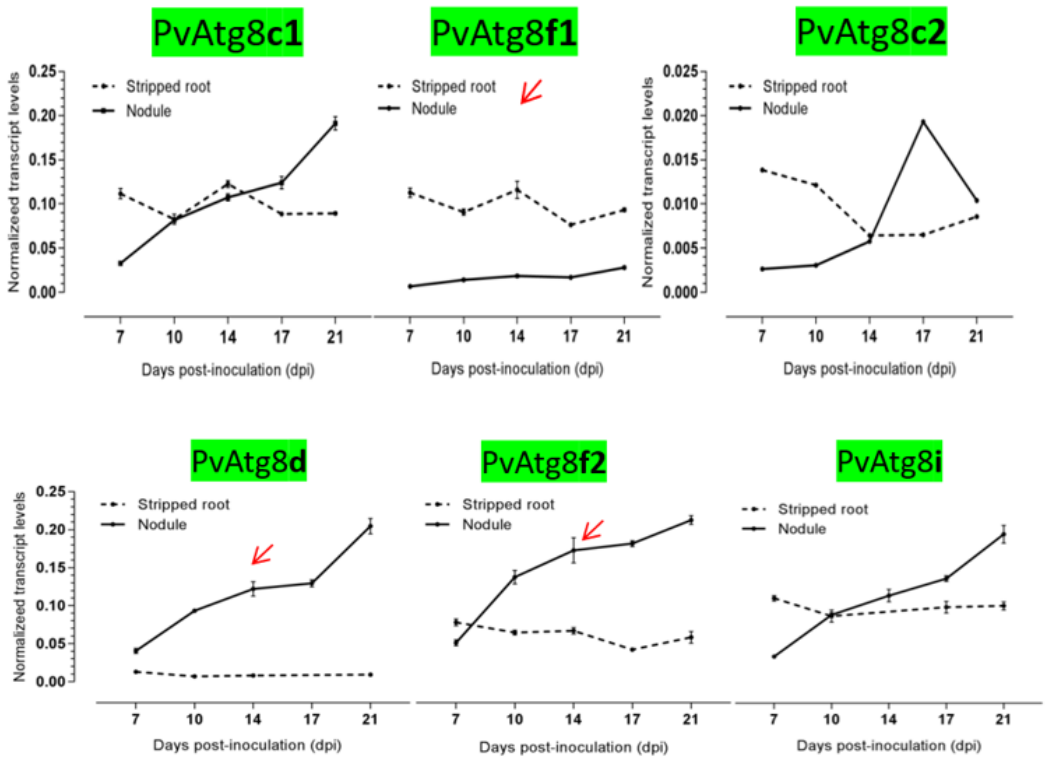

Figura 11. Niveles de transcrito de la familia Atg8 de frijol en raíces inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT899. A partir de nódulos de raíz y raíces desnoduladas de *P. vulgaris* se cuantificó por qPCR los niveles de transcrito de PvAtg8-c1, PvAtg8-c2, PvAtg8-d, PvAtg8-f1, PvAtg8-f2 y PvAtg8-i. Se observa un incremento en los niveles de transcrito a partir de 7dpi hasta 21 dpi en los nódulos de las isoformas PvAtg8-d, PvAtg8-f2 y PvAtg8-i comparadas con las raíces desnoduladas.

10.3 Actividad de promotores PvAtg8d y PvAtg8f2 en raíces transgénicas de frijol

10.3.1 Búsqueda y análisis de la secuencia promotora de PvAtg8d

El análisis de la secuencia promotora de PvAtg8-d se realizó en la base de datos de Phytozome v10. Se tomaron 2.5 kb río arriba de la secuencia codificante (**Figura 12**), se diseñaron oligos utilizando el programa SnapGene Viewer 4.3.10 para amplificar una región de 2.1 kb del promotor. En color verde se muestran las secuencias del oligo "*forward*" y en azul se muestra la localización de las secuencias

del oligo "*reverse*". La especificidad de los oligos se determinó realizando un análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990), la cual mostró homología únicamente con la región del promotor correspondiente.

>P.vulgaris v2.1|Phvul.011G103300|Chr11:11510661..11513013
GAACCAAATGGTCAAGTCACAATCC**GAGTTCTTGAACCAAATG**GTTAAGTACTATTATTGTGCTAGATCCAA
GCGGGTCGAAACAACTGAACTCGTTCATCCTTCAAATTGATCAACCTGTACATTTTTTCTAATTTCGAGTTGG
GGGGACTTATGTACATACCCCCAGTTACAATCAGATACATTCAAACCAATCACCACTCATTTAATATAATATT
TAAGGCACATAAATCAGACCATAACTCGGTTATAGATTACTAGCAATTATAGATTACTATTATAATATCCATT
TATATGTCATGAAAACTATTTATTGTTTTTCTCAATGGTCTGACTTCAACTAGACCTATAAATAAGTGATGAC
TCTCACAGTAAGGGGATACACTAAACTCTATTTTATACTCTTACTCTTAGCAGCTCTCTGTTAAGAATTTATCA
TTATCTTTGTACTCCTACTGACTTAAGTATCGGAGAGTCTTTTGAAGGTGGACCTCCCCCTCTCATCGGAGAC
CAACTAAAAGCTCGTTTCCTGAGGAACACGCAGTCCTCGCcCTCGGATTTCAAGCTAGGGGGACTTATGTAC
ATACCCCTACAACTAGATACATTCAGATCAATCACCGCTCATTTAATAGAATATTTAAGGTACATAAATCAGA
CAATAACTCGGTTACAGGTTACTAGTGGTTATAGGTTACTATTATAAAATTCATTTATATCTCATGCTAACTA
TTTATTGTTTTTCTTAATGGTCTGACTCCAATCATACCTATAAATAGATGATGACTTTATCTGTAAGGGGACA
CACTAAAATATATTCTATATTCTTACTCTTAGCATCTCTATGTTAAGAATTTACCATCATCGTTGTGCTTCTATT
GACTTAAGCAAAAGCTCATTCTCAACAAGTTGCACTCCCAAATTCATTTCTGGTAAGAACAAAAGTAAGAAC
AAATACTAATGATATACTCTTAGTAATAATAGAACGAGAAATGTTTATATTTTTCAACAGTTGAATTTAGTAA
AAATCATACAATAAATTGCGAGTAAAAAAAATTAATTTTAACTTATAATTGATTCATAGATTTCATAGAAAAA
TGATGACAAAACTATATTTATTTTCTATACTATAAATTCATTTCTTTTAATTTTATACTCACTATTTTTGTTTTTG
TGTATCTTTTAATCCATGAATTTTAATGGTAAGAAAACAAGAGATTAAAAATGATATATAAAGACAAAAATA
AATTATCTTTAAATATAATAACTACAAAGTGACATTTATAAAACTATAAAAATTAAACGAGTATTTAATCCAA
TTTTTAATTTCAATTTTATTTGAATTGGACTTTGTTTGAAAAAATTATATTTCGAAGTTTCTATAATTTCTTATT
TGTTTTCTTAATTTTCTTTTTTGAAGTGCTTACGAATAACTTTCCTCTAAACATATTGTTTAAATATTTTTTTCTT
AAATAAAAAAAAGTAAAAAAAAAAACAATTTTTAATAAAATTAACTCATACATAAATTAATATATAAAAATAC
TTTTATCATAGTGTGTTTAATAATTTTGACTTATACATAAATTAATATTAACTTTCCTATATATATATATATATT
TTACTTTTGATAATACTTACACTTTCATGAATTCGGATGATGTTTTATGAATTCCAAATTTTTTACTAGATAAA
GGAAGCAATCATTTTTGAAAACCAGTGGTTAACATTAAAATATACTTTAACTTAAATTTTTTAAATTAGAAAA
AATATTAAAAAATAACAGATAATTTAAGTTAGAAAATATTTTAAATTTTAAATTTGTTAACCTTTTTAATTAAA
AAGATTAATGGTGTAACAAGATAATTACGAAACGTGTGAAGATATCGAAAGCAAATGGATATAACAAGTTT
TCCAATATTCCTCTTTGCGTCTTCTCTGATCTCACCCAATTTCTCTCACTTCTTCTCTTTTCTTCACACTTCTCTG
GTAAGCAATATCATTTTTCGTTGCAAGTTATCCTTGTTTTTCCCCTTCTGATTTTTTTGATCGTTCATCAACGG
ATCGCTACCTTCCTAACAAACCCTAATTTTGTATTTATTTTTGGTTTTTCCAATCTGT**GTCTTTTGCTACAGAAT**
TATTGCCATG

Figura 12. Secuencia de la región del promotor de PvAtg8-d. Se indica la localización de los oligos para amplificar un fragmento de 2.1 kb, con el oligo forward (en color verde) y justo antes del codón de inicio ATG (en amarillo), se observa el oligo reverso (en azul).

10.3.2 Amplificación del promotor PvAtg8-d mediante la técnica PCR

El promotor PvAtg8-d de *Phaseolus vulgaris*, se amplificó a partir de ADN genómico de frijol por medio de una reacción PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente. Para corroborar el tamaño del producto de PCR, se cargaron 10µl de la reacción más 2µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 1.5%. Se detectó una banda del tamaño esperado (2.1kb) de la secuencia promotora (Figura 13).

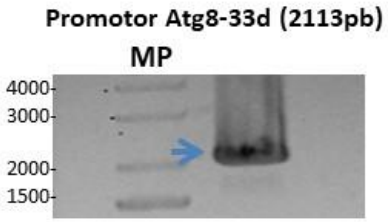

Figura 13. Producto de PCR del promotor de PvAtg8-d. Se observa en el carril MP, el marcador de peso molecular 2kb plus donde se indican el tamaño de las bandas de 1.500 a 4.000 pb. La banda del tamaño esperado de 2.113 pb se indica con flecha azul. Las muestras se corrieron en un PAGE al 1% y teñido con EtBr.

10.3.3 Clonación del promotor PvATG8-d en el vector pENTR/D-TOPO

Se clonó el producto de PCR del promotor PvAtg8-d con el kit del vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) y después se verificó por secuenciación. Posteriormente se realizó un PCR de colonias que crecieron en medios selectivos LB con Kanamicina 100 µg/ml. Está vez se utilizaron oligos que amplifican ~ 1.2kb del oligo proAtg8-d_1.2Fw, al oligo M13 Rev (ver Materiales y Métodos), esto debido a la dificultad de amplificar el fragmento de 2.1 kb. Se cargaron 10 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con EtBr. Se detectaron unas bandas muy tenues en las colonias C17 y C19 que oscilan aproximadamente en 1.5 kb (Figura 14).

Figura 14. Productos de PCR de 10 colonias obtenidas de la ligación del promotor PvAtg8-d en el vector pENTR. Los carriles C11-C20, 10ul del producto de PCR (1.2 Kb) de 10 colonias obtenidas de la clonación. MP, Marcador de peso molecular 1kb plus.

Posteriormente se realizó Miniprep de DNA con el kit de Fermentas y se corroboró el inserto por PCR y secuenciación.

10.3.4 Recombinación del vector pENTR-proPvAtg8-d con el vector destino pBGWFS7,0

La reacción Gateway LR se realizó entre el vector de entrada pENTR-D-TOPO-proAtg8-d y el vector binario pBGWSF7.0, según las indicaciones del proveedor (Invitrogen) y se transformaron en bacterias *E. coli* Dh5α quimio competentes y posteriormente se crecieron en medio LB con espectinomicina 150 ug/mL (Sp) ya que el vector tiene resistencia a este antibiótico para su selección. Se realizó PCR de colonia y se detectaron 7 colonias positivas (Figura 15).

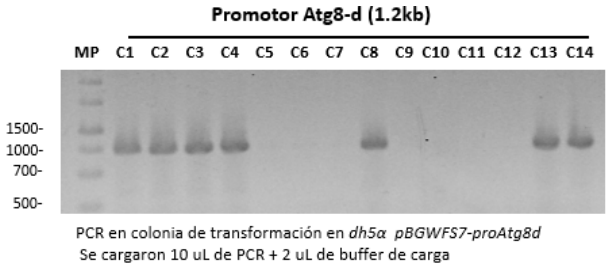

Figura 15. Producto de PCR de 14 colonias obtenidas de la transformación de células DH5a con el vector pBGWFS7-proPvAtg8-d. En los carriles C1 a C14, se cargaron 10 ul del producto de PCR donde se observa una banda de 1.2 Kb en las colonias C1, C2, C3, C4, C8, C13 y C14. MP, Marcador de peso molecular 1Kb plus con 2 ul de buffer de carga en cada carril. Las muestras se corrieron en un PAGE 1% teñido con EtBr.

Se pusieron a crecer en viales con medio LB Sp150 toda la noche en agitación a 37°C, para después realizar miniprep con el kit de Fermentas y corroborar el inserto por PCR y secuenciación.

10.3.5 Transformación del vector pBGWFS7,0-proPvAtg8-d en células de *Agrobacterium rhizogenes* K599

Con el producto de DNA de miniprep obtenido, se prosiguió a transformar células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 con el vector pBGWFS7,0-proPvAtg8-d a través de choque térmico. Se comprobó el inserto mediante PCR en colonia utilizando los oligos Pro0.7Atg8_33dFw y M13Rev que amplifican 0.7 Kb y obtuvimos 4 colonias positivas C2, C3, C4 y C15 (Figura 16). Posteriormente se pusieron a crecer toda la noche en viales de LBSp150, en agitación a 28°C. Se realizó extracción de ADN plasmídico para realizar secuenciación y PCR. Una vez que comprobamos si contenían el inserto, se realizaron alícuotas de cada colonia en glicerol 50%, PBS1X y se guardaron a -70°C.

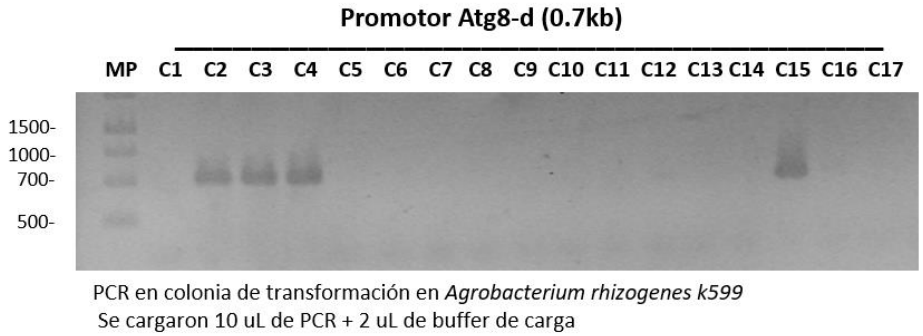

Figura 16. PCR en colonia de la transformación de la recombinación del pro-PvAtg8-d en *Agrobacterium rhizogenes* K599. Se cargaron 10ul de las colonias C1 a C17 y 2 ul del buffer de carga en un gel de PAGE 1% teñido con EtBr. MP, marcador de peso molecular 1Kb plus.

10.3.6 Búsqueda y análisis de la secuencia promotora de PvAtg8-f2

El análisis de la secuencia promotora de PvAtg8-f2 se realizó en la base de datos de Phytozome v10. Se tomaron 1.5 Kb río arriba de la secuencia codificante y a partir de esta, se diseñaron oligos con el programa SnapGene Viewer 4.3.10, para amplificar una región de 1.2 Kb del promotor. En la Figura 17 se puede ver en color verde la secuencias del oligo “forward”, en color azul la localización de la secuencia del oligo “reverse” y en color rosa se localiza otro oligo diseñado para amplificar un fragmento más chico por PCR. La especificidad de los oligos se determinó realizando un análisis bioinformático, usando la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990), la cual mostró homología únicamente con el promotor correspondiente.

>P.vulgaris v2.1|Phvul.003G219600|Chr03:44794444..44797856
TGAGTGTGAAATTAAATATTTATTAATGAAAGATAAAATTTTATGTCTTATGTGAGATGCATGTGATTTGTTGTTT
AAAGAAACCAATAATTAATTAAATTAATAATAAAGTATACAAAATAATTAGGTTAATGAATAATTGCTTTTTTACA
ATGATTGCTATTTACGAGTATAGTAGAAAAATAGGGTTTATGTATAAATTATCAATGCAAAGACAACTTCTCTCAT
TGACAAATCTATCTCTTTACTAAATCCATCAAATAAATGAGATAATATAATAATAAGTTAAATATAATGAAACTTTA
AATGTCATTCAAGTAATTAGATCTACTAACAAACCAGCTATCATAAAGAGAAAGAGTTTGAATAATCTATCTCATT
AAATTTATAGATAATCGATAATAAGACAATTTTAAAATCCTATTTTGATTTTTAATATTACTTTGTTATTTGAAGACT
TTTAATTTTTCACATCATATTTTAATAATTATTATAATATTCTTAATAAATTTGACTAAATAGATTATAATAACATATT
AAAAGAAATTTAAAATTTAACTTAATTTTATAAAATTAACTTGTACAGATAAAATTTAAATATAATATATAGTAGAT
TTCGAACCATGATTGATATTTTTTTTTAACTACTAAAAATATATTTAATGAAATTTTTATTTAGTTAATAATGTAAAC
ATCTTTAGACCTAGACGAGATTACGAAAAAGAAAGAAGAAAAAAACGAAAAAGAAAGCATTAAATAATATAAGA
AAGACTAGAAGGAAAAAAAATAAAACGAGAATATAAAATCCTTATATTATTTGGTATATAAAAAGTGAAATGAC
GATAGGAATAGTTGAGAAAGACGATAAAGCAAAGAAGAAGCGATATATTTAGTTTGTTGAAGCAAAGCAAACAC
AGCGCCTTGTTGGAGTTGTTAGCAAGAAACCGCAGCGTTGATTTTCTTCTATTATTGGATCGTCTTAACGAGGTTT
AGTTTTCTCAATCATATACAATCCAATTCGCAAACCTTTAACTTTTGAGTTTCAAAAATTATTTTAATCGGCCAAGA
AATTTCCTTCGCTGATTGTCGG**AACCGCTTTGAATCTCTTTCC**CTGCTTTTTAAAGGAAAGATTGTCTGCAATTAGA
GGTTTTTCTCTTTTCCTAAATTCAAGTAAGAGTTGATGATCGGAAATTCCATAAATATAGTTGTCTGAAAGTTAGG
GCTATTTTTAATTACATATCATTTAGCGAAGATTATTGTTCGGATGCAAACCCTTTTTGTTGAATTAAATTTTTAGG
TGTAGGTCCGTTCTCAATCTTCATCTTGTTTTTTTTTTCTTTCTCTAAATCATGCCCCCTTATTTATTTATTCATTTATA
TAACTCTCTTTTTTAATTTATTTATTTTGAGCGTTAACGAATTATTTATCCTTTGTCGGAAGAATGGACGGTGTATC
ATCTTAGTTTTGATTAGCTTT**TGTTTGATGGTAATTCCAGGAAGAATG**

Figura 17. Secuencia de la región promotora de PvAtg8-f2. Se marcaron los oligos forward en color verde (1.2 Kb) y en rosa (0.4 kb); el oligo reverse en color azul antes del codón de inicio ATG en amarillo.

10.3.7 Amplificación del promotor PvAtg8-f2 mediante la técnica de PCR

El promotor Atg8-f2 de *P. vulgaris*, se amplificó a partir de ADN genómico de frijol por PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente. Para corroborar el tamaño, se corrió el producto de PCR (10µl + 2µl de buffer de carga) en un gel de agarosa al 1.5 % donde se detectó una banda del tamaño esperado (1.2 Kb) de la secuencia promotora (Figura 18).

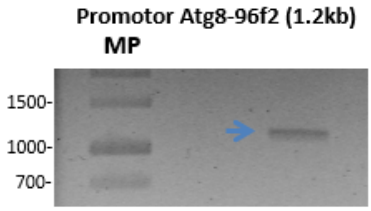

Figura 18. Fragmento de PCR correspondiente al promotor PvAtg8-f2 obtenido a partir de DNA genómico de frijol. Se cargaron 10 ul de la reacción de PCR (1.2 Kb, señalado con la flecha azul) con 2 ul del buffer de carga en un gel de PAGE 1% teñido con EtBr. MP, marcador de peso molecular 1 Kb plus.

10.3.8 Clonación del promotor PvATG8-d en el vector pENTR/D-TOPO

Se clonó el promotor PvATG8-f2 en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen) como indica el fabricante y posteriormente se realizó un PCR de colonias resultantes de la ligación que crecieron en medio selectivo LB Km 100 µg/ml. Está vez se utilizó el par de oligos proPvAtg8-f2_1.2 y M13Rv. Se cargaron 10 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%. Se detectó la banda del tamaño esperado en las colonias C14 y C16 que migra alrededor de 1.5kb (Figura 19).

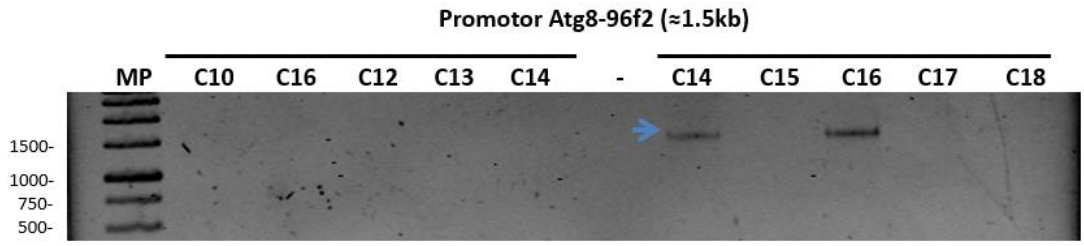

Figura 19. Productos de PCR de 10 colonias obtenidas del promotor pENTR-PvAtg8-96f2. En los carriles C10 a C18, se colocaron 10 ul del producto de PCR (1.5 Kb con flecha azul) de las

colonias obtenidas de la ligación. (-) control negativo. MP, Marcador de peso molecular 1kb plus. Las muestras se corrieron en un gel PAGE 1% teñido con EtBr.

Posteriormente se realizó Miniprep de DNA con el kit de Fermentas y se corroboró el inserto por PCR y secuenciación.

10.3.9 Reacción del producto de recombinación del vector destino pBGWFS7-proPvAtg8-f2

La reacción Gateway LR se realizó entre el vector de entrada pENTR-proPvAtg8-f2 y el vector binario pBGWSF7.0, según las indicaciones del proveedor. Se continuó con la transformación en bacterias *E.coli* Dh5α quimiocompetentes y posteriormente se crecieron en medio LB Sp150 para su selección. Se realizó PCR de colonia con un oligo interno que amplifica 0.4 kb (Pro0.4Atg8_96Fw) y se detectaron muchas colonias positivas, excepto la C28 como se muestra en la Figura 20.

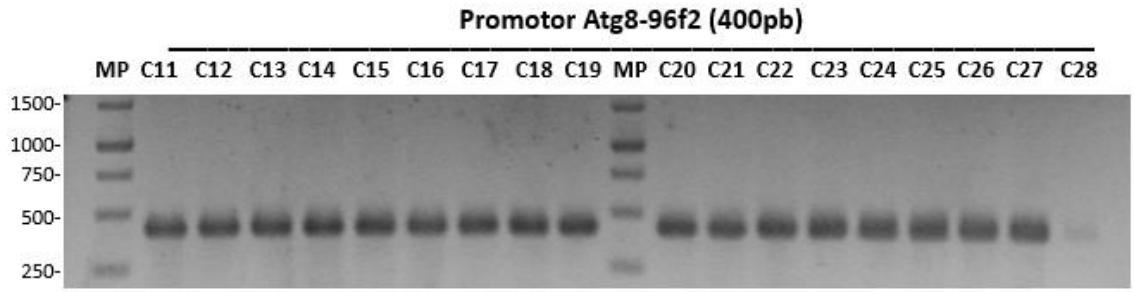

Figura 20. Producto de PCR de 18 colonias obtenidas de la transformación de células DH5a con el vector pBGWFS7-proPvAtg8-f2. En todos los carriles C11 a C28 se cargaron 10 ul del producto de PCR donde se observa una banda de 0.4 Kb en todas las colonias excepto C28. MP, Marcador de peso molecular 1Kb plus más 2 ul de buffer de carga en cada carril. Las muestras se corrieron en un PAGE 1% teñido con EtBr.

Se pusieron a crecer en viales con medio LBSp150 toda la noche y con agitación a 37°C, para después realizar miniprep de DNA con el kit de Fermentas y corroborar el inserto por PCR y secuenciación.

10.3.10 Transformación con el vector pBGWFS7-proPvAtg8-f2 en células de *Agrobacterium rhizogenes* K599

Con el DNA del vector pBGWFS7-proPvAtg8-f2 producto de la miniprep de las colonias positivas, se prosiguió a transformar células de *Agrobacterium rhizogenes* K599 a través de choque térmico. Se comprobó el inserto mediante PCR en colonia y obtuvimos 4 colonias positivas de 5 analizadas(C1, C3, C4 y C5). Posteriormente se pusieron a crecer toda la noche en viales de LB con espectinomicina, en agitación a 28°C. Se realizó extracción de ADN plasmídico para realizar secuenciación y PCR. Una vez que comprobamos que contenían el inserto, se realizaron alícuotas en glicerol 50%, en PBS1X de colonias y se guardaron a -70°C.

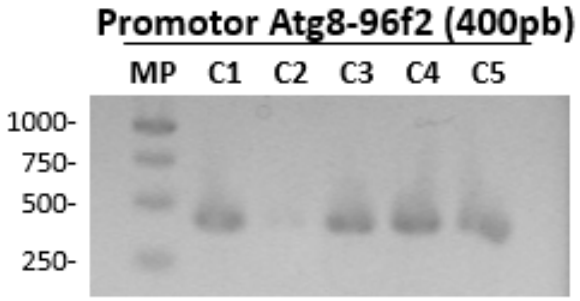

Figura 21. PCR en colonia de Agrobacterium rhizogenes K599 conteniendo el vector pBGWFS7-pro-PvAtg8-f2. Se cargaron 10ul de las colonias C1 a C5 con 2 ul del buffer de carga por cada muestra. Los productos de PCR (0.4 Kb) se cargaron en un gel de PAGE 1% teñido con EtBr. MP, marcador de peso molecular 1Kb plus.

10.4 Actividad de promotores PvAtg8-d y PvAtg8-f2 en raíces transgénicas de frijol.

Con el objetivo de analizar espacial y temporalmente la actividad de las construcciones obtenidas de los promotores de los genes pBGWFS7-proPvAtg8-d:GFP-GUS (**PvAtg8-d**) y pBGWFS7-proPvAtg8-f2:GFP-GUS (**PvAtg8-f2**). Se procedió a obtener raíces transgénicas utilizando las clonas de *A. rhizogenes* K599 portando las construcciones para su análisis por separado. Durante el proceso, no

fue posible obtener raíces transgénicas con la construcción del promotor PvAtg8-d, por lo que el ensayo continuó únicamente con el promotor de PvAtg8f2. Una vez obtenidas las raíces transgénicas, se realizó el análisis del promotor en raíces inoculadas con *R. tropici CIAT899* y en raíces no inoculadas. Se evaluó la actividad del promotor mediante la actividad de la glucuronidasa en las raíces inoculadas a los 7, 10 y 14 días post-inoculación (dpi). Las raíces recolectadas se sumergieron en una solución con el sustrato de la glucuronidasa y la aparición de la coloración azul aparece como producto de la actividad enzimática. Se observó diferencialmente en las raíces inoculadas en comparación con las no inoculadas, siendo más rápida en las raíces inoculadas. En las raíces inoculadas con *Rhizobium* la actividad se observó en el tejido vascular, principalmente en el córtex interno, en las células que dan origen al nódulo y en la zona de infección de nódulos jóvenes de 10 dpi (Figura 22a). En el tejido vascular de nódulos en etapas más tardías de 14 dpi (Figura 22b). La actividad del promotor se observa en todo el primordio de nódulo, hasta su emergencia. Sin embargo, a medida que el nódulo madura, la tinción se localiza en la base y en el tejido vascular del nódulo, lo cual sugiere una función en el mantenimiento del nódulo (Figura 22c y d). En las raíces no inoculadas el ensayo reveló que el promotor PvAtg8-f2 es activo en zonas de división celular o meristemáticas, como los ápices de las raíces (Figura 22e) y en los primordios de raíces laterales (Figura 22f). La actividad en los tejidos de primordios de raíz lateral y nódulos sugiere una función en la división celular.

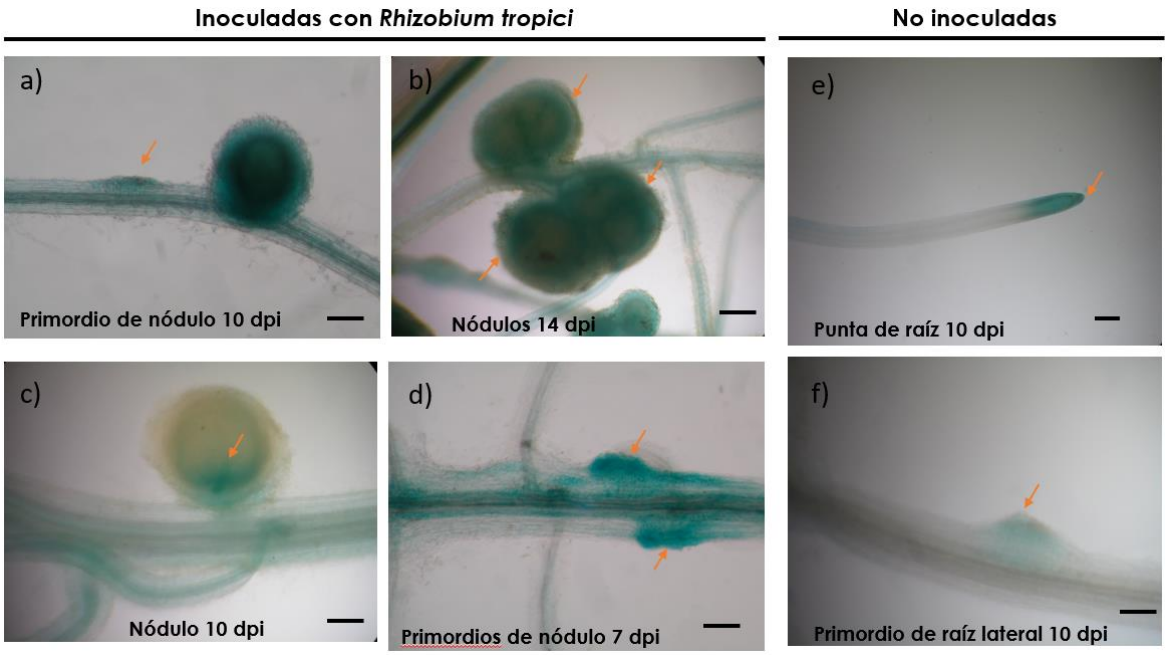

Figura 22. Ensayo de actividad de GUS histológica de PvAtg8-f2 durante la organogénesis del nódulo y en raíces de *P. vulgaris*. La actividad específica de GUS se observó primordio y en la región de infección de nódulos jóvenes de 10 dpi (Figura 22a). En el tejido vascular de nódulos de 14 dpi (Figura 22b). Se observó en la base de emergencia del nódulo de 10dpi (Figura 22c) y en las células de primordios de nódulos de 7dpi (Figura 22d). En las raíces no inoculadas en los ápices de las raíces (Figura 22e) y en los primordios de raíces laterales (Figura 22f). En a-d y f) Barras= 50 um

10.5 Evaluación de la expresión de los genes PvAtg8 en condiciones con y sin déficit de nitrógeno.

La relación entre la autofagia y la deficiencia de nitrógeno en las plantas implica una interacción compleja entre la disponibilidad de nutrientes y los procesos celulares. Durante la deficiencia de nitrógeno, la autofagia se regula positivamente para reasignar los recursos internos de nitrógeno y mantener las funciones celulares esenciales. Este proceso permite que la planta sobreviva en condiciones de estrés nutricional al degradar y reciclar proteínas y orgánulos dañados o innecesarios, liberando aminoácidos y otros compuestos nitrogenados para su reutilización en procesos metabólicos vitales. Además, la autofagia puede estar involucrada en la

redistribución del nitrógeno dentro de la planta, priorizando su asignación a tejidos y órganos críticos para la supervivencia y el crecimiento, como las hojas jóvenes y los brotes.

Con el fin de confirmar la presencia de autofagia, así como su relación y regulación mediante concentraciones de nitrógeno, se propuso analizar el nivel de transcritos de genes Atg8 en raíces de *P. vulgaris* sin inocular en presencia y ausencia de nitrógeno. Para ello, se comparó el número y tamaño de las hojas y se midió el peso seco de hojas y raíces regadas con medio B&D con diferentes concentraciones de nitrógeno (0 mM, 0.1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM).

Tal como se observa en la **Figura 23a**, a medida que la concentración de nitrógeno aumenta, se observa el aumento de los trifolios, así como del tamaño de las hojas y aunque la diferencia en el peso seco de raíces y hojas no es significativa, parece variar un poco más a los 21 días.

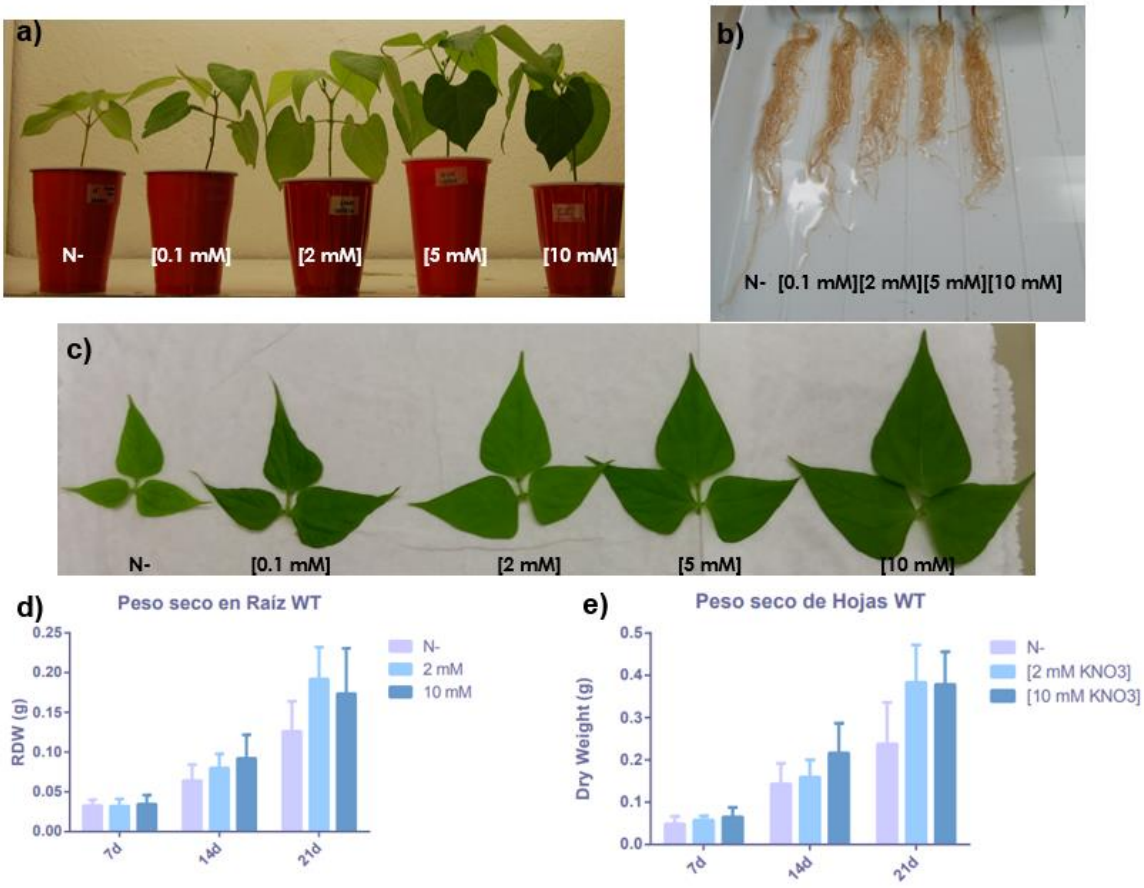

Figura 23. Análisis de tejido de hojas y raíces de frijol tratadas con diferentes concentraciones de nitrógeno. Fotos de a) plantas b) raíces y c) trifolios crecidos sin (N-) y con nitrógeno a 0.0 mM, 0.1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM. Gráficas del d) peso seco de la raíz y e) peso seco de las hojas (N-) y a 2 mM y 10 mM de KNO3.

11 DISCUSIÓN

La nodulación en plantas leguminosas, como el frijol, es crucial para la fijación biológica de nitrógeno, facilitada por la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. Se ha observado que la autofagia desempeña un papel importante durante la nodulación, regulando la simbiosis planta-bacteria y posiblemente la degradación de orgánulos. La proteína ATG8 es clave en este proceso, marcando las membranas de estructuras a ser degradadas y participando en la fusión de autofagosomas con lisosomas. La diversificación de ATG8 en plantas refleja adaptaciones a distintas condiciones ambientales y funciones específicas en diferentes tejidos.

En especies como *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris*, se han identificado múltiples genes Atg8 con patrones de expresión diferencial, lo que sugiere la existencia de reguladores transcripcionales específicos aún por identificar. La presencia de seis genes de ATG8 en frijol destaca la diversificación de funciones y la posible especialización de roles específicos en la nodulación y otros procesos.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, las proteínas ATG8 están codificadas por 9 genes que se han agrupado en 3 grupos según la alineación de la secuencia de aminoácidos, mientras que en frijol se han identificado 6 genes. Tal y como se había observado en Kellner et al. (2017), estos 6 genes se agrupan de la siguiente manera: primer grupo incluye 4 miembros (ATG8A, ATG8B, ATG8C y ATG8D), el segundo 3 miembros (ATG8F, ATG8E y ATG8G) y el tercero 2 (ATG8H y ATG8I). Los diferentes genes ATG8 tienen distintos patrones de expresión espacial y temporal en diferentes tejidos, lo que sugiere que las diferentes proteínas ATG8 pueden cumplir diferentes funciones y estar reguladas por distintos factores. Sin embargo, la información sobre los reguladores transcripcionales de los genes ATG en plantas es limitada.

Al analizar la expresión de los diferentes genes PvRAtg8 de frijol, aun cuando en frijol, se observa que estos también se expresan en todos los tejidos de la planta, aunque su mayor expresión se da en raíces y nódulos, principalmente de los genes de Atg8d y Atg8f2, como lo muestra el mapa de calor, así como el ensayo de RT-PCR, lo que da lugar a proponer a estos genes para el análisis de promotor como indicador de autofagia durante la simbiosis.

Una observación interesante es que el mapa de calor mostró mayores niveles de transcripción en tejidos de nódulos deficientes en fijación de nitrógeno, sugiriendo una posible función en el mantenimiento de la estructura o tejido más que en procesos de removilización de nitrógeno, a diferencia de lo que se observó en el trabajo de Chen, Soulay, et al. (2019), en plantas de *A. thaliana*. Por esta razón, se quiso confirmar la relación entre la presencia de transcritos de genes Atg8 en raíces regadas con diferentes concentraciones de nitrógeno, aunque estos ensayos no se pudieron completar. Los ensayos de qPCR no se realizaron por motivos de fuerza

mayor, siendo este uno de los ensayos importantes para verificar la participación de PvAtg8d y PvAtg8f2 en presencia y ausencia de nitrógeno.

La actividad del promotor PvAtg8d tampoco fue posible monitorearla porque no detectamos señal positiva de transformación de raíces de frijol. Mientras que PvAtg8f2 de frijol se encontró en los ápices de las raíces, los primordios de raíces laterales y de nódulos, así como en el tejido vascular de nódulos maduros, sugiriendo su relevancia en la división celular o el mantenimiento de zonas meristemáticas. Este promotor es activo durante diferentes fases de la nodulación, lo que sugiere que estos genes son necesarios en distintas etapas de dicho proceso. Sin embargo, no parece que participen directamente en el desarrollo de la zona de infección de los nódulos, sugiriendo posiblemente un rol en la movilización de nutrientes en el tejido vascular o en el metabolismo nitrogenado.

12 CONCLUSIONES

- El análisis “in silico” permitió identificar y agrupar los miembros de la familia de proteínas de autofagia Atg8 de P. vulgaris mediante el árbol filogenético comparada con otras especies de plantas. Se encontraron seis isoformas denominadas; PvAtg8-c1, PvAtg8-c2, PvAtg8-d, PvAtg8-f1, PvAtg8-f2 y PvAtg8-i.
- Los niveles de transcrito de PvAtg8´s podrían indicar que algunas isoformas son específicos de simbiosis.
- Se obtuvo una construcción del promotor de pBGWFS7-proPvAtg8-f2:GFP-GUS que permitió analizar su actividad la nodulación en el desarrollo de las raíces transgénicas de frijol.
- El análisis del promotor demostró que PvAtg8-f2 se encuentra en las regiones meristemáticas de la raíz, de raíces laterales y de primordios de nódulo, y en

el tejido vascular, sugiriendo que está involucrado en el proceso de desarrollo de la raíz y de los nódulos de la planta durante la simbiosis Phaseolus vulgaris- Rhizobium tropici CIAT899.

13 PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de los cinco promotores restantes de ATG8´s fusionados a GUS para ver su actividad durante la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*. Analizar si alguno de los candidatos propuestos en este trabajo, tiene una expresión.
- Monitorear el proceso de autofagia durante las simbiosis con todas las construcciones mRFP:PvAtg8 en las diferentes etapas de la simbiosis, utilizando inhibidores de autofagia (Ej. Concanamicina, cloroquina, u otro inhibidor).

14 REFERENCIAS

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Bassham, D. C. (2015). Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods*, *75*, 181–188. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.09.003

Broughton, W. J., & Dilworth, M. J. (1971). Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *The Biochemical Journal*, *125*(4), 1075–1080. https://doi.org/10.1042/BJ1251075

Chang, W. C., Lee, T. Y., Huang, H. Da, Huang, H. Y., & Pan, R. L. (2008). PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*, *9*. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-561

Chen, Q., Shinozaki, D., Luo, J., Pottier, M., Havé, M., Marmagne, A., Reisdorf-Cren, M., Chardon, F., Thomine, S., Yoshimoto, K., & Masclaux-Daubresse, C. (2019). Autophagy and Nutrients Management in Plants. *Cells*, *8*(11). https://doi.org/10.3390/CELLS8111426

Chen, Q., Soulay, F., Saudemont, B., Elmayan, T., Marmagne, A., & Masclaux-Daubresse, C. (2019). Overexpression of *ATG8* in Arabidopsis Stimulates Autophagic Activity and Increases Nitrogen Remobilization Efficiency and Grain Filling. *Plant and Cell Physiology*, *60*(2), 343–352. https://doi.org/10.1093/pcp/pcy214

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

Estrada-Navarrete, G., Cruz-Mireles, N., Lascano, R., Alvarado-Affantranger, X., Hernández-Barrera, A., Barraza, A., Olivares, J. E., Arthikala, M. K., Cárdenas, L., Quinto, C., & Sanchez, F. (2016). An Autophagy-Related Kinase Is Essential

for the Symbiotic Relationship between Phaseolus vulgaris and Both Rhizobia and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell*, *28*(9), 2326–2341. https://doi.org/10.1105/TPC.15.01012

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

Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M. P., Avice, J. C., & Masclaux-Daubresse, C. (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*, *194*(3), 732–740. https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2012.04084.X

Hanamata, S., Kurusu, T., & Kuchitsu, K. (2014). Roles of autophagy in male reproductive development in plants. *Frontiers in Plant Science*, *5*(SEP). https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00457

Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, *10*(11). https://doi.org/10.1101/gr.143000

Htwe, N. M. P. S., Yuasa, T., Ishibashi, Y., Tanigawa, H., Okuda, M., Zheng, S. H., & Iwaya-Inoue, M. (2011). Leaf Senescence of Soybean at Reproductive Stage is Associated with Induction of Autophagy-related Genes, GmATG8c, GmATG8i and GmATG4. *Plant Production Science*, *14*(2), 141–147. https://doi.org/10.1626/PPS.14.141

Johansen, T., & Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 80–103. https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.07.016

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, *7*(5), 193–195. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3

Kellner, R., De la Concepcion, J. C., Maqbool, A., Kamoun, S., & Dagdas, Y. F. (2017). ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification? *Trends in Plant Science*, *22*(3), 204–214. https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2016.11.015

Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., … Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, *17*(1), 1–382. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280

Lee, J. H., & Schöffl, F. (1997). GUS activity staining — a powerful tool in plant molecular biology. In *Plant Molecular Biology Manual*. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5400-0_2

Li, F., Chung, T., Pennington, J. G., Federico, M. L., Kaeppler, H. F., Kaeppler, S. M., & Otegui, M. S. (2015). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *The Plant Cell*, *27*(5), 1389–1408. https://doi.org/10.1105/TPC.15.00158

Li, F., & Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, *17*(9), 526–537. https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2012.05.006

Liu, C. W., & Murray, J. D. (2016). The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants (Basel, Switzerland)*, *5*(3), 4045–4053. https://doi.org/10.3390/PLANTS5030033

Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annual Review of Plant Biology*, *69*, 173–208. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042817-040606

Martens, S., & Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discovery*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/S41421-020-0155-1

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van De Velde, W., Alunni, B., Laporte, P., Durand, P., Agier, N., Marisa, L., Vaubert, D., Delacroix, H., Duc, G., Ratet, P., Aggerbeck, L., Kondorosi, E., & Mergaert, P. (2010). Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in Medicago truncatula nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS ONE*, *5*(3). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0009519

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2009 10:7*, *10*(7), 458–467. https://doi.org/10.1038/nrm2708

Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M. K., Alvarado-Affantranger, X., Quinto, C., Sánchez, F., & Lara, M. (2016). A Legume TOR Protein Kinase Regulates

Rhizobium Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development. *Plant Physiology*, *172*(3), 2002–2020. https://doi.org/10.1104/PP.16.00844

O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., McClean, P. E., Li, J., Dai, X., Zhao, P. X., Hernandez, G., & Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866

Porta, H., & Jiménez-Nopala, G. (2019). Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *22*. https://doi.org/10.22201/FESZ.23958723E.2019.0.160

Pu, Y., & Bassham, D. C. (2016). Detection of autophagy in plants by fluorescence microscopy. *Methods in Molecular Biology*, *1450*, 161–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3759-2_13/FIGURES/1

Pu, Y., Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). Regulation of autophagy through SnRK1 and TOR signaling pathways. *Plant Signaling & Behavior*, *12*(12), e1395128. https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1395128

Reumann, S., Voitsekhovskaja, O., & Lillo, C. (2010). From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma*, *247*(3–4), 233–256. https://doi.org/10.1007/S00709-010-0190-0

Ryabovol, V. V., & Minibayeva, F. V. (2014). Autophagic proteins ATG4 and ATG8 in wheat: Structural characteristics and their role under stress conditions. *Doklady. Biochemistry and Biophysics*, *458*(1), 179–181. https://doi.org/10.1134/S1607672914050056

Ryabovol, V. V., & Minibayeva, F. V. (2016). Molecular mechanisms of autophagy in plants: Role of ATG8 proteins in formation and functioning of autophagosomes. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(4), 348–363. https://doi.org/10.1134/S0006297916040052

Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S. M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M. A., Chovatia, M., … Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics 2014 46:7*, *46*(7), 707–713. https://doi.org/10.1038/ng.3008

Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*, *24*(5), 413–430. https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2019.02.001

Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z., & Galili, G. (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany*, *56*(421), 2839–2849. https://doi.org/10.1093/JXB/ERI276

Stougaard, J., Jørgensen, J.-E., Christensen, T., Kühle, A., & Marcker, K. A. (1990). Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc 3 and N23 gene promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, *220*(3), 353–360. https://doi.org/10.1007/BF00391738

Su, W., Bao, Y., Yu, X., Xia, X., Liu, C., & Yin, W. (2020). Autophagy and Its Regulators in Response to Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 8889. https://doi.org/10.3390/ijms21238889

Wang, P., Nolan, T. M., Yin, Y., & Bassham, D. C. (2020). Identification of transcription factors that regulate *ATG8* expression and autophagy in *Arabidopsis*. *Autophagy*, *16*(1), 123–139. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1598753

Xia, T., Xiao, D., Liu, D., Chai, W., Gong, Q., & Wang, N. N. (2012). Heterologous Expression of ATG8c from Soybean Confers Tolerance to Nitrogen Deficiency and Increases Yield in Arabidopsis. *PLOS ONE*, *7*(5), e37217. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037217

Yamaguchi, M., Noda, N. N., Nakatogawa, H., Kumeta, H., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010). Autophagy-related Protein 8 (Atg8) Family Interacting Motif in Atg3 Mediates the Atg3-Atg8 Interaction and Is Crucial for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(38), 29599–29607. https://doi.org/10.1074/JBC.M110.113670

Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, *14*(2), 207–215. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838

Zhang, C., Barthelson, R. A., Lambert, G. M., & Galbraith, D. W. (2008). Global Characterization of Cell-Specific Gene Expression through Fluorescence-Activated Sorting of Nuclei . *Plant Physiology*, *147*(1), 30–40. https://doi.org/10.1104/pp.107.115246

15 MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S 1. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
Análisis de transcrito		
qAtg8_Fw1600	CCGAAGCTTCTCGCATTAGA	126
qAtg8_Rv1600	CAGTCAAATCAGCAGGGACA	
qAtg8_Fw3300	CTGTTGGCCAGTTTGTGTATGT	141
qAtg8_Rv3300	TCTTCATCCTTGTTTTCCTCGT	
qAtg8_Fw93.2	AAAGAAGGCAGGCTGAGTCTAC	141
qAtg8_Rv93.2	ACCAACAGTCAAATCCGCTGG	
qAtg8_Fw9600	GGGAGAAATACCCAGACCGTAT	138
qAtg8_Rv9600	CCTTTTGCGGATAACATAGACA	
qAtg8_Fw10800	AACAAAGGCTCGAAGAATCG	144
qAtg8_Rv10800	TGAAATGCCCAACAGACAAG	
Análisis de promotores		
proAtg833d_Fw	GAGTTCTTGAACCAAATG	2113
proAtg833d_Rv	GGCAATAATTCTGTAGCAAAGAC	
Pro1.2Atg8_33Fw	AATTTACCATCATCGTTGTGC	1288
Pro0.7Atg8_33Fw	AATTTTCTTTTTTGAAGTGC	737
proAtg896f2_Fw	ACTAAATCCATCAAATAAATGAGAT Tesis de Licenciatura Bladimir Sánchez S.	1254
proAtg896f2_Rv	TCTTCCTGGAATTACCATCAAACA Tesis de Licenciatura Bladimir Sánchez S.	
Pro0.4Atg8_96Fw	AACCGCTTTGAATCTCTTTCC	410

PROTOCOLO PARA TINCIÓN DE GUS (Lee and Schöffl 1997)

1. Colocar la raíz en una caja Petri y sumergir en la solución de lavado I durante 5 min a temperatura ambiente (el volumen depende del tamaño de la muestra).
2. Retirar la solución I
3. Sumergir las raíces en la solución de lavado II durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Retirar la solución II.

5. Revelar la actividad de GUS sumergiendo en la solución tinción GUS. El tiempo varía dependiendo del experimento.
6. Lavar las raíces con agua estéril y desgasificar en sistema de trampa de agua.
7. Aclarar las raíces en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% hasta retirar el color amarillo
8. Lavar las raíces al menos 3 veces con agua estéril.

Tabla S 2. Soluciones de lavado (Tinción de GUS)

SOLUCIÓN	FORMULA QUÍMICA	CONCENTRACIÓN FINAL
I	Na_2HPO_4 (0.5 M)	50 mM
	NaH_2PO_4 (0.5 M)	50 mM
	$K_3Fe(CN)_6$ (100 mM)	0.5 mM
	$K_4Fe(CN)_6$ (100 mM)	0.5 mM
II	SOLUCIÓN I	
	EDTA 0.5 M	2 mM
	Tritón X100 10%	0.1%
Tinción GUS	SOLUCIÓN II	
	X Gluc 100 mM	10 µl por cada ml de solución II

Tabla S 3. Medio B&D

SOLUCIÓN	FORMULA QUÍMICA	CONCENTRACIÓN FINAL
A	$CaCl_2H_2O$ (2 M)	1000 µM
B	KH_2PO_4 (1 M)	500 µM
C	Fe-citrato (0.02 M)	10 µM
D	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 M)	250 µM
	K_2SO_4 (0.5 M)	1500 µM
	$MnSO_4 \cdot H_2O$ (0.002 M)	1 µM

	H_3BO_3 (0.004 M)	2 μM
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.001 M)	0.5 μM
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.004 M)	0.2 μM
	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.0002 M)	0.1 μM
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.0002 M)	0.1 μM

VOTOS DE APROBATORIOS

SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. FLORES NAVARRETE MARIA DEL CARMEN** con número de matrícula **20134001950** cuyo título es:

"La participación de la Proteína de Autofagia ATG8 en la simbiosis nodular de raíces de *Phaseolus vulgaris*"

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR)**

Cuernavaca, Mor a 20 de agosto de 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. RAMON ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA CONDE	**(PRESIDENTE)**
DR. ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA	**(SECRETARIO).**
DRA. GEORGINA ESTRADA NAVARRETE	**(VOCAL)**
DRA. SONIA DAVILA RAMOS	**(SUPLENTE)**
DR. NELSON AVONCE VERGARA	**(SUPLENTE)**

MIE/VRRC/eae

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GEORGINA ESTRADA NAVARRETE | Fecha:2024-08-20 14:40:53 | FIRMANTE

YiIaN9vvs8hAOrvpPdBiRlq8w/cO9FIB02Ht/VXbal9qeiM3MQbm+qMivqm9rGV935rsV/gnR871B5kapBcIDJ2gElefUZS3biPVt84a3wpZX7y2l6dm1gnD6gKgQD+1lLPFZvbhb754U7JeHxpMZQ9HhkOlZaEgUc0Zx++s0QMelWOIbm87xNjUIp+nsxKldMIn9FEzNC1eUlFR3DMdrKIe84z/FeeVJryNNOeg482utUPGTJEN4eLcoc121AdWPgNdyWc3kzQleCqX5I/w/KcGbMkM6tO+C6dfSlFkCOPUw2e/3NX5LPX7+H0PLE6i1NBflcDBQN5SoXbTiwtA6A==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2024-08-20 15:51:00 | FIRMANTE

DxHV1g2YLZiqEyYzlH4oY7QW3ABPkccOS58WEuiJHWtgFY+hc9uL+tn2V6AqG5hNlNSod7xoYglcnDnH27/wxiGIsJtm5x6wQqDkg2Rza5yuTf77UbOaYXkri0f7uKGnI3oOidZ98GLaKY4kSNYG2tlMQ6E6QKvqi/W5QnHRVMYeK7XqKIxeHJKG08l5VIwW7Q6GuLKG7adOwlbTSv4yIzUK5GnwC1fHE12sE0Glvpk1FkIdM/8+7RTpB4o5U+h1DZWhSYmpPpFJrJ61NnR9943xlAjqaJVEn7lOuguiQyxZjtF9dtJdgR8UhtBqHkcD0xHPMgvNI1v5VMnACWcITA==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2024-08-20 16:41:37 | FIRMANTE

WhGq3Y06IWjguKWBR244jS+XWc0asB7CIqmoiBWDj5RKTIPzJVcJ1kqSuHCko/TLqzvW2zIAmH4hGIYgitvUdVqIXBfMeiuw+JhVZvtAY1A7jjgCxkNP+hpN84fK5jjUQMPJe/5MJWU7GpW9p+eAl8w8vVvex7bjibCY0KJ/E+ChVlmCfmG0v4fWgfx3Yr1B8J6doZvLpS1hc45Yv0xZ6qKp54faSZbthkR79KyOJAVXFtF4Res+rGZMbxT4/ghJKiH9mLakgu8r1xslS0lx9qZkAsFIRXrNnZxUssda90Pzux5faEm6MN3xeV+mL2mx1CmhKd4zSeqNtN+pylFJjw==

RAMON ANTONIO GONZALEZ GARCIA CONDE | Fecha:2024-08-21 19:37:25 | FIRMANTE

icHntp6Oib2b2gelGDoWj0+NTysuGbEj19JsgLRpnMo32z+CB+LykCFLPgB8zPnsNRlWPk0OsM8teZIB0KHgcuLNGOSsw3xH8tWXfMPGYAYErQoFaQ6tPaBURdu4KeyuMJW446KhPEUknMpt/GJvvCVGgItx46DddyJ45zfeYUnS6MHfL7hXlVM7Osml5d9hrFkdWxryHCt1WLAz+AtMAvKzVPsDyqPA7K8+yq/3jFwYk4NvIJqcwD92KXlhjmLL1Vlh7HBpAdek9XoqFdEJISA0wY4Mq2jmbGjrZoirhA+pvDk0FBcwP41HWHmJVc7Ylg4JQ1BG2/QQ0pKirsLsyA==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2024-08-22 12:46:19 | FIRMANTE

OZfh7haH55Uar01Rzy5tCcZyIAqaq2TDvzRB2+HkRE77/GEaurTRuP3CMTekobMvwBQq7ItL/qaTvXgdPSTOs+MvgOy+KHuR0Qfm2x50+NpaPDk8XcbE+oO0dMhlq6GaTkzzAXZAdGJ4U8ZKa0R2HtQ0YeU73WhBUUEN432dkmcZvpE0XBHCukU6ll3spNMHpO41VvGenzk5ULTz8b8OoJbV2kLhTQbMUVNacQZgw6Pgz5uzfy9v1LqiK1RHm3mgzuATWbTrH7jhK6lPvPI1wVuSNFSxDT9/86x4edyfFAWyCzH+OcAR/Z5IRb4kuKAAIncOsmM3a1gIMRHUEmJXIg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

IICpQmeq7

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2zEAT2uLUeH6r2cEiLGdDliD8bHFOD21

UAEM RECTORÍA 2023-2029