

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.

DIVISIÓN DE INGENIERÍA.



**Identificación y clonación de una Snakina de *Phaseolus vulgaris* expresada
diferencialmente en el proceso de nodulación**

Por:

BÁRBARA JUDITH VERGARA GARCÍA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**Identificación y clonación de una Snakina de *Phaseolus vulgaris* expresada
diferencialmente en el proceso de nodulación**

Por:

BÁRBARA JUDITH VERGARA GARCÍA

TESIS

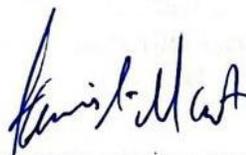
Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de asesoría



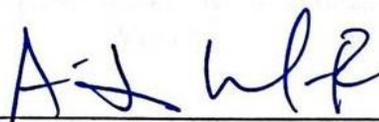
Dr. Marco Adán Juárez Verdayes.
Asesor principal Interno



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo.
Co-asesor



Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez.
Co-asesor



Dra. Aida Isabel Leal Robles.
Co-asesor

Saltillo, Coahuila, México.
febrero de 2023

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.
DIVISIÓN DE INGENIERÍA.**

**Identificación y clonación de una Snakina de *Phaseolus vulgaris*
expresada diferencialmente en el proceso de nodulación**

Por:

BÁRBARA JUDITH VERGARA GARCÍA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de evaluación

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes.
Presidente

Dra. Aida Isabel Leal Robles.
Vocal

Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez.
Vocal

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo.
Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería.

Saltillo, Coahuila, México.
febrero de 2023

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante de Ingeniero en Biotecnología



BÁRBARA JUDITH VERGARA GARCÍA

Agradecimientos

Quiero agradecer a la vida porque por ella existo.

A la universidad, por dar todo lo necesario a los estudiantes cuando en verdad tienen ganas de superarse.

Al doctor Marco Juárez por sus enseñanzas y su amistad, fue imprescindible para poder dar cierre a esta etapa de mi vida.

A la doctora Silvia Martínez, por ser la mejor tutora de la universidad. Nosotras nos elegimos.

A mi familia, por darme soporte en toda la etapa universitaria.

Y a mí, me agradezco por lograr terminar, con ayuda, con pandemia, con todos los cambios que no estaban previstos. Si se pudo.

DEDICATORIA

A mis padres, porque a su manera me apoyaron y sin ellos no sé cómo hubiera empezado ni terminado todo.

A mis hermanas, por su amor incondicional y apoyo en esta y todas las vidas.

A un pedacito y momento de mi vida, que me enseñó y acompañó en toda la carrera.

A mis amigos dentro y fuera de la carrera, fueron claves en estos cinco años de la etapa universitaria.

A mis sobrinos, sobre todo a Max, por recordarme el amor por la ciencia y verme como alguien que le puede enseñar.

Y a mí misma, por aceptar la ayuda y tener la resiliencia para terminar esta etapa.

Tabla de contenido

Declaración de no plagio	IV
Agradecimientos	V
Dedicatoria	VI
Tabla de contenido	VII
Lista de figuras y Lista de tablas	VIII
Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis	3
Objetivo general y Objetivos específicos	4
Revisión de literatura	
♦ Las leguminosas	5
♦ Generalidades del frijol	5
♦ Interacción simbiótica de <i>P. vulgaris</i> y rizobium.	5
♦ Péptidos antimicrobianos en plantas	7
♦ Proteínas GASA/Snakina	7
Metodología	
♦ Ubicación del experimento.	9
♦ Búsqueda de las secuencias putativas de las snakinas en el genoma de <i>Phaseolus vulgaris</i>.	9
♦ Análisis del transcriptoma “in silico” de las snakinas expresadas diferencialmente en el genoma de <i>P. vulgaris</i>.	9
♦ Diseño de oligonucleótidos específicos.	10
♦ Síntesis de los oligonucleótidos.	10
♦ Amplificación por PCR de la secuencia snakina 25 expresada diferencialmente.	10
♦ Corrimiento electroforético y purificación del producto de PCR.	11
♦ Clonación y purificación.	12
♦ PCR en colonia.	12
♦ Extracción del plásmido y Electroforesis.	13
♦ Cuantificación de la muestra.	13
♦ Secuenciación.	13
♦ Alineamiento múltiple de secuencias y Modelado estructural de la secuencia.	14
♦ Identificación de los dominios GASA/Snakina	14
Resultados y Discusión.	
♦ Búsqueda e identificación de las secuencias putativas de las snakinas en el genoma de <i>P. vulgaris</i>	15
♦ Análisis transcriptómico “in silico” de las snakinas expresadas diferencialmente en el genoma de <i>P. vulgaris</i>.	16
♦ Amplificación por PCR de una snakina a partir de cDNA y su clonación en el vector pENTRD	18
♦ Secuenciación	18
♦ Alineamiento múltiple de secuencias y Modelado estructural de la secuencia.	22
♦ Identificación de los dominios GASA	23
Conclusión	24
Bibliografía	25

Lista de figuras

Figura 1. Esquema general del diálogo molecular entre la leguminosa y el rizobium compatible.	6
Figura 2. Mapa de calor de las snakinas expresadas en el proceso de nodulación de <i>P. vulgaris</i>	17
Figura 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa	18
Figura 4. Alineamiento múltiple de la snakina 25	20
Figura 5. Representación de la construcción pENTRD-Snakina 25	21
Figura 6. Alineamiento estructural de la Sankina 25 de <i>P. vulgaris</i>	22
Figura7. Búsqueda del dominio GASA en la secuencia Snakina 25	23

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados, para la amplificación por PCR de la secuencia de interés.	10
Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción de la PCR	11
Tabla 3. Componentes de la mezcla para la PCR del vector que contiene el inserto con la secuencia	12
Tabla 4. Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR en colonia	12
Tabla. 5. Número de secuencias y valores físicoquímicos para las secuencias de las snakinas determinadas en el genoma de <i>P. vulgaris</i>	16
Tabla 6. Muestras analizadas del análisis transcriptómico de <i>P. vulgaris</i>	17

Resumen

Los péptidos antimicrobianos son un grupo de péptidos pequeños ricos en cisteínas y dentro de ellos se encuentran las GASA/Snakinas, las cuales son parte de la inmunidad en plantas, presentan un tamaño promedio de 64 a 1099 residuos de aminoácidos y hasta el momento todos los estudiados presentan una actividad antimicrobiana como su función principal. Por otra parte, existe un grupo de péptidos antimicrobianos ricos en cisteína denominados como péptidos ricos en cisteína “NCR”, los cuales se consideran importantes efectores biológicos necesarios para la diferenciación terminal en la simbiosis de *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti* en el desarrollo de nódulos indeterminados. Para las plantas que forman nódulos determinados como los de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium* no se han reportado este tipo de “NCR”. Sin embargo, con el creciente número de transcriptomas reportados de la simbiosis de *P. vulgaris* y *rhizobium* se han encontrado secuencias putativas de péptidos antimicrobianos y de las GASA/Snakinas que muestran cambios significativos en los niveles de expresión génica. Sin embargo, se desconoce si estos péptidos, en particular las GASA/Snakinas, desempeñan alguna función en el proceso de nodulación. En el presente trabajo, se realizó la identificación de las secuencias putativas de las GASA/Snakinas en el genoma de *P. vulgaris*. Una exploración en los transcriptomas de *P. vulgaris*, señala que dentro de las secuencias de las GASA/Snakinas la secuencia denominada Snakina 25 muestra un cambio significativo en los niveles de transcritos durante el proceso de nodulación. La secuencia codificante Snakina 25 se amplificó a partir cDNA y se clonó en un vector pENTR/D. La clonación del fragmento con la secuencia Snakina 25 fue confirmada por secuenciación en la unidad de síntesis y secuenciación del IBt-UNAM. El análisis de secuencia a partir de un alineamiento múltiple, demostró que la secuencia de interés posee el dominio GASA/snakina y la firma conservada de residuos de aminoácidos de cisteínas. Un modelado estructural de la secuencia de residuos de aminoácidos Snakina 25, usando como molde la estructura PDB: 5E5Q, sugiere que el plegamiento es el característico de las snakinas. La secuencia Snakina 25 se encuentra lista para realizar la recombinación del vector PENTR/D con el vector binario de plantas el cual presenta un promotor constitutivo 35S del CaMV y el terminador NOS, que constituyen el “cassette” de expresión. El resultado de este trabajo permitirá a futuro explorar el papel de las snakinas en el proceso de nodulación entre *P. vulgaris* y *Rhizobium* y será clave en estudios posteriores.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, GASA/Snakinas, Nodulación, Clonación.

Introducción

Una posible alternativa para no utilizar el uso de productos químicos en los cultivos es el utilizar biomoléculas que se encuentren en los mismos cultivos y explotar su potencial para crear derivados que sirvan como: herbicidas, plaguicidas o fármacos. Dentro de los cultivos importantes y de fácil acceso encontramos a las leguminosas, con interés agronómico como: alfalfa, chícharo, alubias, garbanzo, habas, ejote, lentejas, cacahuete, soya y el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *P. vulgaris* tiene un valor nutricional ya que proporciona componentes esenciales para complementar la dieta del consumidor como son: proteínas, ácidos grasos, fibra dietética, compuestos polifenólicos, minerales y vitaminas (Celmeli et al. 2018; Didinger et al. 2022). Los péptidos antimicrobianos (PAM's por sus siglas en inglés Peptide antimicrobial molecular) son moléculas pequeñas que componen a un grupo de respuesta en la inmunidad innata cuando existe algún daño en la membrana celular. Se puede encontrar naturalmente en células animales, vegetales, bacterianas, protozoarios y tienen una actividad contra patógenos como bacterias, virus y hongos. Su principal método de acción es realizar la lisis de la célula ya que interactúan con la membrana celular del patógeno (Cardillo et al. 2018). Son ricos en cisteína por lo que pueden formar puentes disulfuro. Un análisis realizado en monocotiledones y dicotiledóneas identifican alrededor de 13,000 genes vegetales que codifican para péptidos con características comunes (Silverstein et al. 2007). Se distinguen diferentes tipos de familias de PAM's en plantas, entre ellas las más importantes son; las defensinas, tioninas, los péptidos tipo heveína (hevein like-peptides), las knotinas, las α -harpininas, las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) y las snakinas. Se diferencian por la cantidad de aminoácidos, su posición y los puentes disulfuro que tienen. Cada uno de los PAM's tienen distintas funciones dependiendo a que tipo de familia pertenezcan. Las snakinas desempeñan diferentes funciones como respuesta al estrés biótico y abiótico, presentan un tamaño de alrededor de ~7 kDa (Su et al. 2020). Las Snakinas tienen una importancia biotecnológica por presentar actividad antifúngica y antimicrobiana considerándose de interés farmacéutico debido a su estabilidad y eficiencia contra patógenos (A.N. García et al. 2014). El estudio de los péptidos antimicrobianos se ha enfocado en el aislamiento de las snakinas a partir de muestras biológicas. Sin embargo, a pesar de que existen varios transcriptomas de *P. vulgaris* en diferentes condiciones abióticas y bióticas, no se han identificado secuencias codificantes de snakinas en el genoma de *P. vulgaris*, por lo que este trabajo pretende identificar en el genoma de *P. vulgaris* los genes codificantes para el péptido antimicrobiano de snakinas y la amplificación de una secuencia expresada diferencialmente durante el proceso de nodulación.

Hipótesis

La familia de las snakinas son péptidos antimicrobianos que se encuentran conservados en las plantas y le confieren resistencia a estrés biótico y abiótico. La identificación y caracterización de la snakina 25 y que se encuentra expresada diferencialmente en el proceso de nodulación de *Phaseolus vulgaris* var. negro Jamapa y el *Rhizobium*, permitirá elucidar el papel de la participación de esa snakina en el proceso.

Objetivo general

⇒ Identificar en el genoma de *Phaseolus vulgaris* el número de secuencias del tipo snakina y clonar una expresada diferencialmente durante el proceso de nodulación.

Objetivos específicos

- Realizar la búsqueda de las secuencias putativas de las snakinas.
- Analizar los transcriptomas reportados de *P. vulgaris* e identificar secuencias expresadas diferencialmente.
- Amplificar por PCR la secuencia snakina 25, a partir de cDNA.
- Efectuar un análisis bioinformático de la secuencia amplificada.

Revisión de literatura

Las leguminosas.

Las leguminosas son un cultivo importante en la nación por complementar el valor nutricional. De las legumbres principales ingeridas en la dieta humana es el frijol, cuando se consume proporciona componentes esenciales para su consumidor ya que es fuente de micronutrientes (Fe, Zn y Cu) y macronutrientes (K, Ca, P y Mg), dependiendo de la variedad la cantidad de proteína se encuentra en un rango del 15 al 35%, son una fuente de aminoácidos como lisina, tirosina, fenilalanina, en vitaminas cada 100gr aporta vitamina C y ácido fólico, adicionalmente una importante cantidad de polifenoles (Ganesan y Xu 2017; Jan et al. 2021).

Generalidades del frijol.

Phaseolus vulgaris es la especie más conocida, pertenece al género Phaseolus, tribu Phaseoleae, familia Fabaceae, orden Fabales, clase Magnoliopsida, división Magnoliophyta y reino Plantae. El frijol es una leguminosa de importancia a nivel mundial. México es un centro de origen del frijol contando con especies nativas y criollas en su resguardo. Además de ser un cultivo importante en la nación, forma parte de la dieta mexicana al complementa su valor nutrimental proporcionando aminoácidos, hierro, vitaminas del complejo B, ácido fólico y minerales (Sangerman-Jarquín et al. 2010). El frijol se planta en dos épocas al año: primavera-verano, otoño-invierno y la producción de semilla suele producirse en áreas semiáridas y con disponibilidad de riego (Torres et al. 2008).

Interacción simbiótica de *P. vulgaris* y rizobium.

Hasta el momento todas las especies analizadas de la familia de las leguminosas son capaces de establecer una asociación simbiótica con bacterias del suelo conocidas como: rizobios, las cuales son bacterias aerobias, Gram-negativas que incluyen a los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium, Phyllobacterium entre otros. Esta interacción es benéfica para ambos organismos ya que el *P. vulgaris* le aporta a *R. etli* fuentes de carbono necesarios para su crecimiento y a cambio, se ve beneficiada al obtener formas asimilables de N₂ fijados por la bacteria simbiótica. Este proceso es conocido como fijación biológica de nitrógeno, que consiste en la incorporación de nitrógeno atmosférico a las plantas por medio de la conversión de nitrógeno en estado gaseoso (N₂) en amoníaco (NH₃) por medio de un complejo enzimático llamado nitrogenasa que se encuentra en las bacterias. Dicha interacción tiene lugar en la rizósfera y se inicia cuando la raíz de la leguminosa exuda compuestos entre los cuales podemos mencionar a los carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos entre los que se encuentran los flavonoides, los cuales actúan

como quimioatrayentes de la bacteria hacia la raíz de la planta, específicamente en ápice del pelo radical (S. C. García 2011). Los flavonoides (genisteína, naringenina, daidzeína, entre otros) son los compuestos que determinan la especificidad de la relación entre la leguminosa y los rizobios (Fig. 1). La mayoría de las especies de rizobios interactúan con sólo un grupo selecto de leguminosas, pero algunos han demostrado tener más de dos huéspedes (Schultze y Kondorosi 1998). Un ejemplo es el de *P. vulgaris* establece una relación simbiótica con *R. etli* y *R. tropici* (Aguilar, Riva, y Peltzer 2004), mientras que *Medicago* forma una relación simbiótica sólo con *Sinorhizobium meliloti* (Hirsch, Lum, y Downie 2001). Los genes nod codifican proteínas que participan en la síntesis y secreción de los factores Nod, lo que permite el inicio de la simbiosis frijol con rizobia (Quinto y Cárdenas 2007). . Interesantemente, se han descrito que dentro de los mecanismos que permiten la entrada y diferenciación en plantas como *Medicago truncatula* se han descrito un grupo de péptidos antimicrobianos (PAM's) que desempeñan un papel esencial en la simbiosis planta-rizobio. Estos PAM's pertenecen a una familia encontrada únicamente en plantas con meristemos persistentes en el nódulo dichos péptidos son ricos en cisteína (NCR). Se consideran importantes para el desarrollo y la diferenciación terminal de los rhizobios durante la relación simbiótica entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*. Estos NCR, poseen una potente actividad antimicrobiana pero dicha actividad no afecta a los endosimbiontes (Coss-Navarrete, Díaz-Valle, y Alvarez-Venegas 2020; Sauviac et al. 2022).

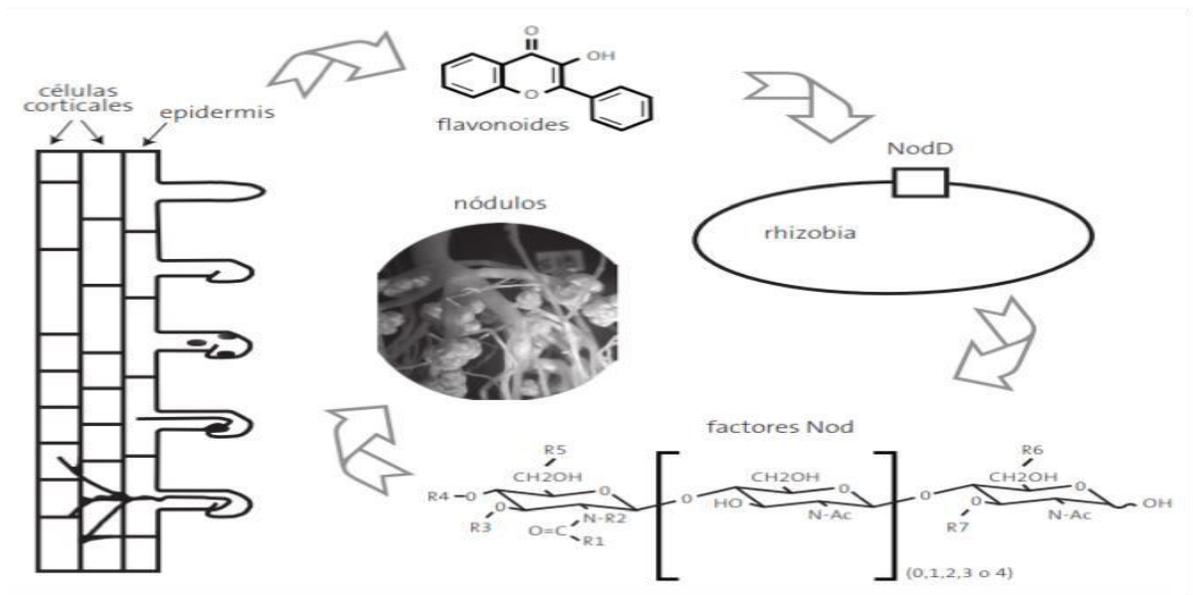


Figura 1. Esquema general del diálogo molecular entre la leguminosa y el rizobium compatible.

La raíz secreta de manera constante una serie de exudados entre ellos se encuentran los flavonoides,

estos compuestos son percibidos por el rizobium a través del receptor nodD e inducen la transcripción de los genes nod, los cuales estimulan al pelo radical para iniciar el proceso de nodulación.

Péptidos antimicrobianos en plantas

Los Péptidos antimicrobianos (PAMs), se puede encontrar naturalmente en células animales, vegetales, bacterianas y protozoarios y tienen una respuesta ante patógenos como bacterias, virus y hongos. Los PAMs son péptidos catiónicos con varias funciones diferentes a su capacidad de tener una actividad antimicrobiana entre las que podemos mencionar que son capaces de inhibir el transporte de proteínas, interactuar con canales iónicos y pueden de interactuar con el ADN y el ARN (Kenny y Marmion 2019; Magana et al. 2020; W. Li et al. 2021). Una revisión en la base de datos Antimicrobial Peptide Database (<https://dbaasp.org/>) (consultado el 16 de octubre de 2022) muestra un registrado de 3425 péptidos antimicrobianos, donde están categorizados de acuerdo a su origen y propiedades antimicrobianas (Wang, Li, y Wang 2016).

De manera general, los PAMs se encuentran como péptidos lineales en insectos, animales y plantas. En plantas muestran una serie de cisteínas conservadas que forman varios puentes disulfuro, la presencia de los posibles enlaces disulfuro entre las cisteínas conservadas aumenta su estabilidad a la degradación térmica, química y enzimática. Los PAMs forman parte de los mecanismos de defensa de las plantas, y se han logrado aislar de las raíces, hojas, flores, tallos y semillas de varias especies (Magana et al. 2020; Bakare et al. 2022; Maan et al. 2020). En plantas los PAMs se han descrito como diferentes familias, pero las principales son las “thionins”, “defensins”, “hevein”, “knottin”, “ α -hairpinins”, “lipid transfer proteins”, “cyclotides” y las “snakins” (Bakare et al. 2022; Cardillo et al. 2018).

Proteínas GASA/Snakina

Las proteínas GASA (Gibereline Acid-Stimulated Arabidosis) por sus siglas en inglés, también conocidas como GASA/Snakin o simplemente snakinas se encuentran ampliamente distribuidas entre las monocotiledóneas y dicotiledóneas, son una clase de proteínas CRP (proteína rica en cisteína) las cuales presentan un tamaño promedio de 80-120 residuos y un peso promedio de 7kDa. El primer registro de un aislado es de los tubérculos de *Solanum tuberosum* (StSN1) y los miembros de esta familia presentan 12 cisteínas en un dominio denominado GASA, dicho dominio presenta la siguiente firma “X_nCX₃CX₂RCX₈₍₉₎CX₃CX₂CCX₂CXCVPXGX₂GNX₃CPCYX₁₀₍₁₄₎KCP” (en donde x representa cualquier aminoácido excepto Cisteína, R arginina, V valina, P prolina, G glicina, Y

tirosina y K Lisina)(Su et al. 2020). Lo descrito en el dominio es que es necesario para la función de las proteínas GASA. Sin embargo, no se tiene claro como el dominio GASA afecta a la función de la proteína(Nahirñak et al. 2016; L. Zhang et al. 2017). La localización subcelular de las proteínas GASA/Snakin se han reportado en la pared celular, apoplasto, citoplasma, matriz extracelular, núcleo y membrana plasmática (Furukawa, Sakaguchi, y Shimada 2006; S. Zhang et al. 2009; Nahirñak et al. 2012; K.-L. Li et al. 2011; Wu et al. 2020). La modulación de la expresión de los genes de la familia GASA/snakin se ha reportado en por la acción de las giberelinas (GAs) y ácido abscisico (ABA)(S. Zhang y Wang 2017). Pero la expresión del transcrito de StSN1 se reporta en diferentes partes de la papa entre los cuales se pueden mencionar el tallo y yemas florales, en el arroz, OsGASR, se expresa en el meristemo apical (SAM), en las raíces y en las hojas, en alfalfa, la snakina MsSN1 se expresa en raíces, tallos, hojas y brotes florales(Su et al. 2020).

Metodología

Ubicación del experimento.

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Zoología, del departamento de Botánica, perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Localizado en Buenavista 1923, en la ciudad de Saltillo, municipio de Coahuila de Zaragoza. Con una latitud de 25° 35' 19.95'' N, longitud de 101° 1' 53.06'' O, y una altitud de 1742 m sobre el nivel del mar. A siete kilómetros al sur de la capital.

Búsqueda de las secuencias putativas de las snakinas en el genoma de *Phaseolus vulgaris*.

Para realizar la búsqueda de las secuencias se empleó el servidor “Phytozome 13” (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) y el servidor “UniProtKB” (<https://www.uniprot.org/>), para identificar las secuencias putativas de las snakinas. Para realizar la búsqueda en los servidores mencionados se utilizaron dos estrategias. En la primera, se utilizó la búsqueda por el nombre del organismo “*Phaseolus vulgaris*” usando como palabra clave “snakin” y se descargaron las secuencias arrojadas por la plataforma. En la segunda con el número de acceso de la snakina (BG 597515.1 snakina-1) de *Solanum tuberosum* de acuerdo a Berrocal-Lobo, et al. (2002), se realizó un BLAST empleando el servidor BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Protein) del “Phytozome 13”. Con las secuencias se realizó la determinación del punto isoelectrico y del peso molecular utilizando el portal expasy (https://web.expasy.org/compute_pi/), para la determinación de la localización subcelular se empleó el programa WoLF PSORT: Advanced Protein Subcellular Localization Prediction Tool (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>).

Análisis del transcriptoma “in silico” de las snakinas expresadas diferencialmente en el genoma de *P. vulgaris*.

Se efectuó un análisis del transcriptoma de *Phaseolus vulgaris* depositado en el atlas de expresión génica basado en RNA-Seq en (<https://www.zhaolab.org/PvGEA/>) publicado por Jamie A O'Rourke, y col 2014. En las muestras de diversas partes de la planta *Phaseolus vulgaris* cv. negro Jamapa. Para la adquisición de los datos se restringió a los de la zona de la raíz y en el proceso de la nodulación con los datos se generará un mapa de calor en el software GraphPad Prism (GraphPad Software 8.1).

Diseño de oligonucleótidos específicos.

De las secuencias que se expresaron diferencialmente se tomaron las secuencias que se que mostraron un nivel de expresión significativo con respecto al control y se le diseñaron los oligonucleótidos para amplificar toda la secuencia codificante y parte del 3UTR, utilizando el software SnapGene (4.0.7).

Síntesis de los oligonucleótidos.

Se enviaron a sintetizar los oligonucleótidos en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México campus Cuernavaca con especificaciones en la página de la institución (<http://oldwww.ibt.unam.mx/sintesis/busquedas.html>).

Amplificación por PCR de la secuencia snakina 25 expresada diferencialmente.

Se encontraron diferentes secuencias expresadas diferencialmente y se decidió trabajar únicamente con la secuencia denominada snakina 25, se utilizó como molde cDNA de *Phaseolus vulgaris*, proporcionado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). Para la reacción de amplificación se empleó un termociclador (Maxigene II de Axygen™) considerando los siguientes parámetros. Una temperatura inicial en el primer paso de 95 °C por dos minutos. Seguido de 35 ciclos que consistieron en la etapa de desnaturalización (95 °C por 30 segundos), en la etapa de alineación (62 °C por 20 segundos) y la etapa de elongación (72 °C por 30 segundos). Finalmente, en el tercer paso se fijó una temperatura de 18 °C durante 5 minutos. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR fueron: FwSnakina 25 y RiSnakina 25, las de estos oligos y sus características, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados, para la amplificación por PCR de la secuencia de interés.

Oligonucleótido	Secuencia 5'----3'	Tm
FwSnakin25	CACCATGGCCATCTCTAAGCTTCTCTGC	65 °C
RiSnakin25	CCAGAAGAACAGCCCTCTCATA	59° C

La reacción de PCR, se realizó a un volumen final de reacción de 20 (μL). A continuación, se enuncian los componentes contenidos en la mezcla de reacción como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción de la PCR

Componentes	Volumen (μL)
cDNA (10pg)	1
Oligo Fw (0.1pMol)	1
Oligo Rv (0.1pMol)	1
Master Mix (2X)	10
H ₂ O	7
Volumen Final	20

Corrimiento electroforético y purificación del producto de PCR.

El producto de PCR fue analizado empleando un gel de agarosa al 1.5%, usando una solución amortiguadora de corrimiento de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). La muestra fue mezclada con 7 μL de colorante de carga de gel de ADN (6X), Thermo Scientific™. La electroforesis se realizó aplicando un voltaje constante de 90 V por 45 min. Posteriormente, el gel fue visualizado empleando un sistema de documentación para geles de electroforesis, de transiluminación por UV (GD-1000 de Axygen™). A partir de este gel de agarosa, se cortó y purificó la banda con el fragmento de interés, utilizando el kit de purificación (GeneJET PCR de Thermo Scientific™). Brevemente, se agregaron 800 μL del “Binding Buffer” a un tubo eppendorf que contenía el fragmento del gel con el amplicón de la secuencia de la snakina 25. Se mezcló hasta la disolución del gel. La solución se transfirió a una columna de purificación “GeneJET”, y se centrifugó durante 60 s, desechando el sobrenadante. Luego se añadieron 700 μL de “Wash Buffer” a la columna de purificación. Se centrifugó durante 60 s, y se desechó el sobrenadante. De nueva cuenta, se colocó la columna de purificación en un tubo de recolección, se centrifugó la columna de purificación vacía durante 1 minuto, (con la finalidad de eliminar por completo cualquier residuo del “Wash Buffer”). Se colocó la columna de purificación en un nuevo tubo de 1.5 mL para PCR. Se Añadieron 50 μL de “Elution Buffer”, sobre la membrana de la columna de purificación, se centrifugó por 1 min. Finalmente, el ADN purificado fue almacenado a una temperatura de (-20 ° C).

Clonación y purificación.

A partir del cDNA de frijol se amplificó la secuencia de la snakina 25 utilizando los oligonucleótidos FWSnakina 25 5'-CACCATGGCCATCTCTAAGCTTCTCTGC-3' y el RiSnakina 25 5'-CCAGAAGAACAGCCCTCTCATAC-3' que comprende desde el CDS y parte de la región 3'UTR. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector de entrada pENTR/D-TOPO. Brevemente, se toman 2 µL del producto de PCR y se colocan en un tubo eppendorf de 1.5mL, posteriormente se agrega 1 µL del vector pENTRD y 3 µL de agua y se deja por 15 min, finalmente se transforma *E.coli* acorde a las recomendaciones del fabricante.

PCR en colonia.

Para comprobar si las colonias transformadas presentaban el inserto, se realizó una PCR en colonia. Las condiciones en la mezcla para la reacción de PCR se indican en la Tabla 3 utilizando los mismos parámetros de amplificación mencionados arriba para la RT-PCR.

Tabla 3. Componentes de la mezcla para la PCR del vector que contiene el inserto con la secuencia de interés.

Componentes	Volumen (µL)
FP4 (1pMol)	1
RiRNA187400(1pMol)	1
DNA molde	1
Master Mix (2X)	15
H2O	12
Volumen Final	30

En esta reacción de PCR se consideraron los oligonucleótidos para el vector FP4 y el oligonucleótido reverso específico de nuestra secuencia de interés RiSnakina 25 (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR en colonia.

Nombre	Secuencia 5'-----3'	Tm
FP4	TCCTACTCAGGAGAGCGTTCACC	62°C
RiSnakina 25	CAGAAGAACAGCCCTCTCATAC	59° C

Extracción del plásmido y Electroforesis.

El plásmido se purificó a partir de las de las colonias de *E. coli* confirmadas por PCR en colonia y se utilizó el kit de extracción de plásmidos (FavorGreen™) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Brevemente, de un cultivo de 10mL de toda la noche de *E.coli* con kanamicina a 50ug/mL, se transfirieron 2 mL del cultivo a un tubo para centrifugarse a 7000xg, por 3 min, y se desechó por completo el sobrenadante. Se agregaron 200 µL del Buffer FAPD1 (RNasa A) al paquete celular. Luego, se añadieron 200 µL del Buffer FAPD2 invirtiendo suavemente el tubo entre 5-10 veces. Esta mezcla, fue incubada a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 300 µL de Buffer FAPD3 e invirtiendo ligeramente el tubo de 5-10 veces. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a la columna FAPD, y se centrifugó a 10,000xg durante 30 s. Se añadieron 400 µL del Buffer WP a la columna FAPD y se centrifugó a 10,000xg por 30 s. Acto seguido, se añadieron 700 µL de Buffer de lavado a la columna FAPD, y se centrifugó a 10,000xg, por 30 s. Luego se centrifugó a 10,000xg, durante 3 min. Se recolectó el contenido en un tubo nuevo agregando 100 µl del Buffer de elución al centro de la membrana de la columna FAPD. Se dejó reposar la columna durante 1 min. Por último, se centrifugó a máxima velocidad, durante 1 min para la elución del ADN plasmídico, y se almacenó a -20 ° C. Finalmente, el plásmido extraído fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, empleando el sistema de documentación de geles por UV (GD-1000 de Axygen™).

Cuantificación de la muestra.

Una vez analizada la muestra del DNA plasmídico, mediante el corrimiento electroforético. Esta misma fue enviada para su cuantificación por Nanodrop al Centro de investigación en Química Aplicada (CIQA) Saltillo Coah. De esta manera se asegura que se cumpla con las especificaciones de muestra requeridas para su ulterior secuenciación.

Secuenciación.

La secuenciación de la muestra se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM) Cuernavaca Mor. Se aseguró que la muestra tuviera una concentración aproximada de 200 ng/ µL. La mezcla DNA/Oligo se entregó vía paquetería en un volumen final de 16 µL, en un tubo eppendorf para PCR de 0.2 mL.

Alineamiento múltiple de secuencias y Modelado estructural de la secuencia.

Para el análisis del alineamiento múltiple de secuencias, se descargaron de las bases de datos: UniProt (<https://www.uniprot.org/>), PDB (<https://www.rcsb.org/>) y del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de las secuencias de diversos organismos de origen vegetal en los que se han reportado snakinas. Posterior, se realizó el análisis de secuencias por alineamiento múltiple, utilizando el programa T-Coffee, contenido en el software UGENE (40.0). Para realizar el modelado estructural de la secuencia se realizó un alineamiento estructural de proteínas de snakinas ya reportadas STRAP (Structural Aligament Program for Proteins).

Identificación de los dominios GASA/Snakin

Para la identificación de los dominios GASA/Snakin la secuencia putativa de la snakina se utilizó la herramienta SMART (Simpler Molecular Architecture Research Tool).

Resultados y Discusión.

Búsqueda e identificación de las secuencias putativas de las snakinas en el genoma de *Phaseolus vulgaris*

Para el análisis bioinformático se tomó de referencia la secuencia BG 597515.1 (Genebank) ya que pertenece a una secuencia de snakina de *Solanum tuberosum*. Esta secuencia se analizó mediante un BLAST con el genoma de *Phaseolus vulgaris* en el repositorio de Phytozome v13 encontrando 25 posibles secuencias. De igual forma se obtuvieron las mismas secuencias utilizando la búsqueda por palabra clave en el Phytozome v13. El porcentaje de similitud entre las 25 secuencias de snakinas encontradas en el genoma de *Phaseolus vulgaris* oscila entre un 36 a 67 % respecto a la secuencia usada de *Solanum tuberosum*. Los datos son similares si comparamos entre otras plantas descritas en donde se describen como una familia multigénica plantas (Han et al. 2021). El posterior análisis de las propiedades fisicoquímicas de las snakinas mostro que tienen un tamaño alrededor de los 88 a los 179 aminoácidos, un peso molecular de 9.4 a 19.15 kDa, con puntos isoeléctricos de 7.47 a 9.59 y la predicción de la posible localización subcelular las coloca como proteínas extracelulares excepto a la snakina 17 como se muestra en la tabla 5, resultados similares se obtienen en otros análisis realizados en otras plantas en donde se muestra que las snakinas son parte de una familia multigénica (Su et al. 2020).

Tabla. 5. Número de secuencias y valores fisicoquímicos para las secuencias de las snakinas determinadas en el genoma de *P. vulgaris*

Nombre	Tamaño a.a	Peso molecular (MW)	isoelectrico (PI)	Posible localización celular
PvGASA1	99	10.49	9.07	ES
PvGASA2	99	10.78	8.5	ES
PvGASA3	99	10.85	8	ES
PvGASA4	99	10.67	8.3	ES
PvGASA5	106	11.43	7.47	ES
PvGASA6	88	9.4	9.3	ES
PvGASA7	144	15.87	9.25	ES
PvGASA8	92	10.23	8.61	ES
PvGASA9	92	10.35	8.87	ES
PvGASA10	116	12.69	8.26	ES
PvGASA11	117	12.88	9.03	ES
PvGASA12	114	12.54	8.25	ES
PvGASA13	179	19.15	9.19	ES
PvGASA14	110	12.25	9.52	ES
PvGASA15	90	9.86	8.69	ES
PvGASA16	96	10.53	8.94	ES
PvGASA17	113	12.71	9.59	PM
PvGASA18	145	15.01	9.25	ES
PvGASA19	109	12.1	9.32	ES
PvGASA20	97	10.73	9.36	ES
PvGASA21	97	10.73	9.36	ES
PvGASA22	99	10.83	9.1	ES
PvGASA23	89	9.64	8.93	ES
PvGASA24	116	12.69	8.45	ES
PvGASA25	112	12.38	9.22	ES

Análisis transcriptómico “in silico” de las snakinas expresadas diferencialmente en el genoma de *P. vulgaris*.

Las 25 secuencias encontradas de snakina en el genoma de *Phaseolus vulgaris* se analizaron en la base de datos de Zhaolab (<https://www.zhaolab.org/PvGEA/>) en la que se encontró la expresión de genes perfiladas en RPKM (Reads per million mapped reads) con valores normalizados expresadas diferencialmente en el proceso de nodulación. Se observa que varias secuencias de las 25 presentan un cambio en sus niveles de expresión, en la tabla 6 se describen las condiciones analizadas en el transcriptoma y en la figura 2, se muestran las 25 secuencias en un mapa de calor, en el cual podemos observar que de manera general todas las snakinas se encuentran expresadas de manera basal en las muestras analizadas de raíz y nódulos, lo que puede indicar que pueden tener un papel importante en el proceso de nodulación, diferenciación celular o como agentes antimicrobianos ya que análisis similares de expresión en plantas que no nodulan muestran un nivel basal de las snakinas o pueden expresarse de manera diferencial bajo un estrés biótico o abiótico (Filiz y Kurt 2020; M. Zhang, Wang, y Jian 2022; Su et al. 2020).

Tabla 6. Muestras analizadas del análisis transcriptómico de *P. vulgaris*

Nombre	Tejido	Tratamiento	Tiempo
PvRT	Punta de raíces	Fertilizante NO3	
PvYR	Raíces jóvenes	Fertilizante NO3	
PvR5	Raíz a los 5 días post infección	Inoculada +Rizobium tropici	5 días
PvRF	Raíz	Fertilizante NO3	21 días
PvRE	Raíz	Inoculada +Rizobium tropici	21 días
PvRI	Raíz	Inoculada-Rizobium giardini	21 días
PvN5	Nódulos a los 5 días post infección	Inoculada +Rizobium tropici	5 días
PvNI	Nódulo	Inoculada-Rizobium giardini	21 días
PvNE	Nódulo	Inoculada +Rizobium tropici	21 días

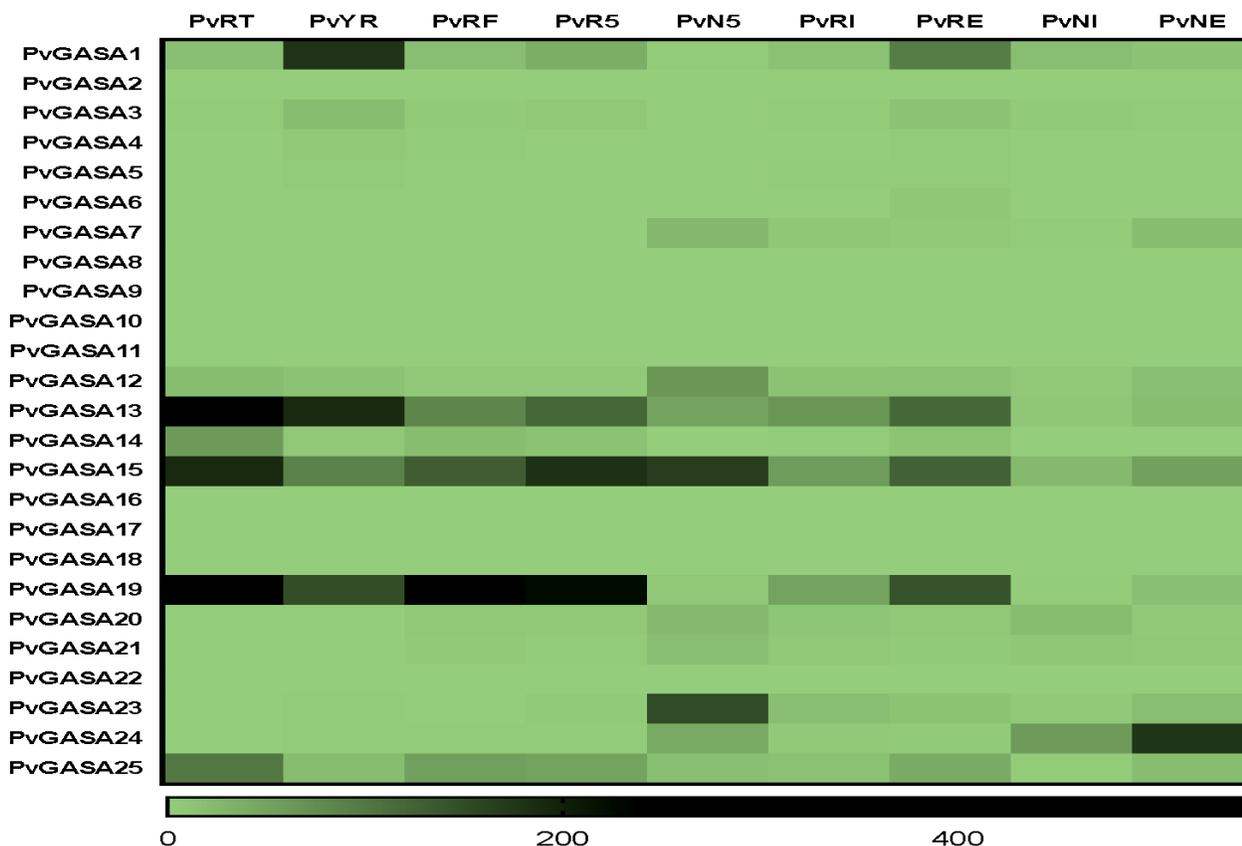


Figura 2. Mapa de calor de las snakinas expresadas en el proceso de nodulación de *P. vulgaris*. En dónde las columnas PvRT (Punta de raíces), PvYR (Raíces jóvenes), PvR5 (Raíz a los 5 días post infección), PvRF (Raíz), PvRE (Raíz), PvRI (Raíz), PvN5(Nódulo), PvNE (Nódulo), PvNI (Nódulo).

Amplificación por PCR de una snakina a partir de cDNA y su clonación en el vector pENTRD.

Se amplificó a partir de cDNA de raíces sin inocular la secuencia de la snakina 25, y se observaron 2 μ L del producto de PCR en un gel de agarosa al 2%, se observó únicamente la banda esperada de 42pb y se prosiguió a realizar la clonación en el vector pENTRD. En la figura 3 se muestra la amplificación de la secuencia de interés la cual tiene una talla molecular de 542pb y corresponde el tamaño esperado a partir de cuatro colonias que fueron seleccionadas posteriormente de la transformación para ser utilizadas para realizar la PCR en colonia, de las colonias positivas se les extrajo el plásmido para ser enviada a la unidad de secuenciación del IBt-UNAM.

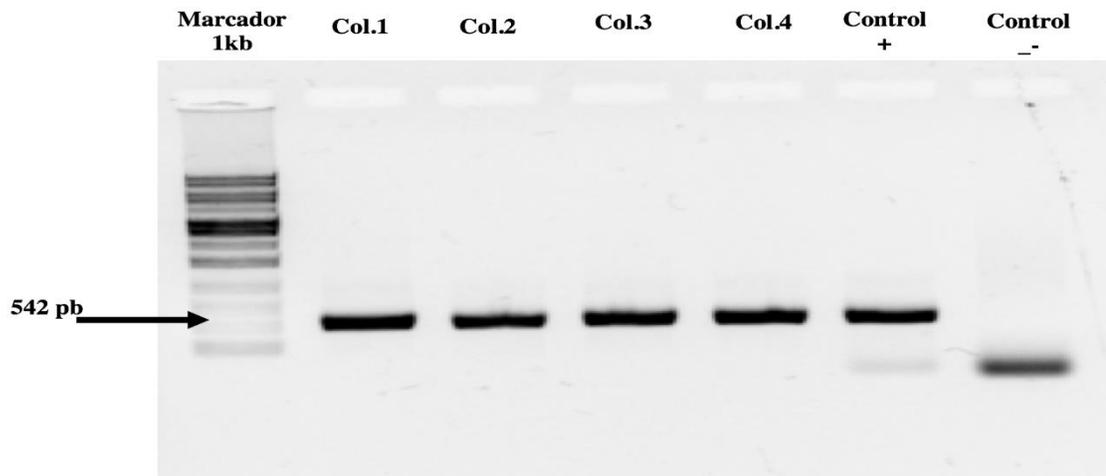


Figura 3. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR en colonia. El primer carril corresponde al marcador molecular de 1kb, carril 2, 3, 4 y 5; cuatro colonias distintas las cuales presentan el tamaño esperado, carril control positivo el cual es el producto de PCR purificado y el control negativo el cual no contiene molde.

Secuenciación

Los datos obtenidos del alineamiento de los electroferogramas con la secuencia de interés se muestran en la figura 4, en dónde se puede observar que se alinean sin presentar errores en la secuencia de la snakina 25, la cual se utilizara posteriormente para recombinarla en un vector binario que permita la expresión de la secuencia bajo un promotor constitutivo como el 35s, en la figura 5 se representa el

vector final pENTRD-Snakina25 generado en este trabajo el cual cuenta con los sitios attLs necesarios para el sistema Gateway.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60      70
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TAGGGCGGGC GTACCTGCCG GCCACCCTTT SGGGCGTGCT TCACACGTTC ATTCGGTCCC GCCGATGTTC
-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      80      90      100     110     120     130     140
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TACTCAGAGA GCGTTCACGA CAAACACAGA TAAACGAAA GGGCCAGTCT TCCGACTGAG CCTTTCGTTT
-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      150     160     170     180     190     200     210
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TATTTGATGC CTGGCAGTTC CCTACTCTCG CGTTAACGCT AGCATGGATG TTTTCCCAGT CACGACGTTG
-----
TATTTGATGC CTGGCAGTTC CCTACTCTCG CGTTAACGCT AGCATGGATG TTTTCCCAGT CACGACGTTG
-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      220     230     240     250     260     270     280
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TAAACGAGC GCCAGTCTTA AGCTCGGGCC CCAATAATG ATTTTATTTT GACTGATAGT GACCTGTTCG
-----
TAAACGAGC GCCAGTCTTA AGCTCGGGCC CCAATAATG ATTTTATTTT GACTGATAGT GACCTGTTCG
-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      290     300     310     320     330     340     350
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TTGCAACAAA TTGATGAGCA ATGCTTTTTT ATAATGCCAA CTTTGTACAA AAAAGCAGGC TCCGCGGCCG
-----
TTGCAACAAA TTGATGAGCA ATGCTTTTTT ATAATGCCAA CTTTGTACAA AAAAGCAGGC TCCGCGGCCG
-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360     370     380     390     400     410     420
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
CCCCCTTCAC CATGGCCATC TCTAAGCTTC TCTGCGTTCT GCTTCTGGCT CTCCTTGGCC TCTCCATGAT
-----
CCCCCTTCAC CATGGCCATC TCTAAGCTTC TCTGCGTTCT GCTTCTGGCT CTCCTTGGCC TCTCCATGAT
-----
-----ATGGCCATC TCTAAGCTTC TCTGCGTTCT GCTTCTGGCT CTCCTTGGCC TCTCCATGAT
-----
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430     440     450     460     470     480     490
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
CACAACCTCAG GTTATGGCAA ACGATGCTGC TTATCACTTA GACCGAAGTA ATAATGGATC CGGGAGGAAT
-----
CACAACCTCAG GTTATGGCAA ACGATGCTGC TTATCACTTA GACCGAAGTA ATAATGGATC CGGGAGGAAT
-----
CACAACCTCAG GTTATGGCAA ACGATGCTGC TTATCACTTA GACCGAAGTA ATAATGGATC CGGGAGGAAT
-----
*****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      500     510     520     530     540     550     560
7884
7885
pEnt er Snak
Q ust al Co
-----
TATGGACCTG GGAGTCTAAG GAGCTCACAG TGCCCTCTG AATGCACAAG AAGATGTAGC CAGACACAGT
-----
TATGGACCTG GGAGTCTAAG GAGCTCACAG TGCCCTCTG AATGCACAAG AAGATGTAGC CAGACACAGT
-----
TATGGACCTG GGAGTCTAAG GAGCTCACAG TGCCCTCTG AATGCACAAG AAGATGTAGC CAGACACAGT
-----
*****

```

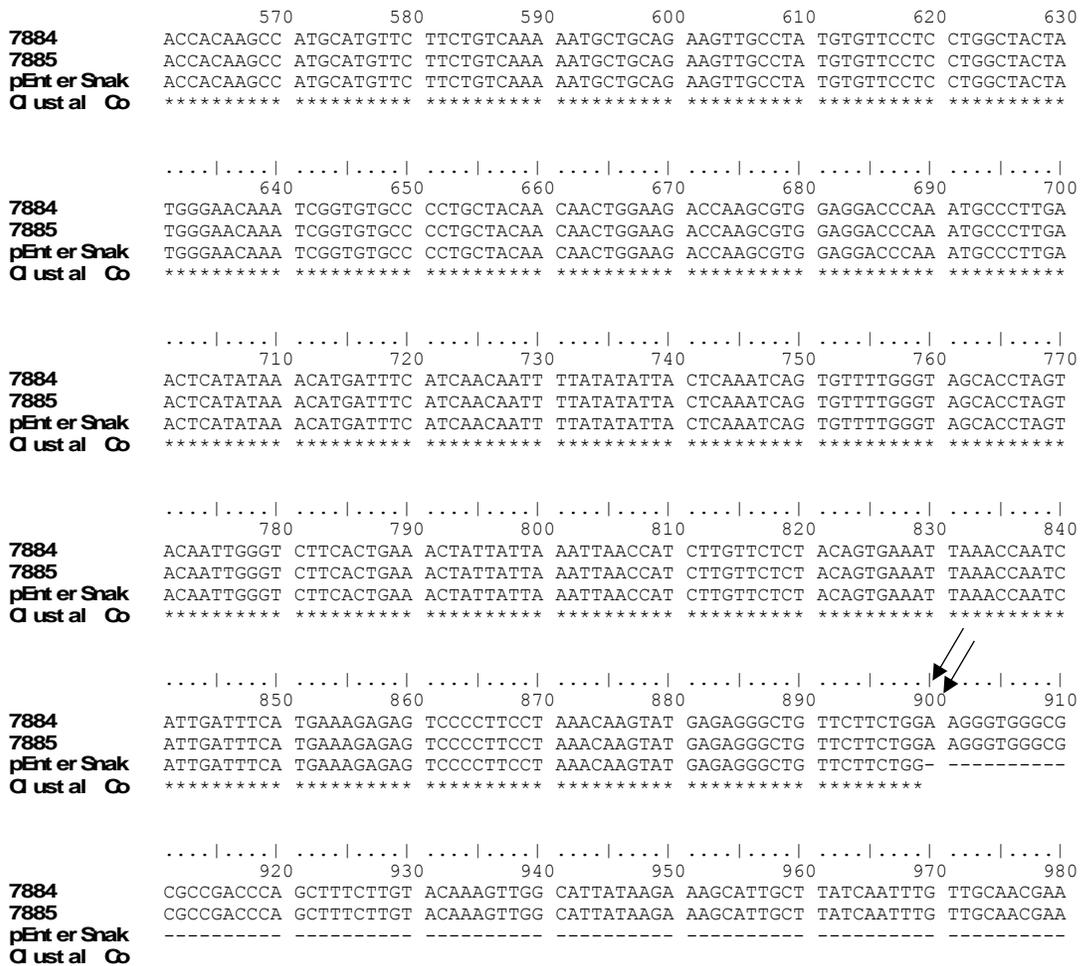


Figura 4. Alineamiento múltiple de la snakina 25. Para realizar el alineamiento se tomaron las secuencias enviadas por la unidad de síntesis y secuenciación las cuales corresponden a la secuencia 7884, 7885 y la secuencia teórica pENTRD-Snakina25, la secuencia de interés inicia dónde lo indica la flecha y termina en las dos flechas.



Figura 5. Representación de la construcción pENTRD-Snakina 25. En el mapa del vector se muestra la secuencia codificante de la Snakina 25 en color guinda y el 3UTR en color gris.

Alineamiento múltiple de secuencias y Modelado estructural de la secuencia.

Alineamiento estructural

Con la confirmación de la secuencia realizó un alineamiento estructural de proteínas del tipo snakina reportadas, tomando como base la secuencia 5E5Q obtenida del repositorio PDB y se sometió al análisis en el programa STRAP (Structural Aligantment Program for Proteins) con las secuencias StSN1 (Q948Z4) y StSN2 (Q93X17) de *Solanum tuberosum*, SISN2 (ASE32106) de *Solanum lycopersicum*, CaSN1 (ACC91329) de *Capsicum annum*, PaSn (AGC92009) de *Persea americana* y Snakina 25. Se encontró que presentan los rizos alpha hélices característicos de las snakinas, además de tener las 12 cisteínas conservadas en otras plantas analizadas como se muestra en la figura 6 (Porto y Franco 2013).

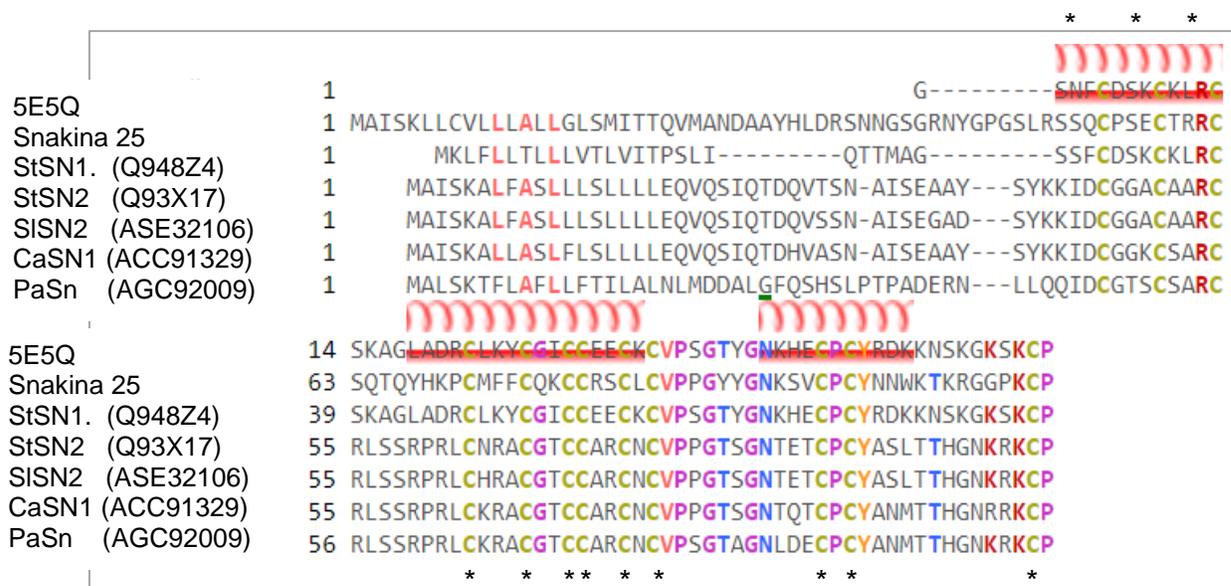


Figura 6. Alineamiento estructural de la Sankina 25 de *P.vulgaris*. Se alinearon las secuencias reportadas de StSN1 (Q948Z4) y StSN2 (Q93X17) de *Solanum tuberosum*, SISN2 (ASE32106) de *Solanum lycopersicum*, CaSN1 (ACC91329) de *Capsicum annum*, PaSn (AGC92009) de *Persea americana* utilizando como molde la secuencia snakin-1(5E5Q) sintetizada químicamente.

Identificación de los dominios GASA

El dominio GASA de acuerdo con Zhang y Wang, (2017) se encuentra dentro de los 120 residuos en el C-terminal. Se puede apreciar en las diferentes snakinas una región variable de péptido señal que de acuerdo con lo obtenido con la herramienta SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) y un dominio GASA con 12 cisteínas conservadas en la región C-terminal lo cual concuerda con otras secuencias analizadas de las Snakinas en plantas ya que presenta un péptido señal marcado en la figura con rojo y el dominio GASA en color negro como se muestra en la figura 7.

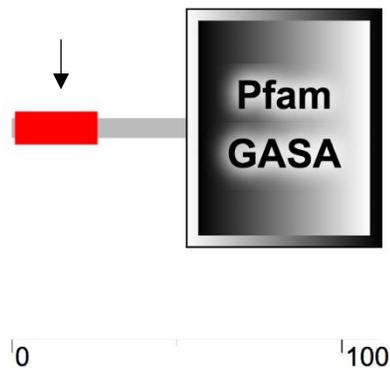


Figura7. Búsqueda del dominio GASA en la secuencia Snakina 25. El análisis de la secuencia peptídica muestra que la proteína presenta un péptido señal marcado con la flecha y el dominio GASA característico de las snakinas.

Conclusión

- ❖ En este trabajo se identificaron 25 secuencias de snakinas en el genoma de *P. vulgaris*.
- ❖ Se encontraron expresadas todas las secuencias en las muestras analizadas del transcriptoma reportado de *Phaseolus vulgaris*.
- ❖ Se amplificó la región codificante del gen de interés Snakina 25 y se clonó en el vector de entrada tipo Gateway pENTR/D el cual servirá para posteriores estudios.
- ❖ El análisis de la secuencia snakina 25 muestra los residuos de cisteína característicos del dominio GASA/Snakina.

Bibliografía

1. Aguilar, O Mario, Omar Riva, y Eitel Peltzer. 2004. «Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (37): 13548-53.
2. Bakare, Olalekan O., Arun Gokul, Adewale O. Fadaka, Ruomou Wu, Lee-Ann Niekerk, Adele M. Barker, Marshall Keyster, y Ashwil Klein. 2022. «Plant Antimicrobial Peptides (PAMPs): Features, Applications, Production, Expression, and Challenges». *Molecules* 27 (12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123703>.
3. Cardillo, Alejandra, Maria Martinez Ceron, Stella Romero, Osvaldo Cascone, Silvia Camperi, y Silvana Giudicessi. 2018. *Péptidos antimicrobianos de plantas*.
4. Celmeli, Tugce, Hatice Sari, Huseyin Canci, Duygu Sari, Alper Adak, Tuba Eker, y Cengiz Toker. 2018. «The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties». *Agronomy* 8 (9). <https://doi.org/10.3390/agronomy8090166>.
5. Coss-Navarrete, Evelia Lorena, Armando Díaz-Valle, y Raúl Alvarez-Venegas. 2020. «Induction of plant resistance to biotic stress by priming with β -aminobutyric acid (BABA) and its effect on nitrogen-fixing nodule development». En *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*, 101-14. Elsevier.
6. Didinger, Chelsea, Michelle Foster, Marisa Bunning, y Henry Thompson. 2022. «Nutrition and Human Health Benefits of Dry Beans and Other Pulses». En , 481-504. <https://doi.org/10.1002/9781119776802.ch19>.
7. Filiz, Ertugrul, y Firat Kurt. 2020. «Antimicrobial peptides Snakin/GASA gene family in sorghum (*Sorghum bicolor*): Genome-wide identification and bioinformatics analyses». *Gene Reports* 20 (septiembre): 100766. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100766>.
8. Furukawa, Tomoyuki, Norihiro Sakaguchi, y Hiroaki Shimada. 2006. «Two OsGASR genes, rice GAST homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles». *Genes & Genetic Systems* 81 (3): 171-80. <https://doi.org/10.1266/ggs.81.171>.
9. Ganesan, Kumar, y Baojun Xu. 2017. «Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>.
10. García, Araceli Nora, Nicolás Daniel Ayub, Ana Romina Fox, María Cristina Gómez, María José Diéguez, Elba María Pagano, Carolina Andrea Berini, Jorge Prometeo Muschietti, y Gabriela Soto. 2014. «Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia». *BMC Plant Biology* 14 (1): 248. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0248-9>.
11. García, Sergio Calvo. 2011. «Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno». *Cuadernos del Tomás*, n.º 3: 173-86.
12. Han, Shuo, Zhiyin Jiao, Meng-Xue Niu, Xiao Yu, Mengbo Huang, Chao Liu, Hou-Ling Wang, et al. 2021. «Genome-Wide Comprehensive Analysis of the GASA Gene Family in *Populus*.» *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212336>.
13. Hirsch, Ann M, Michelle R Lum, y J Allan Downie. 2001. «What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?» *Plant physiology* 127 (4): 1484-92.
14. Jan, Sofora, Irshad Ahmad Rather, Parvaze Ahmad Sofi, Mohd Altaf Wani, Farooq Ahmad Sheikh, Mohammad Ashraf Bhat, y Reyazul Rouf Mir. 2021. «Characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm for morphological and seed nutrient traits from Western Himalayas». *Legume Science* 3 (2): e86. <https://doi.org/10.1002/leg3.86>.

15. Kenny, Reece G., y Celine J. Marmion. 2019. «Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs—A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?» *Chemical Reviews* 119 (2): 1058-1137. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00271>.
16. Li, Kun-Lun, Xi Bai, Yong Li, Hua Cai, Wei Ji, Li-Li Tang, Yi-Dong Wen, y Yan-Ming Zhu. 2011. «GsGASA1 mediated root growth inhibition in response to chronic cold stress is marked by the accumulation of DELLAs». *Journal of Plant Physiology* 168 (18): 2153-60. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.07.006>.
17. Li, Wenyi, Frances Separovic, Neil M. O'Brien-Simpson, y John D. Wade. 2021. «Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs». *Chemical Society Reviews* 50 (8): 4932-73. <https://doi.org/10.1039/D0CS01026J>.
18. Maan, Anna M. C., Anton H. Hofman, Wiebe M. de Vos, y Marleen Kamperman. 2020. «Recent Developments and Practical Feasibility of Polymer-Based Antifouling Coatings». *Advanced Functional Materials* 30 (32): 2000936. <https://doi.org/10.1002/adfm.202000936>.
19. Magana, Maria, Muthuirulan Pushpanathan, Ana L Santos, Leon Leanse, Michael Fernandez, Anastasios Ioannidis, Marc A Giulianotti, et al. 2020. «The value of antimicrobial peptides in the age of resistance». *The Lancet Infectious Diseases* 20 (9): e216-30. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3).
20. Nahirñak, Vanesa, Natalia Inés Almasia, Paula Virginia Fernandez, Horacio Esteban Hopp, José Manuel Estevez, Fernando Carrari, y Cecilia Vazquez-Rovere. 2012. «Potato Snakin-1 Gene Silencing Affects Cell Division, Primary Metabolism, and Cell Wall Composition». *Plant Physiology* 158 (1): 252-63. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186544>.
21. Nahirñak, Vanesa, Máximo Rivarola, Martín Gonzalez de Urreta, Norma Paniego, Horacio Esteban Hopp, Natalia Inés Almasia, y Cecilia Vazquez-Rovere. 2016. «Genome-wide Analysis of the Snakin/GASA Gene Family in *Solanum tuberosum* cv. Kennebec». *American Journal of Potato Research* 93 (2): 172-88. <https://doi.org/10.1007/s12230-016-9494-8>.
22. Porto, William F., y Octavio L. Franco. 2013. «Theoretical structural insights into the snakin/GASA family». *Peptides* 44 (junio): 163-67. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.014>.
23. Quinto, Carmen, y Luis Cárdenas. 2007. «Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol». *Biotecnología* 14: 273-80.
24. Sangerman-Jarquín, Dora, Jorge Acosta-Gallegos, Rita Rindermann, Miguel Damián-Huato, y Bertha Saavedra. 2010. «Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México». *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 1 (septiembre): 363-80.
25. Sauviac, Laurent, Antoine Rémy, Emeline Huault, Mélanie Dalmasso, Théophile Kazmierczak, Marie- Françoise Jardinaud, Ludovic Legrand, Corentin Moreau, Bryan Ruiz, y Anne- Claire Cazalé. 2022. «A dual legume- rhizobium transcriptome of symbiotic nodule senescence reveals coordinated plant and bacterial responses». *Plant, Cell & Environment*.
26. Schultze, M, y Adam Kondorosi. 1998. «Regulation of symbiotic root nodule development». *Annual review of genetics* 32: 33.
27. Silverstein, Kevin A.T., William A. Moskal Jr., Hank C. Wu, Beverly A. Underwood, Michelle A. Graham, Christopher D. Town, y Kathryn A. VandenBosch. 2007. «Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants». *The Plant Journal* 51 (2): 262-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x>.
28. Su, Tao, Mei Han, Dan Cao, y Mingyue Xu. 2020. «Molecular and Biological Properties of Snakins: The Foremost Cysteine-Rich Plant Host Defense Peptides». *Journal of Fungi* 6 (4). <https://doi.org/10.3390/jof6040220>.
29. Torres, Gabriela, Francisco Hernández, Jorge Covarrubias-Prieto, Nicolás Vázquez, y Jorge Acosta-Gallegos. 2008. «Rendimiento y calidad de semilla de frijol en dos épocas de siembra

- en la región del Bajío». *Agricultura Técnica en México, ISSN 0568-2517, Vol. 34, N°. 4, 2008, pags. 421-430* 34 (diciembre).
30. Wang, Guangshun, Xia Li, y Zhe Wang. 2016. «APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education». *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D1087-93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
 31. Wu, Tianli, Chunzhen Cheng, Yun Zhong, Yuanda Lv, Yanyan Ma, y Guangyan Zhong. 2020. «Molecular characterization of the gibberellin-stimulated transcript of GASA4 in Citrus». *Plant Growth Regulation* 91 (1): 89-99. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00589-1>.
 32. Zhang, Liyuan, Xiaoli Geng, Haiyan Zhang, Chunlei Zhou, Aiju Zhao, Fei Wang, Yue Zhao, et al. 2017. «Isolation and characterization of heat-responsive gene TaGASR1 from wheat (*Triticum aestivum* L.)». *Journal of Plant Biology* 60 (1): 57-65. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0484-7>.
 33. Zhang, Mei, Zhengfeng Wang, y Shuguang Jian. 2022. «Genome-Wide Identification and Functional Analysis of the GASA Gene Family Responding to Multiple Stressors in *Canavalia rosea*». *Genes* 13 (11). <https://doi.org/10.3390/genes13111988>.
 34. Zhang, Shengchun, y Xiaojing Wang. 2017. «One new kind of phytohormonal signaling integrator: Up-and-coming GASA family genes». *Plant Signaling & Behavior* 12 (2): e1226453. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1226453>.
 35. Zhang, Shengchun, Chengwei Yang, Jianzong Peng, Shulan Sun, y Xiaojing Wang. 2009. «GASA5, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Molecular Biology* 69 (6): 745-59. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9452-7>.