

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



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

Por:

JESÚS ALBERTO GARCÍA GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Febrero 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN INGENIERÍA

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

Por:

JESÚS ALBERTO GARCÍA GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Presidente



Dra. Yolanda Ortega Ortega
Vocal



Dra. Aida Isabel Leal Robles
Vocal



Dra. Erika Nohemí Martínez Rivas
Vocal



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



Saltillo, Coahuila, México
Febrero 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN INGENIERÍA

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

Por:

JESÚS ALBERTO GARCÍA GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

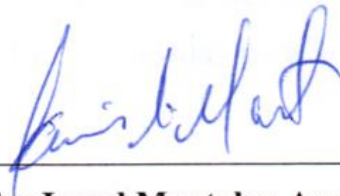
Aprobada por el Comité de Asesoría



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Asesor Principal Interno



Dra. Yolanda Ortega Ortega
Asesor Principal Externo



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Coasesor

Saltillo, Coahuila, México
Febrero 2022

AGRADECIMIENTOS

A Dios (el Dios de Spinoza), «¡Qué Dios bendiga a Dios!».

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que con magnánimo gesto me abrió sus puertas, y dispuso para mí los elementos necesarios para mi formación profesional. ¡Siempre noble y generosa mi Alma Terra Mater!

Al Dr. Marco Adán Juárez Verdayes, cuya instrucción académica, y compromiso intelectual, condicionaron y forjaron en mí el carácter para hacer siempre las cosas de la mejor manera posible. Así mismo, por la transmisión de sus conocimientos, experiencia, y del esfuerzo realizado en la orientación y corrección de este trabajo de tesis.

Al Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo, de igual manera, por la transmisión de sus conocimientos, experiencias, ideas, comentarios, y sugerencias sobre este trabajo de tesis, así como el empeño puesto para la revisión y corrección del mismo.

A la Dra. Yolanda Ortega Ortega, por fungir como mi asesora, por las facilidades brindadas, así como en la disposición para la revisión y corrección de este trabajo de tesis.

A la M.C. Ma. del Carmen Monserrat Quinto Hernández del Instituto de Biotecnología (IBt-UNAM), por la donación del material biológico (cDNA), a partir del cual fue posible el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), por las facilidades brindadas para la cuantificación de la muestra y congelación de la bacteria.

Por último; más allá de lo institucional, quisiera expresar mi gratitud y cariño para aquellos con quienes a lo largo de estos años han compartido conmigo su amistad, amor, lealtad, aprecio, y admiración. Al igual que Joaquín, «les debo algunos besos que valen más que el oro del Perú».

DEDICATORIA

Evocar siquiera la idea de recomenzar este proceso sin el apoyo de mi familia, me parece casi imposible. Motivo por el cual, dedico este pequeño gran logro con sobrado cariño, y sin ápice de atavismo o convencionalismo alguno a:

Mis padres Alfonso García de la Rosa, y María Guadalupe García Contreras. A mi madre por seguir creyendo en mí, cuando nadie más lo hizo ¡Gracias por tu amor y comprensión!

Mis abuelos Juan García y Esthela Contreras (a quien con osadía también le llamo mamá), por su crianza, su amor, y sus enseñanzas ¡Ah, y perdón por experimentar con sus macetas!

Mis tíos Socorro, Blanca y Gerardo García, por respaldarme con generosidad siempre en todo momento ¡La vida les colme de bendiciones!

A mis hermanos Ximena y Víctor, los pequeños de casa, por su apoyo y cariño, aunque muy a menudo «¡Los hermanos no admiten que a veces pasa el tiempo!».

**«Caminante, son tus huellas el camino y nada más;
caminante, no hay camino, se hace camino al andar».**

Antonio Machado

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.2. Hipótesis	14
1.3. Objetivos.....	14
1.3.1. Objetivo general	14
1.3.2. Objetivos específicos.....	14
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	15
2.1. Péptidos antimicrobianos.....	15
2.2. Características generales de las defensinas.....	17
2.3 Características generales de las defensinas vegetales.....	18
2.4. Clasificación de las defensinas	19
2.4.1 Trans-defensinas.....	20
2.4.2 Cis-defensinas	21
2.5 Clasificación de las defensinas vegetales (Cis-defensinas)	22
2.5.1 Cis-defensinas clase I.....	22
2.5.2 Cis-defensinas clase II.....	23
2.6 Características estructurales de las defensinas vegetales.....	23
2.6.1 Estructura primaria	23
2.6.2 Estructura secundaria	25
2.6.3 Estructura terciaria	26
2.7 Biosíntesis y distribución de las defensinas vegetales.....	27
2.8 Actividad biológica de las defensinas vegetales.....	27

III. METODOLOGÍA	30
3.1. Ubicación del experimento	30
3.2. Búsqueda de las secuencias putativas de las defensinas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	30
3.3. Análisis transcriptómico “in silico” de defensinas expresadas diferencialmente en el genoma de <i>P. vulgaris</i>	30
3.4. Amplificación por PCR de una defensina a partir de cDNA de <i>Phaseolus vulgaris</i>	31
3.4.1. Diseño de oligonucleótidos específicos	31
3.4.2. Amplificación por PCR de la secuencia Phvul.282400.....	31
3.4.3. Corrimiento electroforético y purificación del producto de PCR.....	32
3.4.4. Construcción del vector de expresión B-ptdTPhvul.282400.....	33
3.4.5. Digestión y purificación del vector B-ptdTPhvul.282400	33
3.4.6. Rellenado y ligación del vector B-Phvul.282400.....	34
3.4.7. Transformación en células quimiocompetentes de <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	35
3.4.8. PCR en colonia.....	36
3.4.9. Extracción del plásmido y Electroforesis	37
3.5. Cuantificación de la muestra	37
3.6. Secuenciación	38
3.7. Análisis bioinformático de la secuencia amplificada	38
3.7.1. Alineamiento múltiple de secuencias	38
3.7.2. Modelado estructural de la secuencia.....	39
3.8. Coexpresión del sistema de expresión binario B-ptdTPhvul.282400 en <i>Agrobacterium</i>	39
IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN	41
4.1. Búsqueda de las secuencias putativas de las defensinas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	41
4.2. Análisis transcriptómico “in silico” de <i>Phaseolus vulgaris</i>	41
4.3. Corrimiento electroforético de la amplificación por PCR de la secuencia de interés (Phvul.282400)	43
4.4. Secuenciación	44
4.5. Análisis bioinformático del resultado de la secuenciación	44
4.5.1. Alineamiento múltiple de secuencias	44

4.5.2 Modelado estructural de la secuencia.....	46
4.6 Subclonación del sistema de expresión binario B-ptdTPhvul.282400 en <i>Agrobacterium</i>	48
V. CONCLUSIÓN.....	49
VI. REFERENCIAS	50
VII. ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR del gen que codifica la secuencia de interés (Phvul.282400).	31
Tabla 2. Componentes de la mezcla para la reacción de PCR	32
Tabla 3. Componentes de la mezcla del coctel de digestión para el vector B-ptdTPhvul.282400 con FastDigest XbaI.....	33
Tabla 4. Componentes de la mezcla del coctel de ligación del vector. Ligación dependiente de T4 ligasa para el vector B-ptdTPhvul.282400 + el inserto de interés.	34
Tabla 5. Componentes de la mezcla para la reacción de PCR del vector que contiene el inserto con la secuencia de interés.....	36
Tabla 6. Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR en colonia.....	37
Tabla 7. Defensinas de origen vegetal empleadas en el alineamiento múltiple de secuencias. Se indica su nomenclatura, origen y el número de acceso correspondiente para cada una de ellas .	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético (sin raíz) de algunos PAM's de origen vegetal compilados en la base de datos PhytAMP. Tomado de (Hammami et al., 2009)	16
Figura 2. Representación esquemática de la estructura tridimensional típica de una defensina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PvD1)	19
Figura 3. Arquitectura de las cis/trans defensinas.....	20
Figura 4. Representación esquemática de la estructura terciaria de miembros de la superfamilia de las trans-defensinas en vertebrados	21
Figura 5. Representación esquemática de la estructura terciaria de miembros de la superfamilia de las cis-defensinas.....	22
Figura 6. Representación esquemática de la interacción entre los residuos de cisteínas en la estructura primaria de las defensinas vegetales	24
Figura 7. Representación esquemática de la estructura secundaria de las defensinas vegetales	25
Figura 8. Representación estructural del motivo γ -core	26
Figura 9. Mapa del plásmido B-ptdTPhvul.282400.....	35
Figura 10. Mapa del T-DNA del vector binario B-ptdTPhvul.282400.....	40
Figura 11. Mapa de calor muestra el perfil de los niveles de RPKM normalizados por la mediana de la secuencia Phvul.282400	42
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de la amplificación por PCR de la secuencia Phvul.282400	43
Figura 13. Electroferograma de la secuencia Phvul.282400. Muestra la lectura con los resultados reportados de la secuenciación de Phvul.282400.....	44
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias	45
Figura 15. Superposición de las estructuras terciarias generadas de la secuencia.....	47
Figura 16. Mapa del T-DNA dentro del vector binario B-ptdTPhvul.282400.....	48
Figura 17. Constancia de participación como ponente en sesión poster de los avances de esta tesis en las “Jornadas de investigación en Ciencias Biológicas (6a edición)”	55

RESUMEN

Las defensinas en plantas, son péptidos catiónicos de 45-54 residuos de aminoácidos, con una firma conservada de ocho residuos de cisteínas (C). Forman una estructura característica que consiste en una α hélice, y tres láminas β antiparalelas con motivos específicos. Exhiben una actividad antimicrobiana como su función principal. Por otro lado, existe un grupo de péptidos antimicrobianos 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. En el caso de nódulos determinados como los desarrollados en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium* no se han reportado este tipo de NCR. Sin embargo, en análisis transcriptómicos de *P. vulgaris* mediante RNA-seq se han encontrado secuencias putativas de péptidos antimicrobianos y de las defensinas que muestran cambios significativos en los niveles de expresión génica. No obstante, se desconoce si estos péptidos, en particular las defensinas, desempeñan alguna función en el proceso de nodulación. En el presente trabajo, se realizó la identificación de las secuencias putativas de las defensinas en el genoma de *P. vulgaris*. Una exploración en los transcriptomas de *P. vulgaris*, señala que dentro de las secuencias de las defensinas la secuencia denominada Phvul.282400 muestra un cambio significativo en los niveles de transcritos durante el proceso de nodulación. La secuencia codificante Phvul.282400 se amplificó a partir cDNA y se clonó en un vector binario de plantas. La clonación del fragmento con la secuencia Phvul.282400 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 la firma conservada de residuos de aminoácidos 8C, 2G y 1E. Un modelado estructural de la secuencia de residuos de aminoácidos Phvul.282400, usando como molde la estructura PDB: 6VPN, sugiere que el plegamiento es el característico de las defensinas. La secuencia Phvul.282400 se encuentra bajo el control del promotor constitutivo 35S del CaMV y el terminador NOS, que constituyen el cassette de expresión completo dentro este vector binario B-ptdTPhvul.282400. El resultado de este trabajo permitirá a futuro explorar el papel de las defensinas en el proceso de nodulación entre *P. vulgaris* y *Rhizobium* y será clave en estudios posteriores.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, Defensinas, Nodulación, Sobreexpresión, Clonación

I. INTRODUCCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (PAM's) son componentes implicados en los mecanismos de defensa de los seres vivos. A estos compuestos de origen proteico se les confiere propiedades antimicrobianas como su actividad principal (Azmi & Hussain, 2021; Li et al., 2021; Tang et al., 2018). No obstante, se ha documentado la sobreexpresión de estos péptidos antimicrobianos, denominados como defensinas, durante la formación de los nódulos determinados en la interacción simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y los microorganismos fijadores de nitrógeno que pudieran desempeñar un papel fundamental específico durante este proceso (O'Rourke et al., 2014).

La fijación simbiótica de nitrógeno es el proceso de convertir el N₂ atmosférico en compuestos nitrogenados que sean fácilmente asimilados por la planta huésped. Las raíces liberan señales moleculares en la rizosfera que atraen a los rizobios a las superficies del pelo de la raíz. Los rizobios invaden las raíces, viajan a las células de la corteza de las raíces, y hacen que estas se dividan y formen nódulos. De esta manera las bacterias le proveen a las plantas fuentes de nitrógeno de fácil asimilación, a cambio de esto, las bacterias reciben nutrientes y energía por parte de las plantas (Ferguson et al., 2019; Jiang et al., 2020).

Dado que *P. vulgaris* es una de las leguminosas de gran importancia para el consumo humano, es de particular interés el dilucidar la participación de las defensinas, para poder comprender el papel de estos PAM's durante las interacciones simbióticas en los sistemas agronómicos. De modo que, estos estudios permitan a futuro el posible establecimiento de los cultivos en zonas donde los suelos no cuentan con una fuente aceptable de nitrógeno necesaria para su crecimiento. Además, estudiar y comprender estos mecanismos, representa una alternativa agroecológica al uso de compuestos agrotóxicos para una transición hacia la incorporación de cultivos que eviten el uso de estos compuestos convencionales.

1.2. Hipótesis

Las defensinas son péptidos antimicrobianos que se encuentran conservados evolutivamente en plantas y le confieren resistencia a estrés biótico y abiótico. La identificación, caracterización y sobreexpresión del gen putativo Phvul.282400 que codifica para una defensina 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 defensina en el proceso de nodulación.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

1.3.1.1 Identificar y clonar el gen que codifica para la secuencia de una defensina a partir de cDNA de *Phaseolus vulgaris* que permita la construcción de un sistema de expresión binario.

1.3.2. Objetivos específicos

1.3.2.1. Realizar la búsqueda de las secuencias putativas de las defensinas

1.3.2.2. Analizar los transcriptomas reportados para *Phaseolus vulgaris* e identificar una de las secuencias de las defensinas expresadas diferencialmente

1.3.2.3. Amplificar por PCR la secuencia de interés (Phvul.282400) a partir de cDNA

1.3.2.4. Realizar un análisis bioinformático de la secuencia amplificada (Phvul.282400)

1.3.2.5. Construir un sistema de expresión en un vector binario de *Agrobacterium* que permita la expresión de la defensina en planta, para la generación de raíces transgénicas en *P. vulgaris*

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM's) son moléculas de origen natural y de composición proteica, codificadas por genes conservados evolutivamente con una amplia diversidad estructural y funcional (Huan et al., 2020; Moretta et al., 2021), se han identificado y aislado a partir de diversas fuentes como: plantas, animales, microorganismos e insectos (Porto et al., 2017). En un sentido más estricto, se trata de polipéptidos ubicuos, sencillos, relativamente pequeños, de bajo peso molecular y con una abundancia relativa de motivos de cisteína (Srivastava et al., 2021). La principal función descrita hasta la fecha, es que forman parte de la defensa del sistema inmune de los organismos ya que les confieren una resistencia contra un amplio espectro de patógenos, como: bacterias, hongos, parásitos y virus (Goyal & Mattoo, 2016; Höng et al., 2021).

Aunque los PAM's muestran una diversidad considerable en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, así como sus orígenes y mecanismos de acción, en donde estos PAM's comparten algunas características en común. En este sentido (Goyal & Mattoo, 2016), afirma que la distancia genética existente entre los diversos linajes evolutivos de las especies, indica la conservación de estas estructuras proteicas con un efecto mínimo en los eventos de especiación durante la evolución; los PAM's no están genéticamente separados en los organismos evolutivos divergentes. Es decir, los PAM's de origen vegetal, no presentan una constitución o propiedades demasiado desiguales respecto a los PAM's localizados en otras categorías taxonómicas (Campos et al., 2018).

El primer PAM reportado de origen vegetal fue la purotionina proveniente de *Triticum aestivum* presente en los granos de la harina de trigo (De Caley et al., 1972), citado por (Tang et al., 2018). Los PAM's obtenidos a partir de plantas, poseen características comunes y estructuras muy conservadas y compactas, con una alta estabilidad térmica, química y enzimática (Noonan et al., 2017; Tang et al., 2018).

Los PAM's de origen vegetal son clasificados de manera general en función de las secuencias que presentan sus aminoácidos, la homología de estas secuencias, los motivos estructurales que exhiben, así como el número de los residuos de cisteínas, y la posición que forman sus puentes disulfuro (Azmi & Hussain, 2021; Ozyigit et al., 2019; Tang et al., 2018). La clasificación de las principales familias de estos PAM's de origen vegetal, (Figura 1) son: Ciclotidos, Knotinas, Heveínas, α -Harpininas, Proteínas de Transferencia de Lípidos. (LTP's) y las Snakinas. Además, dentro de estos PAM's se encuentran los péptidos denominados como Tioninas y la familia de las Defensinas, siendo estos últimos de los PAM's de interés en este trabajo (Azmi & Hussain, 2021; Campos et al., 2018; Goyal & Mattoo, 2014; Hammami et al., 2009; Noonan et al., 2017; Tang et al., 2018).

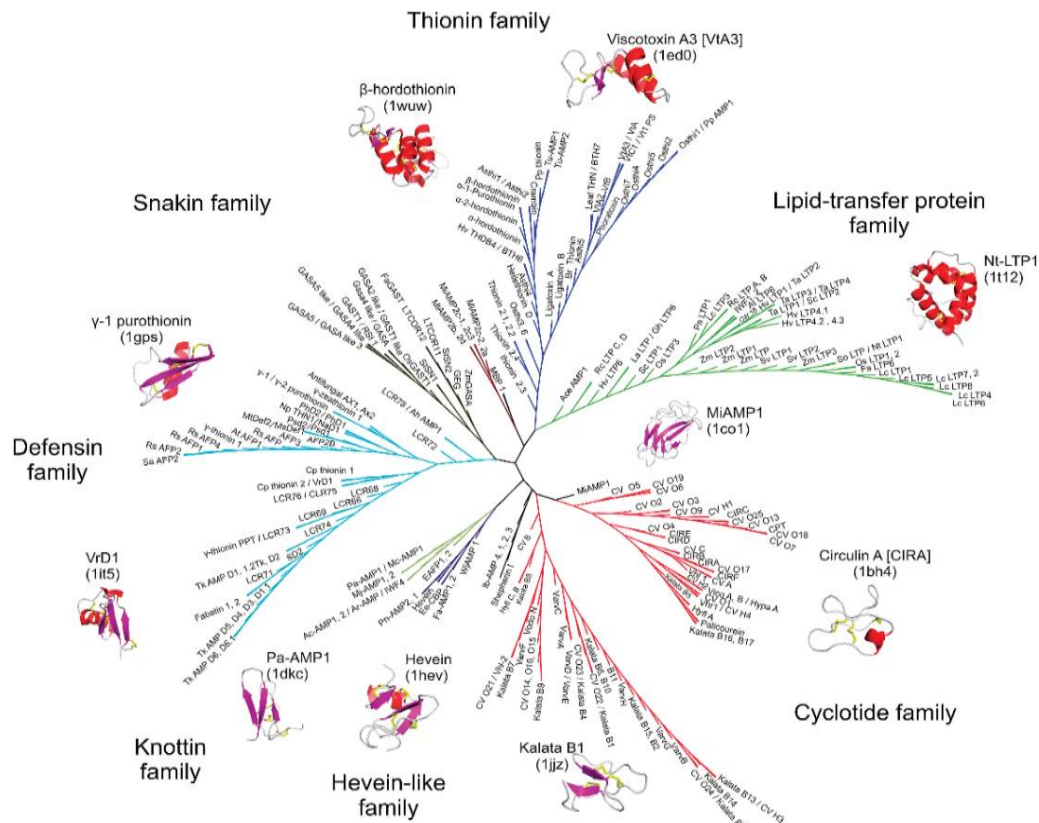


Figura 1. Árbol filogenético (sin raíz) de algunos PAM's de origen vegetal compilados en la base de datos PhytAMP. Tomado de (Hammami et al., 2009).

Los PAMs muestran actividad antimicrobiana como su principal función, y la actividad está en función de la secuencia de aminoácidos que los constituyen, su estructura, tamaño, carga neta, hidrofobicidad, afinidad, entre otros (Li et al., 2021). No obstante (Tam et al., 2015), sostiene que los PAMs muestran también una promiscuidad peptídica, lo que significa que un solo péptido puede ejercer múltiples funciones biológicas como: actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, inhibidora de quitinasa y proteinasa, entre otras. Estas actividades biológicas, son dependientes en gran medida, al tipo de familia al que pertenezca cada PAM. Además, (Noonan et al., 2017) menciona que: a pesar de las estructuras altamente conservadas presentes en estas moléculas, los genes que codifican estos PAMs de origen vegetal, tienden a presentar un gran número de polimorfismos, lo que aumenta la diversidad de los PAMs en las plantas, y su expresión puede estar regulada espacio-temporal (Campos et al., 2018).

Siguiendo con este orden de ideas, existe un grupo de PAMs que desempeñan un papel esencial en la simbiosis planta-rizobio. Estos PAMs pertenecen a la familia de péptidos ricos en cisteína (NCR) y son específicos en nódulos indeterminados. Se consideran importantes efectores biológicos en el desarrollo y la diferenciación terminal bacteriana durante la relación simbiótica entre *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti*. Estos NCR, poseen una actividad antimicrobiana pero no afectan a los endosimbiontes (Coss-Navarrete et al., 2020). Este autor, propone de manera hipotética que algunas de las leguminosas han reclutado diversos PAMs ricos en cisteína del sistema inmunológico innato y estos han evolucionado a la familia de los péptidos NCR para manipular a sus endosimbiontes.

2.2. Características generales de las defensinas

Las defensinas son un grupo extenso de PAMs. Estos PAMs son pequeños péptidos de 45-54 residuos de longitud con residuos ricos en cisteína. Se encuentran ampliamente distribuidos en animales, plantas e insectos, como parte de su sistema inmune innato (Cools et al., 2017; Ishaq et al., 2019; Kovaleva et al., 2020). Poseen un bajo peso molecular (~5 kDa) (Santos Aguilar, 2021). Generalmente son péptidos catiónicos de carácter básico, con puntos isoeléctricos (pI) de valores básicos (Sathoff & Samac, 2019).

Son termoestables en rangos de temperaturas de entre 80-100 °C y muestran una amplia estabilidad frente a diversas variaciones de pH (Mani-López et al., 2021). En un inicio la designación de tioninas se empleaba para referirse indistintamente a dos grupos de PAM's conocidos como α/β -tioninas y γ -tioninas (Ozyigit et al., 2019). No obstante, por medio de caracterizaciones estructurales posteriores más detalladas se demostró que las α y las β -tioninas son más similares entre sí, y que las γ -tioninas forman un grupo separado. Estas γ -tioninas presentan una mayor similitud estructural con la familia de las defensinas y son ahora reclasificadas en la familia de las defensinas vegetales (Mojsoska & Jenssen, 2015; Ozyigit et al., 2019; Rogozhin et al., 2018; Sathoff & Samac, 2019).

2.3 Características generales de las defensinas vegetales

Las defensinas vegetales (γ -tioninas) son péptidos catiónicos ubicuos en el reino vegetal, ampliamente distribuidos (De O Mello et al., 2014). Como su nombre lo indica, este grupo de PAM's son producidos por las plantas como parte de su inmunidad y reciben este nombre debido a que sus propiedades estructurales y funcionales se asemejan en gran medida a las de las defensinas presentes en otras categorías taxonómicas de vertebrados e invertebrados (Do Amaral et al., 2020; Kovaleva et al., 2020).

Las defensinas presentan una notable variación en su secuencia de aminoácidos, a excepción de una firma conservada de residuos de cisteína (C) y otros aminoácidos específicos. Las defensinas presentan una estructura característica conformada por una α hélice, y por tres láminas β antiparalelas (Figura 2) (Kovaleva et al., 2020; Mulla et al., 2021; Skalska et al., 2020).

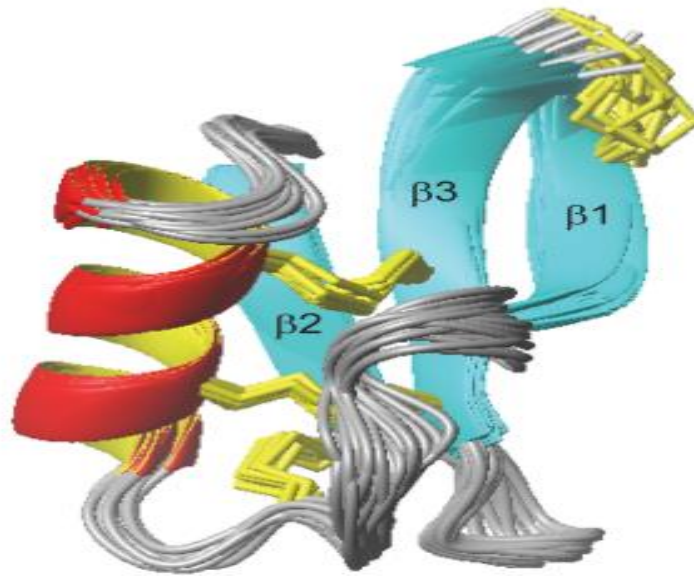


Figura 2. Representación esquemática de la estructura tridimensional típica de una defensina de *Phaseolus vulgaris* (PvD1). Se aprecia la estructura α -hélice en rojo y amarillo; las láminas β plegadas antiparalelas numeradas del 1 al 3 se muestran en cian; y los enlaces disulfuro son resaltados en amarillo. Con anotación estructural por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Tomado y adaptado de (Skalska et al., 2020).

2.4. Clasificación de las defensinas

Las defensinas se clasifican en función del tipo y número de residuos de cisteína presentes en sus secuencias de aminoácidos, la similitud y/o diferencias existentes entre las estructuras secundarias y terciarias que forman estas secuencias de aminoácidos, así como la secuencia que codifica para sus genes precursores de entre otros criterios (Parisi et al., 2019; Shafee et al., 2017).

La familia de las defensinas la conforman dos superfamilias de PAM's con una estrecha relación estructural y funcional. Estas superfamilias, son denominadas como cis-defensinas y trans-defensinas. La distinción entre cis y trans-defensinas, recae en la estructura terciaria que exhiben. Específicamente depende de la orientación que presentan sus enlaces disulfuro mediante la interacción entre sus estructuras secundarias. De modo que, la disposición espacial que estas presentan está directamente relacionada con el origen de las mismas y su clasificación (Figura 3) (Shafee et al., 2017).

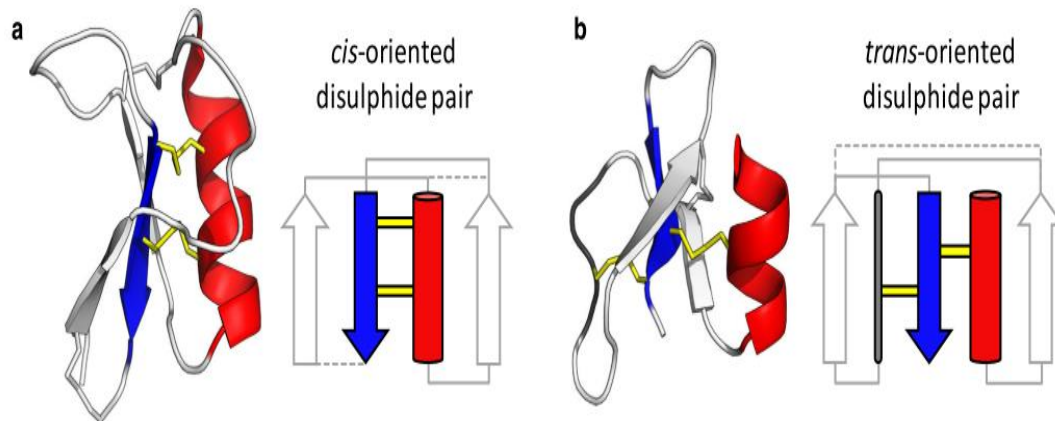


Figura 3. Arquitectura de las cis/trans defensinas. (a) La defensina vegetal NaD1 es una cis-defensina típica de plantas en la que los dos enlaces disulfuro (amarillo) unidos a la última lámina β (azul) apuntan, en la misma dirección y se unen a la α hélice (roja). (b) La β -defensina humana HBD-1 es una trans-defensina típica, en la que los dos enlaces disulfuro (amarillo) en la lámina β , apuntan en direcciones opuestas. Por lo tanto, se unen a diferentes elementos de su estructura secundaria. Tomado de (Shafee et al., 2017).

2.4.1 Trans-defensinas

Las trans-defensinas son la superfamilia más pequeña de estos dos grupos. Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por exhibir dos enlaces disulfuro orientados en direcciones opuestas que unen la tercera lámina β en el extremo C-terminal, a un elemento distinto en de la estructura secundaria (Figura 4), (Shafee et al., 2017). Esta superfamilia está representada esencialmente por las defensinas de los vertebrados y por las defensinas de unos pocos invertebrados y se clasifican como alpha, beta y theta defensinas (Cools et al., 2017; Shafee et al., 2017). La actividad antimicrobiana es la más caracterizada de las trans-defensinas de vertebrados (Parisi et al., 2019).

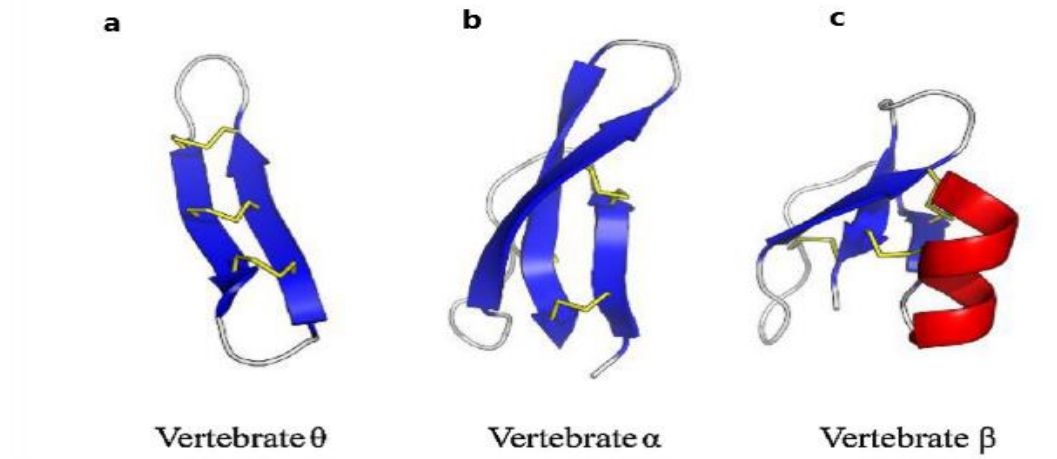


Figura 4. Representación esquemática de la estructura terciaria de miembros de la superfamilia de las trans-defensinas en vertebrados: (a) θ -Defensina BTD-2 aislada del primate *Papio anubis* (b) α -Defensina HD5 aislada de *Homo sapiens* (c) β -Defensina HBD1, aislada también de *Homo sapiens*. Las α hélices están representadas en rojo, las láminas β en azul, y los enlaces disulfuro en amarillo. Tomado y adaptado de (Parisi et al., 2019).

2.4.2 Cis-defensinas

Las cis-defensinas son la segunda superfamilia que constituyen a las defensinas. Los miembros de esta superfamilia se caracterizan porque los dos de los enlaces disulfuro que presentan, se encuentran paralelos entre sí, y conectan la lámina β antiparalela del extremo C-terminal con la estructura de la α hélice (Figura 5) (Kovaleva et al., 2020).

La estructura primaria en las cis-defensinas presenta una baja homología. Sin embargo, como ya se ha mencionado estas estructuras presentan residuos de aminoácidos altamente conservados que se pliegan en un motivo $\alpha\beta$ estabilizado con cisteína ($CS\alpha\beta$) (Parisi et al., 2019). Esta superfamilia es la más grande, constituye además de las defensinas de plantas a las defensinas de hongos y la mayoría de invertebrados (Cools et al., 2017).

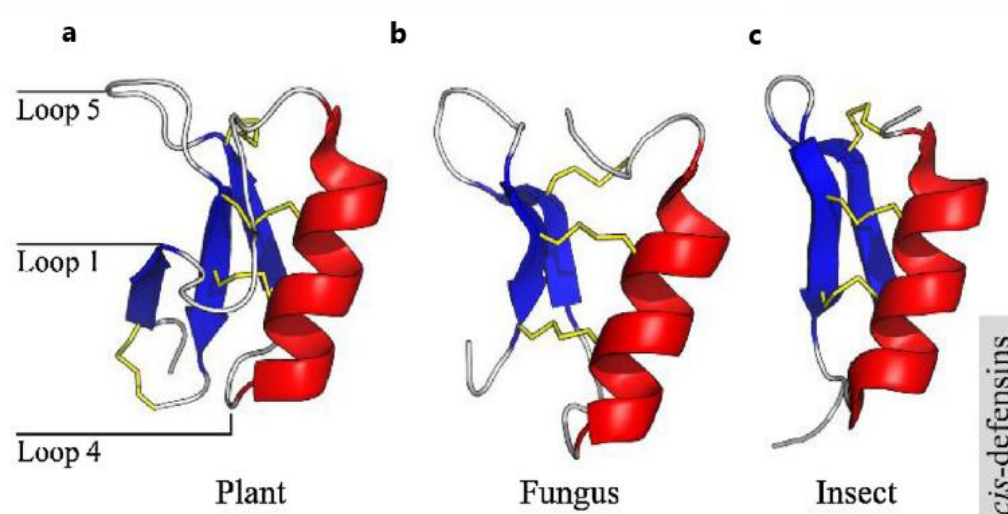


Figura 5. Representación esquemática de la estructura terciaria de miembros de la superfamilia de las cis-defensinas. (a) defensina vegetal de NaD1 de *Nicotiana glauca*. (b) Micasina, defensina fúngica de *Microsporium canis*. (c) defensina de insectos nasonina de *Nasonia vitripennis*. Las α hélices están representadas en rojo, las láminas β en azul, y los enlaces disulfuro en amarillo. Tomado y adaptado de (Parisi et al., 2019).

2.5 Clasificación de las defensinas vegetales (Cis-defensinas)

Las defensinas vegetales son a su vez subclasificadas, de acuerdo con la estructura que presentan sus secuencias precursoras. Estas secuencias codificantes pueden ser divididas estructuralmente en: una región que codifica para un péptido maduro, y una segunda región que codifica para un péptido señal el cual está situado en alguno de los extremos terminales que forman el polipéptido. Con base en esto, las defensinas vegetales pueden dividirse en dos clases de defensinas Cis-defensinas clase I y II (Cools et al., 2017; Kovaleva et al., 2020).

2.5.1 Cis-defensinas clase I

Las Cis-defensinas clase I son la clase más grande y está conformada por las defensinas que presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, junto al dominio de la defensina. Las defensinas tienen que sufrir un proceso de maduración el cual consiste en remover el péptido señal que tiene como función dirigir a la defensina al retículo endoplásmico, y

luego a la vía secretora (Kovaleva et al., 2020), y además es responsable de mantener sin actividad biológica a la defensina (Odintsova et al., 2020). Las defensinas de clase I proporcionan, la primera línea de defensa contra los patógenos vegetales invasores que atacan en el espacio extracelular.

Las defensinas de la clase II se encuentran presentes con mayor frecuencia en órganos y tejidos en las semillas, mientras que las defensinas de la clase I de las plantas se expresan abundantemente en las partes reproductivas y vegetativas de la planta (Sher Khan et al., 2019). Estructuralmente, las proteínas maduras de las defensinas de clase I y clase II tienen un pliegue tridimensional similar al de sus monómeros (Kovaleva et al., 2020).

2.5.2 Cis-defensinas clase II

La clase II de las defensinas, es la clase más pequeña conformada por aquellas defensinas que poseen un propéptido adicional en el extremo C-terminal, el cual se elimina por acción proteolítica durante la maduración del polipéptido (Stotz et al., 2009). Su función aún no es bastante clara, pero su carga negativa neutraliza la carga del dominio activo de la defensina, lo que sugiere que este péptido bloquea la actividad tóxica durante el transporte celular, previniendo los efectos fitotóxicos de las defensinas contra otras células huésped. Además, se menciona que este péptido también contribuye en la señalización del péptido maduro hacia la vacuola (Sher Khan et al., 2019). Sin embargo, la disposición de este péptido es opcional, ya puede o no estar presente en determinadas defensinas vegetales (Odintsova et al., 2020).

2.6 Características estructurales de las defensinas vegetales

2.6.1 Estructura primaria

La estructura primaria de las cis-defensinas la conforman las secuencias de sus aminoácidos, estas secuencias presentan una baja homología entre sus residuos, la cual oscila entre un 35-90% de similitud (Kovaleva et al., 2020). No obstante, la mayoría de las defensinas vegetales, exhiben una firma de ocho residuos de cisteína (C) altamente

conservados, donde los únicos residuos distintos a la cisteína también conservados, son dos residuos de glicina (G) y uno de glutamato (E) (Do Amaral et al., 2020).

De acuerdo con (Kovaleva et al., 2020), el número de residuos de aminoácidos presente entre las cisteínas C1-C3 y C4-C6, varía de entre tres a poco más de diez residuos, mientras que el número de residuos de aminoácidos entre las demás cisteínas se presenta sin variaciones. Los enlaces disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína muestran el siguiente patrón de unión: C1-C8, C2-C5, C3-C6 y C4-C7 (Figura 6). Se ha documentado que las variaciones entre la unión de estos aminoácidos, son por tanto, responsables de la generación de variantes estructurales que pudiesen tener influencia en la función biológica de las defensinas (Liu et al., 2021; Mulla et al., 2021).

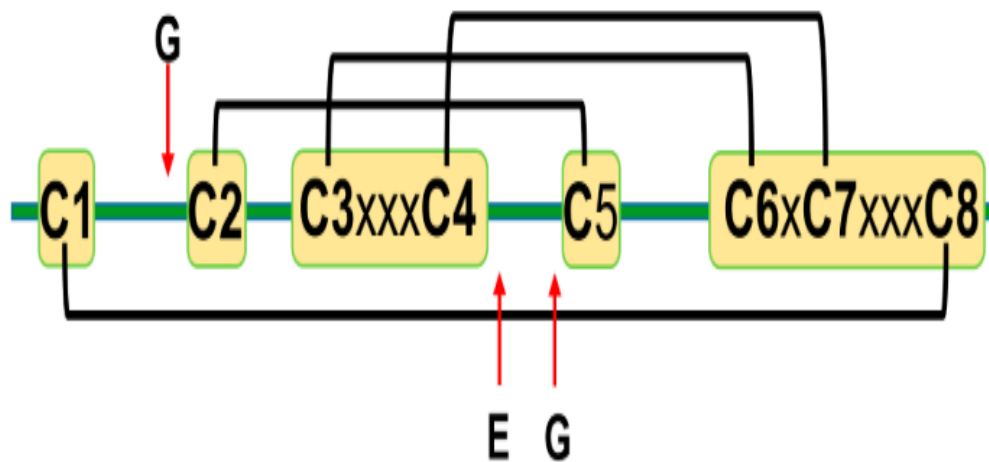


Figura 6. Representación esquemática de la interacción entre los residuos de cisteínas en la estructura primaria de las defensinas vegetales. Las letras “C” mayúscula denotan los residuos de cisteínas conservados. La letra “x” entre las letras C mayúsculas denota el número de aminoácidos inespecíficos no conservados. Las letras y las flechas rojas que las acompañan, indican los residuos también conservados, distintos a las cisteínas y sus ubicaciones aproximadas dentro de las secuencias de aminoácidos. Los corchetes negros representan los enlaces disulfuro que se forman. Tomado de (Kovaleva et al., 2020).

2.6.2 Estructura secundaria

Los elementos que constituyen la estructura primaria forman plegamientos que dan lugar a estructuras secundarias bien caracterizadas, estas estructuras conforman una α hélice y tres láminas β antiparalelas (Mulla et al., 2021). En estas estructuras, un enlace disulfuro presente en los residuos C1-C8 conecta el extremo N-terminal con el extremo C-terminal. El enlace disulfuro C2-C5 forma un bucle con la cadena beta $\beta 2$. Los enlaces disulfuro presentes en C3-C6 y C4-C7 unen la estructura de la α hélice a la cadena beta $\beta 3$. Debido a la inserción de exactamente un aminoácido entre las cisteínas C6 y C7 ubicadas en la cadena beta $\beta 3$ (Figura 7), los dos enlaces disulfuro C3-C6 y C4-C7 se orientan en la misma dirección hacia la α hélice. Esta disposición paralela en la misma dirección de enlaces disulfuro C3-C6 y C4-C7 es lo que le da la característica estructural distintiva para clasificarlas como cis-defensinas, esto según lo describe (Kovaleva et al., 2020).

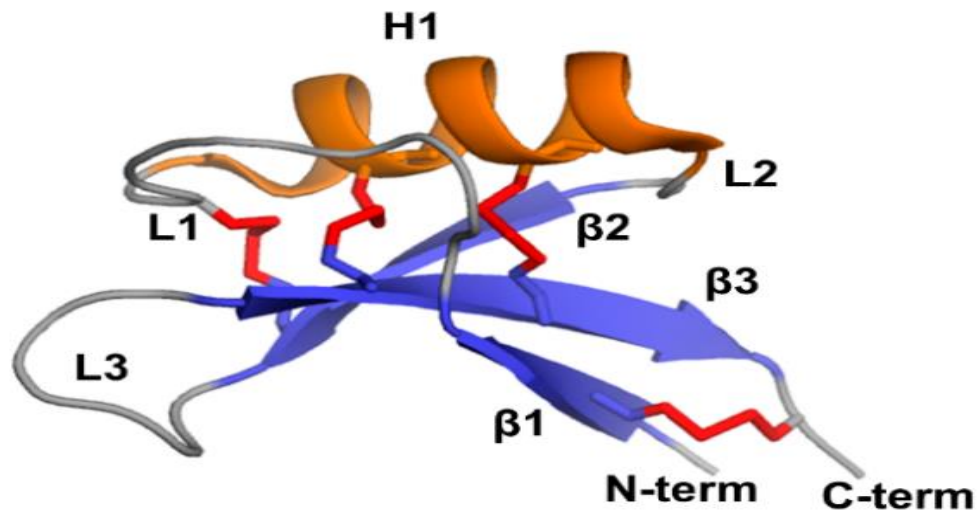


Figura 7. Representación esquemática de la estructura secundaria de las defensinas vegetales. Se compone de una α hélice (naranja) y tres láminas β antiparalelas (azul). Las letras indican las interacciones entre estas estructuras que dan lugar a la estructura terciaria. Se forman los bucles L1 entre la α hélice y la lámina $\beta 1$; L2 entre la α hélice y la lámina $\beta 2$; y bucle L3 (γ -core) entre las láminas $\beta 2$ - $\beta 3$. Los enlaces disulfuro se muestran en rojo. Tomado de (Kovaleva et al., 2020).

2.6.3 Estructura terciaria

A pesar de la variabilidad significativa que presentan las secuencias de los aminoácidos, las estructuras tridimensionales de las defensinas vegetales, por el contrario, presentan una estrecha similitud. La principal característica en la estructura terciaria de las defensinas es un motivo altamente conservado denominado ($CS\alpha\beta$). Este dominio está conformado por las estructuras tanto de la α hélice, como de las láminas β antiparalelas, y estabilizadas con los residuos de cisteína (volver a figura 2), (Liu et al., 2021; Sher Khan et al., 2019).

Además del motivo $CS\alpha\beta$, dos motivos adicionales también conservados son característicos, y se encuentran presentes en la estructura terciaria de las defensinas vegetales. Estos son el α -core, que forma un bucle que conecta la lámina $\beta 1$ con la α -hélice, y el γ -core que forma también un bucle que une las láminas $\beta 2$ y $\beta 3$ antiparalelas, sobre el cual se sabe recae su principal actividad biológica (Santos-Silva et al., 2021).

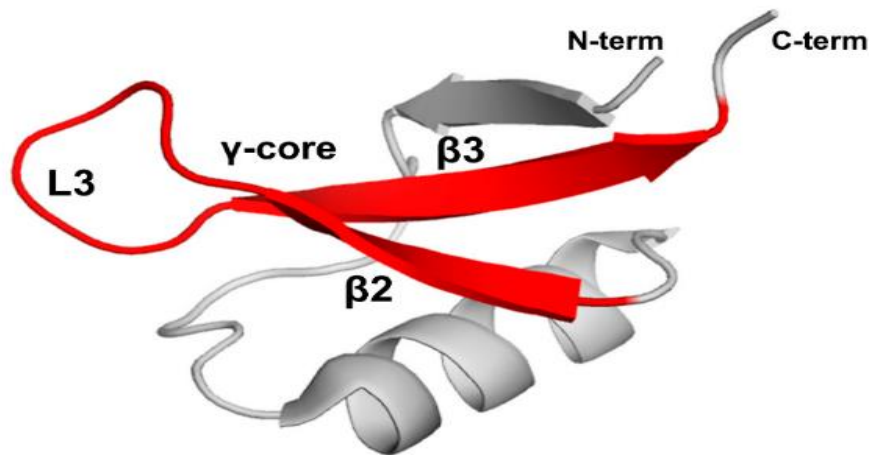


Figura 8. Representación estructural del motivo γ -core. Se compone de dos láminas β antiparalelas ($\beta 2$ y $\beta 3$), y el bucle denominado (L3) que las conecta entre sí, (color rojo) como se aprecia en la imagen. Tomado de (Kovaleva et al., 2020).

Ya se indicó que es en este motivo γ -core, (Figura 8) en donde recae la actividad antimicrobiana y antifúngica característica de las defensinas vegetales (Sathoff et al., 2020; Skalska et al., 2020). Aunque este motivo también está presente en otros PAM's como, como las heveínas, los ciclótidos, las denominadas knotinas, e incluso en las trans-defensinas (Costa et al., 2020).

2.7 Biosíntesis y distribución de las defensinas vegetales

La familia de las defensinas vegetales se encuentra ampliamente distribuidos en el reino vegetal, fungi y moderadamente en el reino animal, en este último de manera específica en el filo de los artrópodos (Gerdol et al., 2020). Las defensinas vegetales son aisladas de una amplia variedad de plantas que conforman a las diversas familias botánicas, y a partir de diferentes órganos y tejidos de las plantas, como: semillas, hojas, flores, raíces y tallos. Estas defensinas se expresan de manera constitutiva en la pared celular y en el espacio extracelular de las semillas, en el xilema, los estomas en las hojas, y otras regiones periféricas (Ishaq et al., 2019; Kovaleva et al., 2020).

Esto posiblemente a que las regiones en los tejidos previamente descritos, frecuentemente representan un punto de entrada clave para los patógenos, dentro de los organismos que han de ser afectados (Sher Khan et al., 2019). De modo que, algunas de estas defensinas vegetales son inducidas por el ataque de organismos patógenos o diversos estímulos ambientales, mientras que otras defensinas vegetales se expresan constitutivamente en tejidos u órganos específicos de las plantas (Odintsova et al., 2020).

2.8 Actividad biológica de las defensinas vegetales

Las defensinas vegetales son consideradas como parte integral del sistema inmunológico innato de las plantas (Liu et al., 2021; Pandey et al., 2020; Stotz et al., 2009). Su efecto antimicrobiano es la actividad preponderante en las defensinas vegetales, ya que actúan en la defensa contra organismos patógenos como: bacterias, hongos, virus, parásitos, insectos, entre otros. Y esta actividad en los ensayos in vitro, se muestra a concentraciones del orden micromolar (μM) (Finkina & Ovchinnikova, 2018; Sher Khan et al., 2019).

Además del papel que desempeñan las defensinas vegetales como parte del sistema inmune de las plantas, reportes sobre ensayos in vitro de algunas defensinas vegetales como Atr-DEF2 de *Amaranthus tricolor*, indican que estas actúan frente a diversos microorganismos como: *Escherichia coli* enteropatógena, *Klebsiella pneumoniae* que resultan patógenos para el ser humano. Además, estudios preliminares de determinadas defensinas con efecto sobre *Candida spp.*, (Moyer et al., 2021; Sher Khan et al., 2019).

También algunas defensinas como la: PsD1 de *Pisum sativum* NaD1 de *Nicotiana glauca* y Rs-AFP2 de *Raphanus sativus* exhiben una importante participación en las vías de señalización celular, ya que pueden acelerar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y por lo tanto, inducir la apoptosis, o muerte celular programada (Lacerda et al., 2014). De igual manera se presentan informes, sobre defensinas vegetales provenientes de *Phaseolus limensis* que inhiben la proliferación de células tumorales, al igual que hay defensinas vegetales de *Gymnocladus chinensis* y *Adzuckia angularia* que exhiben actividad mitogénica (Carvalho & Gomes, 2012; Do Amaral et al., 2020).

Haciendo referencia a lo anterior también se ha reportado en ensayos in vitro que diversas defensinas vegetales aisladas de *Ipomoea batatas* (SPD1), y *Vigna unguiculata* (VUDE), reprimen la biosíntesis de determinadas proteínas, e inclusive se ha documentado que algunas defensinas como γ -hordothionin provenientes de *Hordeum vulgare*, y la SI α 1 proveniente de *Sorghum bicolor* disminuyen la actividad de algunas enzimas proteolíticas, como la α -amilasa y la tripsina (Carvalho & Gomes, 2012; Moyer et al., 2021).

Una función no asociada a la actividad antimicrobiana, en donde se ha reportado que las defensinas vegetales afectan el funcionamiento de canales iónicos, esto al alterar el flujo de Ca²⁺ y K⁺, a través de proteínas transmembranales que constituyen estos canales iónicos (Ishaq et al., 2019; Pothana et al., 2019; Zhu, 2008). Otra función no asociada con la propiedad antimicrobiana, existe evidencia sobre algunas defensinas vegetales en las plantas en las que son expresadas de forma constitutiva, incrementan la tolerancia al efecto de determinados metales. Por ejemplo; las defensinas AhPDF1.1 y AhPDF1.2 de *Arabidopsis halleri* están involucradas en la respuesta adaptativa a la sobrecarga de zinc (Cools et al., 2017).

Por otro lado, las defensinas vegetales se han empleado en la última década como herramientas biotecnológicas mediante el desarrollo de organismos genéticamente modificados (OGM) que le pudieran conferir resistencia a los cultivos frente al ataque de organismos fitopatógenos, permitiendo así una mejora en la producción de estos cultivos (Lacerda et al., 2014). Así mismo se ha documentado que la producción de las defensinas obstaculiza el desarrollo de plantas parásitas (Finkina & Ovchinnikova, 2018).

Por último, las actividades biológicas reportadas específicamente para las defensinas de *Phaseolus vulgaris*, indican que estas exhiben de manera significativa actividad antifúngica, y actividad mitogénica. De igual forma evidencian una actividad inhibidora a la síntesis de proteínas durante la traducción; muestran de igual manera actividad inhibitoria frente la transcriptasa inversa del VIH-1 (Carvalho & Gomes, 2012; Finkina & Ovchinnikova, 2018).

Las generalizaciones anteriores, describen a las defensinas como uno de los péptidos antimicrobianos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, y con una diversidad bastante extensa en cuanto a sus funciones biológicas. No obstante, es importante recalcar que los representantes de las distintas clases de defensinas vegetales no poseen todas las propiedades descritas anteriormente de manera individual, por el contrario, cada defensina exhibe solo una o algunas de estas propiedades, y estas son específicas para cada objetivo (Finkina & Ovchinnikova, 2018).

III. METODOLOGÍA

3.1. 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.

3.2. Búsqueda de las secuencias putativas de las defensinas en *Phaseolus vulgaris*

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 defensinas. Se realizaron dos tipos de búsqueda, en la primera, se desplegó la búsqueda por el nombre del organismo en cuestión “*Phaseolus vulgaris*” usando como palabra clave “defensins”, y en la segunda con los números de acceso que despliegan ambos servidores, a partir de las secuencias obtenidas se realizó un BLAST empleando el servidor BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Protein) del NCBI.

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

Se efectuó un análisis de los transcriptomas de *Phaseolus vulgaris* depositados en el atlas de expresión génica basado en RNA-Seq en (<https://www.zhaolab.org/PvGEA/>). En este recurso bioinformático se encuentra la información de los patrones de expresión génica de las defensinas, en muestras recogidas de diversos tejidos de *Phaseolus vulgaris* cv. negro Jamapa; en diversos momentos de importancia para el desarrollo de la planta con los números de acceso SRR1569486 y SRR1569488. De manera general, pese a que se muestran los niveles de expresión de varias partes de la planta. Se consideraron solo aquellos tejidos involucrados en el proceso de la nodulación (raíz), dado que es en este tejido en el que ocurre este fenómeno.

3.4. Amplificación por PCR de una defensina a partir de cDNA de *Phaseolus vulgaris*

3.4.1. Diseño de oligonucleótidos específicos

Los datos de las secuencias putativas de las defensinas que fueron obtenidas de manera previa, se tomaron como referencia para el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de la secuencia de interés. Primero se identificó la secuencia nucleotídica de nuestra secuencia de interés (Phvul.282400). Posteriormente, se diseñaron los oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia Phvul.282400 mediante el software SnapGene (4.0.7) y se consideró amplificar parte de la región codificante de la secuencia y región 3' UTR, obteniendo un fragmento con una longitud total de 431 pb.

3.4.2. Amplificación por PCR de la secuencia Phvul.282400

La amplificación por PCR de la secuencia (Phvul.282400) a partir de 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. En el segundo paso, para la etapa de denaturación (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), repitiendo este proceso durante 30 ciclos. Finalmente, en el tercer paso se fijó una temperatura de 18 °C durante 5 minutos. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR fueron: FwOE282400 y RiRNA282400, las secuencias forward y reverse de estos oligos y sus características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR del gen que codifica la secuencia de interés (Phvul.282400).

Oligonucleótido	Nombre	Secuencia	Tm	GC
Forward	FwOE282400	CACCATGGCTCGCTCTGTGTC	62 °C	62%
Reverse	RiRNA282400	GGTCACTCTAAGTCATTACATTAGAC	55° C	38%

La PCR se realizó en un volumen final de reacción de 20 microlitros (μl). Los componentes de la mezcla de reacción se muestran en la tabla 2.

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

Componentes	Concentraciones (μM)	Volumen (μl)
cDNA	10	1
Oligo Fw (FwOE282400)	10	1
Oligo Rv (RiRNA282400)	50	1
Master Mix (2X)	-	10
H ₂ O	-	7
Volumen Final	-	20

3.4.3. Corrimiento electroforético y purificación del producto de PCR

El producto de PCR fue analizado empleando un gel de agarosa al 2%, 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 se 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 Phvul.282400. Se mezcló hasta la disolución del gel y hasta comprobar que la solución tornara a un color ligeramente amarillo (esto indica el pH óptimo para la unión del ADN). Posteriormente, se transfirieron los 800 μl de esta solución 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. Acto seguido, 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. Se Añadieron 50 µl de “Elution Buffer”, sobre la membrana de la columna de purificación y se centrifugó por 1 min. Finalmente, el ADN purificado fue almacenado a una temperatura de -20 ° C.

3.4.4. Construcción del vector de expresión B-ptdTPhvul.282400

El diseño del sistema de expresión se realizó sobre el vector B-ptdTPhvul.282400 (14 801 pb), empleando el software SnapGene (4.0.7). Se identificó la presencia de los sitios de corte de la enzima de restricción XbaI para poder escindir un fragmento de 3807 pb. Esto permite tener un esqueleto del vector que cuenta con el sistema de expresión con el siguiente orden. Promotor-Inserto-terminador (CaMV 35S-(Phvul.282400)-NOS). El Mapa de la construcción final se aprecia en la figura 9.

3.4.5. Digestión y purificación del vector B-ptdTPhvul.282400

La digestión del vector B-ptdTPhvul.282400, se llevó a cabo mediante el uso de la enzima de restricción (FastDigest XbaI, de Thermo Scientific™), la cual exhibe los sitios de corte 5' T↓ CTAGA 3' y 3' AGATC↑ T 5', este procedimiento se efectuó de acuerdo al protocolo del fabricante. La mezcla de digestión fue realizada en un tubo de PCR de 0.2 ml los componentes de reacción fueron añadidos a temperatura ambiente en el orden (tabla 3) siguiente:

Tabla 3. Componentes de la mezcla del coctel de digestión para el vector B-ptdTPhvul.282400 con FastDigest XbaI

Componentes	Volumen (µl)
H ₂ O (libre de nucleasas)	15
FastDigest Buffer 10X	2
Vector B-ptdTPhvul.282400 2 µl (1 por/µg)	2
FastDigest XbaI	1
Volumen Final	20

El coctel de digestión se mezcló moderadamente, y se centrifugó por 30 s. Posterior, se incubó a 37 ° C durante 5 min, la inactivación de la enzima se llevó a cabo elevando la temperatura a 65 °C durante 20 min. Posteriormente se purificó el vector de acuerdo al protocolo tal y como se explicó previamente en el punto 3.4.3.

3.4.6. Rellenado y ligación del vector B-Phvul.282400

Debido a las características de la secuencia del vector al ser este digerido con la enzima XbaI genera extremos cohesivos. Estos extremos fueron luego rellenos mediante el uso de *Taq Polimerasa* como se explica a continuación: En un tubo de PCR fueron depuestos el producto de la digestión del vector B-ptdTPhvul.282400 y determinado volumen de solución de la Master Mix que contiene la *Taq* polimerasa; en una relación de 1:1, siendo (15 µl B-ptdTPhvul.282400 + 15 µl Master Mix). La reacción se llevó a cabo, empleando el termociclador (Maxigene II de Axygen™) para la generación de los extremos romos mediante elongación ajustando a una temperatura constante de 72 °C durante 25 minutos.

La reacción de ligación se realizó de acuerdo al protocolo para la T4 ligasa de Thermofisher (Thermo Scientific™), el cual consistió en la preparación de los componentes que se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la mezcla del coctel de ligación del vector. Ligación dependiente de T4 ligasa para el vector B-ptdTPhvul.282400 + el inserto de interés.

Vector DNA lineal	20-100 ng
Inserto DNA	Relación molar 1:1 a 5:1
Buffer DNA T4 Ligasa	2µl
Solución (PEG 4000) al 50 %	2µl
DNA T4 Ligasa	5U
H ₂ O (libre de nucleasas)	Para 20µl
Volumen Final	20µl

Esta reacción de ligación se llevó a cabo en una incubadora a una temperatura de 22 °C, durante 1 hora.

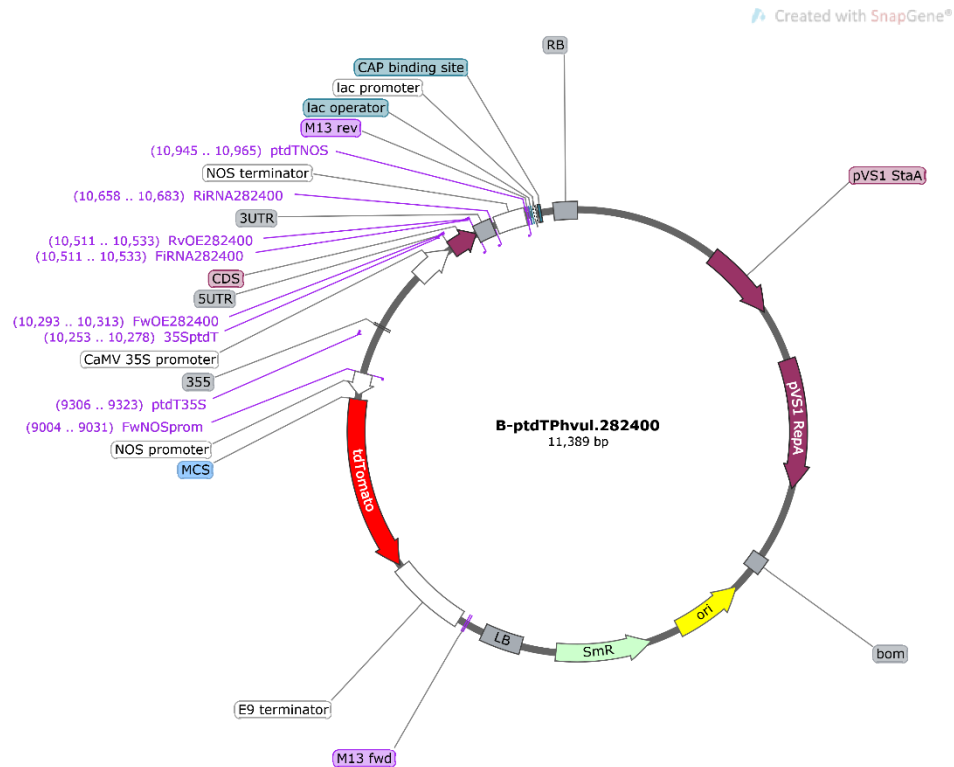


Figura 9. Mapa del plásmido B-ptdTPHvul.282400. Este vector tiene un tamaño de 11,389 pares de bases. Está conformado por la proteína roja fluorescente (tdTomato), el sitio de multiclonación (MCS), el gen de resistencia a la estreptomicina y espectinomicina (SmR) y el origen de replicación (ORI), todos estos bajo el efecto del promotor y terminador NOS. El producto amplificado (CDS), junto con el promotor 35S del CaMV y el terminador NOS constituyen el cassette de expresión completo.

3.4.7. Transformación en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP10.

La transformación en células quimiocompetentes TOP10 *E. coli* se realizó de acuerdo al protocolo descrito a continuación. Se centrifugó el tubo con el contenido de la reacción de la ligación previa. Posteriormente, fueron añadidos 5 µl del contenido de la reacción de ligación en el tubo con las células quimiocompetentes. Estos tubos fueron puestos en hielo durante 30 min.

Posteriormente los tubos fueron puestos durante 45 segundos en baño maría a 42 °C (sin agitar) y de inmediato fueron colocados en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 250 µl de medio LB a cada tubo. Fueron asegurados con cinta adhesiva en una incubadora con agitación a 225 rpm a 37 ° C durante 1 hora. Finalmente, el contenido del tubo de transformación se extendió sobre placas petri con medio LB con la ayuda de perlas de vidrio estériles y se incubó a 37° C. Transcurridas 24 horas las colonias resultantes fueron transferidas a una nueva placa de medio LB.

3.4.8. PCR en colonia

Para comprobar si las colonias transformadas presentaban el inserto, se efectuó una PCR en colonia. Se analizaron cinco muestras en total, cuatro de estas muestras directas de la placa, y una muestra como control negativo proveniente de un experimento simultaneo. Las condiciones en la mezcla para la reacción se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la mezcla para la reacción de PCR del vector que contiene el inserto con la secuencia de interés

Componentes	Volumen (µl)
Fw (CaMV35S B-ptdTPhvul.282400)	5
Rv (RiRNA282400)	5
DNA molde (clona)	-
Master Mix (2X)	62.5
H ₂ O	42.5
Volumen Final	115

En esta reacción de PCR se consideraron los oligonucleótidos específicos del promotor constitutivo del CaMV 35S Fw (35S B-ptdT) así como el oligonucleótido reverso específico de nuestra secuencia de interés (Phvul.282400) Rv (RiRNA) (Tabla 6). De esta manera se comprobó además de la presencia, la orientación del inserto en el sentido correcto.

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos diseñados para la PCR en colonia

Oligonucleótido	Nombre	Secuencia	Tm	GC
Forward	CaMV 35S B-ptdT	GGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAAC	56 °C	38%
Reverse	RiRNA282400	GTAGATACAATGATCTAGCCCGGGTAGG	55 °C	38%

3.4.9. Extracción del plásmido y Electroforesis

El plásmido se purificó a partir de las de las colonias de *E. coli* confirmadas por PCR mediante el kit de extracción de plásmidos (Favorprep de FavorGreen™) de acuerdo al protocolo. Se transfirieron 2 ml del cultivo a un tubo para centrifugarse a 11,000 rpm, por 60 s, y se desechó por completo el sobrenadante. Se agregaron 200 µl del Buffer FAPD1 (RNasa A) al sedimento del 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 11,000 rpm durante 30 s. Se añadieron 400 µl del Buffer WP a la columna FAPD y se centrifugó a 11,000 rpm por 30 s. Acto seguido, se añadieron 700 µl de Buffer de lavado a la columna FAPD, y se centrifugó a 11,000 rpm, por 30 s. Luego se centrifugó a 18,000 rpm, 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™).

3.5. 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 posterior secuenciación.

3.6. Secuenciación

La secuenciación de la muestra se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt-UNAM). 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.

3.7. Análisis bioinformático de la secuencia amplificada

3.7.1. Alineamiento múltiple de secuencias

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/>) las secuencias de diversos organismos de origen vegetal en los que se han reportado defensinas (Tabla 7). Posteriormente, se ejecutó el análisis de secuencias por alineamiento múltiple, utilizando el programa T-Coffee, mediante el software UGENE (40.0). Para la visualización del mismo se empleó el software Jalview (2.11.1.4).

Tabla 7. Defensinas de origen vegetal empleadas en el alineamiento múltiple de secuencias. Se indica su nomenclatura, origen y el número de acceso correspondiente para cada una de ellas

N°	Defensina	Organismo Fuente	N° de Acceso
1	Phvul.282400 (Own)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-
2	Pvd1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ADR30066
3	Pvd2	<i>Phaseolus vulgaris</i>	ADR30067
4	Psd1	<i>Pisum sativum</i>	1JKZ_A
5	RsAFP1	<i>Raphanus sativus</i>	1AYJ_A
6	VrD2	<i>Vigna radiata</i>	2GL1_A
7	Tad1	<i>Triticum aestivum</i>	BAC10287
8	ZmD32	<i>Zea mays</i>	6DMZ
9	Lc-def	<i>Lens culinaris</i>	2LJ7
10	TPP3	<i>Solanum lycopersicum</i>	4UJ0
11	γ1-Purothionin	<i>Triticum aestivum</i>	P20158
12	γ-Hordothionin	<i>Hordeum vulgare</i>	P20230.1
13	γ1-Zeathionin	<i>Zea mays</i>	P81008.1

3.7.2. Modelado estructural de la secuencia

Se utilizó el servidor RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) para la predicción basada en “learning machine” o aprendizaje máquina, e inteligencia artificial de la estructura terciaria de la secuencia, a partir de los resultados de la secuenciación de la amplificación de Phvul.282400. Asimismo, y a partir de estos resultados de la secuenciación, se realizó el modelado molecular por homología empleando el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), tomando como plantilla molde la estructura plegada de la defensina antifúngica (PvD1) PDB: 6VPN. El modelo inicial fue después validado y el modelo más óptimo tiene los siguientes valores de calidad de los estadísticos: GMQE, QMEANDisCo y QMEAN Z-scores. El resultado de ambas predicciones estructurales, fue visualizado mediante el software PyMol (4.6.0), mismo que permitió comparar por superposición ambas estructuras generadas, por los dos métodos señalados, a fin de destacar las características principales que presentan estas secuencias y sus estructuras.

3.8. Coexpresión del sistema de expresión binario B-ptdTPhvul.282400 en *Agrobacterium*.

Este vector, se derivó del plásmido B-ptdTPhvul.282400 que fue replicado previamente en *E. coli* para su posterior inserción a una cepa desarmada de *Agrobacterium* (K599). Este vector contiene el T-DNA en el que se incluye el cassette de expresión de la defensina, con la secuencia del gen reportero tdTomato, todos estos flanqueados por los bordes izquierdo y derecho. Además, contiene otro plásmido que es el que contiene los genes de la denominada “VirBox”, conformados por los "VirA" VirB, VirC y VirG encargados de la transferencia del cassette de expresión hacia las plantas que desean ser transformadas, lo que da como resultado el vector binario B-ptdTPhvul.282400. Con ambos elementos co-integrados dentro de *Agrobacterium*.

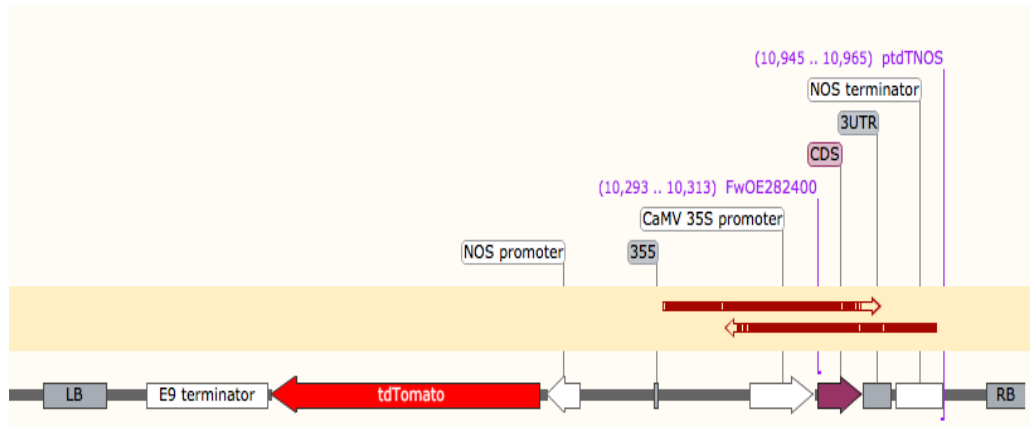


Figura 10. Mapa del T-DNA del vector binario B-ptdTPhul.282400. La secuencia Phvul.282400, junto con el promotor constitutivo 35S del CaMV, y el terminador NOS, constituyen el cassette de expresión completo, las flechas rojas arriba de la secuencia muestran la región secuenciada.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Búsqueda de las secuencias putativas de las defensinas en *Phaseolus vulgaris*

De la búsqueda en los servidores se obtuvieron diversas secuencias putativas de las defensinas de *Phaseolus vulgaris* con los números de acceso. Estas secuencias fueron comparadas simultáneamente en las bases de datos de péptidos antimicrobianos “The Antimicrobial Peptide Database” (APD3) (<http://aps.unmc.edu/>); “Database AMP” dbAMP (<http://csb.cse.yzu.edu.tw/dbAMP/>) “Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>).

De los resultados obtenidos del servidor BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool for Protein), del NCBI, mostró que la secuencia Phvul.282400 presenta un 100% de identidad con la proteína hipotética PHAVU_003G282400g de *Phaseolus vulgaris*, (XP_007156390.1) con un 100% de identidad 78/78, 100% positivos 78/78, y 0% de gaps 0/78. Del mismo modo, presenta un 83% de identidad con la segunda proteína hipotética PHAVU_003G282500g también de *Phaseolus vulgaris*, (XP_007156391.1) con un 83% de identidad 48/58, 86% positivos 50/58, y 0% de gaps 0/58. De lo que se puede confirmar que la secuencia, en efecto, proviene de *P. vulgaris*.

4.2. Análisis transcriptómico “in silico” de *Phaseolus vulgaris*

Con los resultados del análisis del transcriptoma, se realizó un mapa de calor con los valores normalizados por la mediana de las “lecturas por kilobase del transcrito por millón de lecturas mapeadas” (RPKM) para la secuencia de interés Phvul.282400. Esta mostró el nivel de expresión más alto para los tejidos de la raíz entre los nódulos de fijación previa (PvN5), y los fijados eficazmente (PvNE) a los 5 y 21 días post inoculación (dpi) respectivamente. Por otro lado, las puntas de las raíces (PvRT), las raíces enteras (PvYR), raíces enteras separadas de los nódulos (PvR5), raíces enteras fertilizadas con NO_3^- (PvRF), raíces enteras separadas de los nódulos fijos (PvRE), raíces enteras separadas de los nódulos fijos (PvRI) y por ultimo fijación ineficaz de los nódulos (PvNI), mostraron los niveles de expresión más bajos todos estos resultados en las mismas condiciones de

recolección que consideran tiempos de importancia para la evaluación de este fenómeno en la planta, siendo de 5 y 21 dpi.

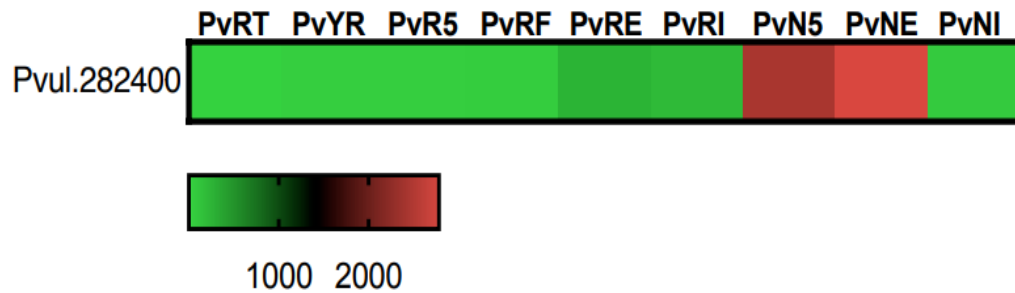


Figura 11. Mapa de calor muestra el perfil de los niveles de RPKM normalizados por la mediana de la secuencia Phvul.282400. Se aprecian cambios en los niveles de expresión observados entre los nódulos de fijación previa (PvN5) efectivos y los fijados eficazmente (PvNE) a los 5 y 21 (dpi) respectivamente.

En este sentido, (Hocher et al., 2011) presenta resultados similares a los expuestos en este trabajo. De un análisis en los perfiles expresión del transcriptoma de *Alnus glutinosa* en la relación de simbiosis con actinobacterias del género *Frankia* durante el proceso de nodulación, donde se muestra la expresión diferencial de péptidos del tipo defensina, de manera similar a como ocurre en los nódulos de las especies leguminosas. Posteriormente (Carro et al, 2016), basándose en estos resultados, demostró que en los nódulos de *Alnus glutinosa* se sobreexpresan diferencialmente defensinas como la (Ag5) de *A. glutinosa*. Esta está regulada de manera positiva, ya que muestra el perfil de expresión diferencial más alto a los 7 dpi, por lo que se identifica como uno de los genes más altamente expresados, esto es observable en nódulos con 3 semanas de desarrollo, además estos datos son confirmados de manera adicional por RT-qPCR, revelando un incremento en hasta 6,15 veces su perfil de expresión Si bien estos resultados no corresponden al organismo problema (*P. vulgaris*), los resultados de estos autores, permiten una aproximación a la comprensión de los resultados obtenidos en este trabajo.

4.3. Corrimiento electroforético de la amplificación por PCR de la secuencia de interés (Phvul.282400)

La reacción de amplificación dio como resultados un patrón de bandas intensas de poco más de 300 y menor a 500 pb. Estas bandas corresponden con el tamaño esperado para la defensina, la cual contempla un fragmento de la región 3' UTR que es de 431 pb. En la figura 13 se muestra el análisis de la extracción plasmídica de cuatro muestras, las cuales fueron analizadas mediante un gel de agarosa al 1% por electroforesis, para su observación y visualizado en la figura 12, empleando el sistema de documentación de geles por UV (GD-1000 de Axygen™). Estas extracciones plasmídicas exhiben fragmentos correspondientes al tamaño aproximado ya mencionado de 431 pb.

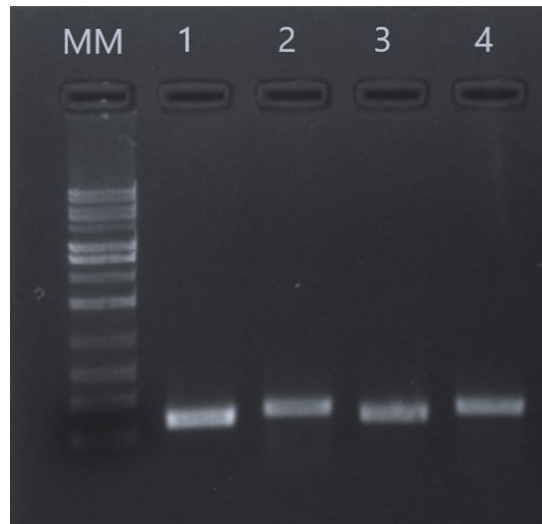


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de la amplificación por PCR de la secuencia Phvul.282400. Marcador de peso molecular de 1 Kb Axygen™ (MM). Amplicones de Phvul.282400 a partir de cuatro extracciones plasmídicas (carril 1-4) con un tamaño del amplificado de 431 pb.

En el trabajo realizado por (Mahmoud et al., 2015) se amplificó un fragmento de 486 pb del gen PvPDF que codifica para una defensina vegetal de *Phaseolus vulgaris* a partir de DNA genómico (gDNA). La variación en la longitud en pares de bases entre ambas secuencias se explica, según lo que refiere el autor, al considerarse para la amplificación la región 5'UTR de la secuencia que codifica para el gen de la defensina PvPDF.

4.4 Secuenciación

Los resultados de la secuenciación se presentan en un electroferograma visualizado mediante el software SnapGene (4.0.7).

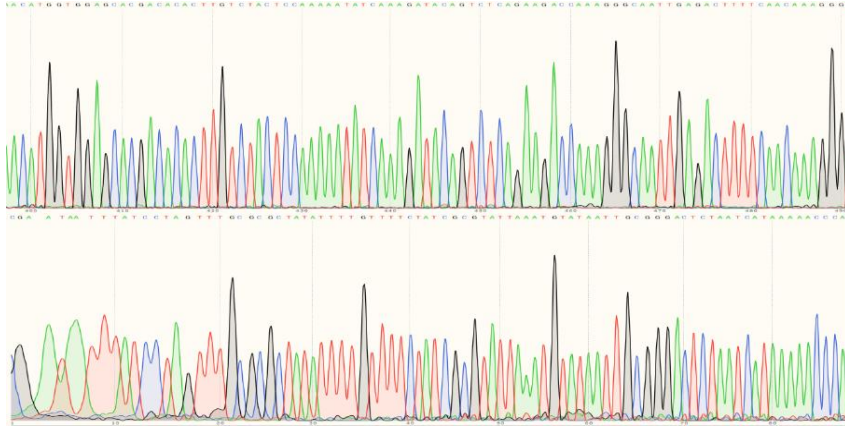


Figura 13. Electroferograma de la secuencia Phvul.282400. Muestra la lectura con los resultados reportados de la secuenciación de Phvul.282400.

4.5. Análisis bioinformático del resultado de la secuenciación

4.5.1. Alineamiento múltiple de secuencias

En el alineamiento múltiple de secuencias, la secuencia obtenida experimentalmente, ubicada al inicio e identificada como (Phvul.282400), se muestra alineada con otras doce secuencias, donde: nueve de estas secuencias, (2-10) corresponden a defensinas vegetales diversas. Las últimas tres secuencias que comprenden (10-13), son también defensinas vegetales que en un inicio fueron clasificadas como γ -tioninas. Sin embargo, debido a la homología estructural que presentaban con la familia de las defensinas, estas fueron reclasificadas nuevamente dentro de esta familia de defensinas vegetales. La adición intencional de estas últimas tres secuencias, es con la finalidad de comprobar de forma somera dicho supuesto.

La secuencia Phvul.282400, junto con las otras secuencias de las defensinas de diversas especies de plantas mostraron una identidad limitada en cuanto a sus secuencias; es decir, una baja homología. Por otro lado, la secuencia Phvul.282400 presenta una firma característica de ocho residuos de cisteína (C) altamente conservados. Además de los ocho residuos de C, son característicos dos residuos de glicina (G) y uno de glutamato (E). Se confirmó que estos residuos de C se conservaban estrictamente desde las posiciones C1, hasta C7. En el caso del residuo en la posición C8, se mostró que este último estaba sustituido por el aminoácido serina (S) (Figura 14), sin dejar de exhibir los ocho residuos.

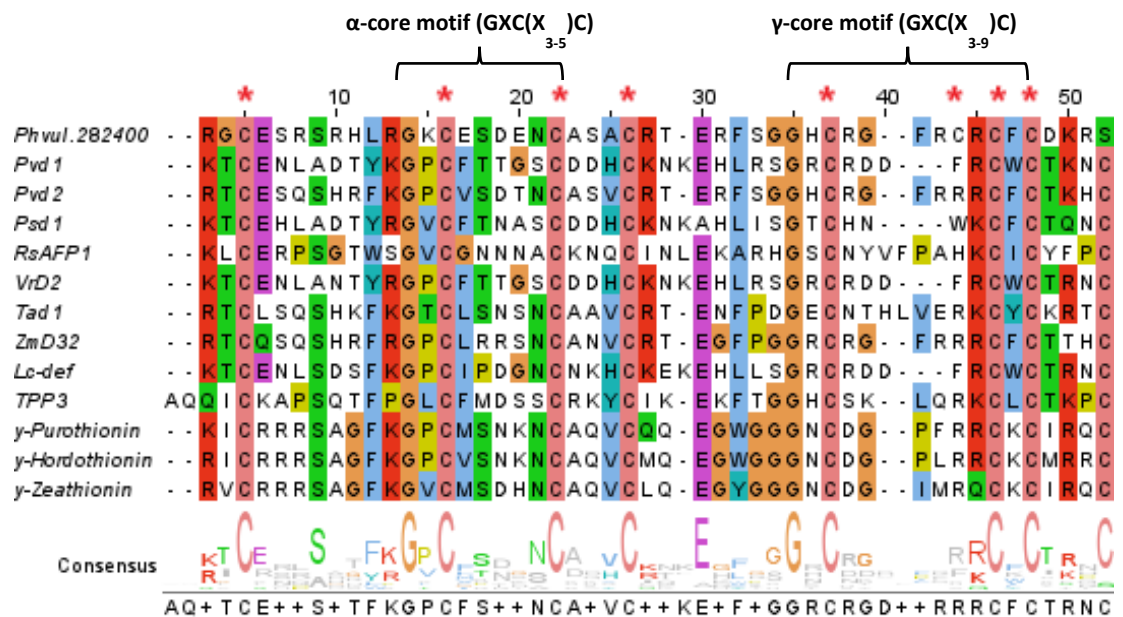


Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias. Al igual que otras defensinas, la defensina Phvul.282400 posee los ocho residuos de cisteína (C). Además de dos residuos de glicina (G) y uno de glutamato (E). Representados por letras de mayor tamaño que indican el consenso completo para cada uno de estos residuos altamente conservados presentes en las secuencias. También exhibe los motivos α -core (GXC(X₃₋₅)C) y γ -core (GXC(X₃₋₉)C). Siendo todos estos elementos característicos de las defensinas vegetales.

Estos hallazgos indican que el cambio en la posición del último residuo de C, sustituido por S no inducen alteraciones en la estructura terciaria, esto se puede apreciar en la superposición estructural de las secuencias modeladas (Figura 15). En estas secuencias también se aprecia la secuencia de aminoácidos que dan lugar al motivo $\alpha\beta$ estabilizado con cisteína $CS\alpha\beta$; siendo este motivo $(CXCX_3CX_nCX_nCXC)$. También es posible apreciar el motivo α -core $(GXCX_{3-5}C)$, y el motivo γ -core $(GXCX_{3-9}C)$. Como ya se ha indicado, C corresponde a cualesquiera de los ocho residuos de la firma de cisteína (C), y en cuanto a X, este representa a cualquier residuo no conservado de aminoácidos.

4.5.2 Modelado estructural de la secuencia

A partir del análisis bioinformático realizado, pudo obtenerse un modelado “de novo” de la estructura tridimensional de la secuencia Phvul.282400. A este modelado se le denominó así, debido a que la predicción de la estructura de la secuencia se genera sin la necesidad de utilizar información de alguna otra estructura molde. El modelado de la estructura plegada de la proteína está basado en un conjunto de algoritmos basados en aprendizaje de máquina e inteligencia artificial llamado “deep learning”. Por otro lado, el modelado molecular por homología de la secuencia Phvul.282400 empleando como molde la secuencia PDB: 6VPN, con anotación de su estructura tridimensional, ya cristalizada del péptido maduro, la cual se ha dilucidado mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Los datos reportados por (Skalska et al., 2020) del análisis de RMN les permitió definir por primera vez la, la primera estructura tridimensional de una defensina la (PvD1). Esto a su vez permitió verificar la identidad estructural para así confirmar la homología estructural de nuestra secuencia problema Phvul.282400.

Según la predicción estructural para ambos métodos, y la posterior superposición de estas estructuras, indican una configuración estructural idéntica. La única conformación disímil en la superposición de estas estructuras la presenta la secuencia que codifica para el péptido señal, y que forma una α hélice en el extremo N-terminal, unido a la primera lámina β (Figura 15) dada la naturaleza en el origen de su modelado molecular.



Figura 15. Superposición de las estructuras terciarias generadas de la secuencia. Modelado por “Deep learning” (cyan), Y por homología de secuencia con PDB: 6VPN (magenta) de Phvul.282400. Ambas exhiben en el plegamiento de su estructura cristalizada, una α hélice, y tres láminas- β antiparalelas. Además, los dominios ($C\alpha\beta$), y el γ - core. Así como también los enlaces disulfuro característicos en las defensinas de origen vegetal.

4.6 Subclonación del sistema de expresión binario B-ptdTPhvul.282400 en *Agrobacterium*

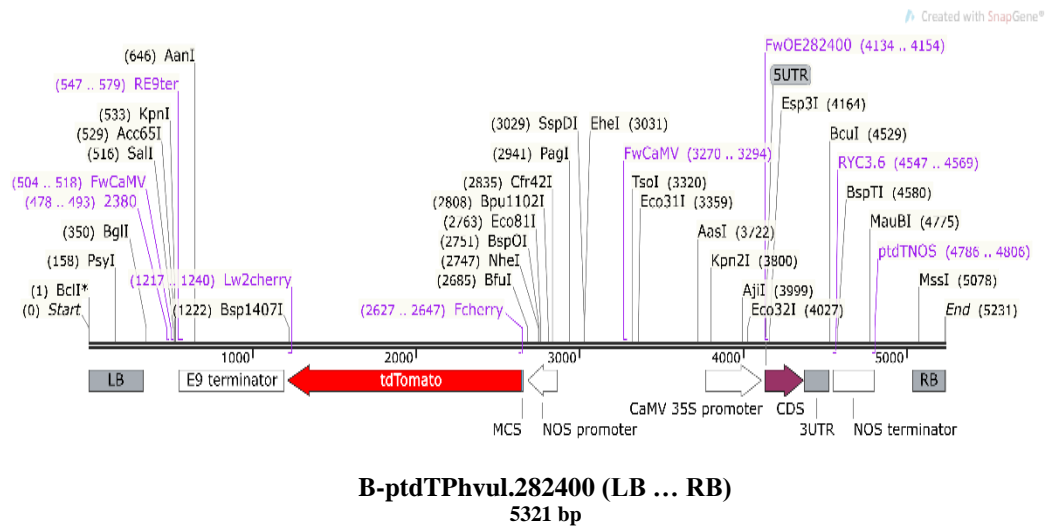


Figura 16. Mapa del T-DNA dentro del vector binario B-ptdTPhvul.282400. La secuencia Phvul.282400, junto con el promotor constitutivo 35S del CaMV, y el terminador NOS, constituyen el cassette de expresión completo. Phvul.282400 se expresó con éxito en el vector; por lo tanto, este sistema de expresión está listo para generar plantas transformadas.

V. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se identificó y clonó el gen putativo (Phvul.282400) que codifica para un péptido pequeño rico en cisteínas y que conserva la firma de un péptido antimicrobiano del tipo defensina. El gen Phvul.282400 que codifica para este péptido muestra un notorio incremento significativo en los niveles de transcritos durante el proceso de nodulación y en raíz. La amplificación por PCR de esta secuencia fue posible a partir cDNA de *Phaseolus vulgaris*. El análisis “in silico” de los resultados de su secuenciación, confirmaron que esta secuencia posee un total de 47 aminoácidos que codifican para el péptido maduro. A partir de un alineamiento múltiple se confirmó también que posee la firma conservada de los residuos 8C, 2G y 1E, así como los motivos α -core, y γ -core característicos en las defensinas vegetales. Además, un modelado estructural de la secuencia, sugiere que el péptido que codifica el gen Phvul.282400 de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa tiene un plegamiento característico de las defensinas. En consecuencia, pensamos que el péptido rico en cisteínas tiene las características moleculares y estructurales suficientes para ser considerado dentro de la familia de las defensinas vegetales. Hemos insertado el gen dentro del sistema de expresión binario B-ptdTPhvul.282400 de *Agrobacterium*, y esta herramienta está lista para emplearla en la expresión constitutiva en organismos de plantas modelo para evaluar la participación que tiene este gen durante el proceso de nodulación.

VI. REFERENCIAS

- Azmi, S., & Hussain, M. K. (2021). Analysis of structures, functions, and transgenicity of phytopeptides defensin and thionin: a review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-020-00093-5>
- Campos, M. L., Lião, L. M., Alves, E. S. F., Migliolo, L., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2018). A structural perspective of plant antimicrobial peptides. *Biochemical Journal*, *475*(21), 3359–3375. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180213>
- Carvalho, A. de O., & Gomes, V. M. (2012). Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(38), 4270–4293. <https://doi.org/10.2174/138161211798999447>
- Cools, T. L., Struyfs, C., Cammue, B. P., & Thevissen, K. (2017). Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections. *Future Microbiology*, *12*(5), 441–454. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0181>
- Coss-Navarrete, E. L., Díaz-Valle, A., & Alvarez-Venegas, R. (2020). Induction of plant resistance to biotic stress by priming with β -aminobutyric acid (BABA) and its effect on nitrogen-fixing nodule development. In *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00006-4>
- Costa, L. S. M., Pires, Á. S., Damaceno, N. B., Rigueiras, P. O., Maximiano, M. R., Franco, O. L., & Porto, W. F. (2020). In silico characterization of class II plant defensins from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, *179*(September), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112511>
- De O Mello, É., Dos Santos, I. S., De O Carvalho, A., De Souza, L. S., De Souza-Filho, G. A., Do Nascimento, V. V., Machado, O. L. T., Zottich, U., & Gomes, V. M. (2014). Functional expression and activity of the recombinant antifungal defensin PvD1r from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) seeds. *BMC Biochemistry*, *15*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-15-7>
- Do Amaral, V. S. G., Silva Santos, S. A. C., De Andrade, P. C., Nowatzki, J., Silva Júnior, N., De Medeiros, L. N., Gitirana, L. B., Pascutti, P. G., Almeida, V. H., Monteiro, R. Q., & Kurtenbach, E. (2020). *Pisum sativum* defensin 1 eradicates mouse metastatic lung nodules from B16F10 melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082662>
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X., & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell and Environment*, *42*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>

- Finkina, E. I., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Plant Defensins: Structure, Functions, Biosynthesis, and the Role in the Immune Response. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44(3), 261–278. <https://doi.org/10.1134/S1068162018030056>
- Gerdol, M., Schmitt, P., Venier, P., Rocha, G., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2020). Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. *Frontiers in Immunology*, 11(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758>
- Goyal, R. K., & Mattoo, A. K. (2014). Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science*, 228, 135–149. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2014.05.012>
- Goyal, R. K., & Mattoo, A. K. (2016). Plant antimicrobial peptides. In *Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents* (pp. 111–136). https://doi.org/10.1007/978-3-319-32949-9_5
- Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 963–968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>
- Hoher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Doumas, P., Pujic, P., Gherbi, H., Queiroux, C., da Silva, C., Wincker, P., Normand, P., & Bogusz, D. (2011). Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiology*, 156(2), 700–711. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174151>
- Höng, K., Austerlitz, T., Bohlmann, T., & Bohlmann, H. (2021). The thionin family of antimicrobial peptides. *PLoS ONE*, 16(7 July), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254549>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Ishaq, N., Bilal, M., & Iqbal, H. (2019). Medicinal Potentialities of Plant Defensins: A Review with Applied Perspectives. *Medicines*, 6(1), 29. <https://doi.org/10.3390/medicines6010029>
- Jiang, Y., MacLean, D. E., Perry, G. E., Marsolais, F., Hill, B., & Pauls, K. P. (2020). Evaluation of beneficial and inhibitory effects of nitrate on nodulation and nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Legume Science*, December 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1002/leg3.45>
- Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., & Nesmelova, I. V. (2020). Plant defensins from a structural perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21155307>

- Lacerda, A. F., Vasconcelos, É. A. R., Pelegriani, P. B., & Grossi de Sa, M. F. (2014). Antifungal defensins and their role in plant defense. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00116>
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
- Liu, Y., Liu, L., Yang, C., Han, S., Yang, S., Liu, G., Zeng, Q., & Liu, Y. (2021). Molecular Identification and Antifungal Activity of a Defensin (PaDef) from Spruce. *Journal of Plant Growth Regulation*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10316-3>
- Mahmoud, E. A., Solliman, M. E. M., & Ahmed, O. K. (2015). Isolation and cloning of genomic dna sequence encoding the pvpdf defensin gene. *International Journal of Academic Research*.7(1):111-118, January. <https://doi.org/10.7813/2075-4124.2015/7-1/A.18>
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2021). Legume proteins, peptides, water extracts, and crude protein extracts as antifungals for food applications. *Trends in Food Science and Technology*, 112(October 2019), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.035>
- Mojsoska, B., & Janssen, H. (2015). Peptides and peptidomimetics for antimicrobial drug design. *Pharmaceuticals*, 8(3), 366–415. <https://doi.org/10.3390/ph8030366>
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(June), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.668632>
- Moyer, T. B., Purvis, A. L., Wommack, A. J., & Hicks, L. M. (2021). Proteomic response of Escherichia coli to a membrane lytic and iron chelating truncated Amaranthus tricolor defensin. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02176-4>
- Mulla, J. A., Kibe, A. N., Deore, D. D., Jadhav, A. R., & Tamhane, V. A. (2021). Molecular characterization of diverse defensins (γ -thionins) from *Capsicum annuum* flowers and their effects on the insect pest *Helicoverpa armigera*. *Plant Gene*, 26(September 2020), 100284. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100284>
- Noonan, J., Williams, W. P., & Shan, X. (2017). Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091938>

- 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>
- Odintsova, T. I., Slezina, M. P., & Istomina, E. A. (2020). Defensins of grasses: A systematic review. *Biomolecules*, *10*(7), 1–40. <https://doi.org/10.3390/biom10071029>
- Ozyigit, I. I., Filiz, E., Saracoglu, I. A., & Yalcin, B. (2019). Comparative analysis of mature and preproprotein form of thionins in some plant species; bioinformatics approaches. *Fresenius Environmental Bulletin*, *28*(5), 4256–4266. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.36423.14247>
- Pandey, B., Tyagi, C., Prajapati, G. K., Mishra, A. K., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Allah, E. F. A., & Mohanta, T. K. (2020). Analysis of mutations of defensin protein using accelerated molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*, *15*(11 November), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241679>
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *88*, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.02.004>
- Porto, W. F., Pires, A. S., & Franco, O. L. (2017). Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. *Biotechnology Advances*, *35*(3), 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.02.001>
- Pothana, A., Bhatnagar-Mathur, P., Yeshvekar, R. K., & Sharma, K. K. (2019). Plant defensins : Tissue specific expression leading to distinctive functions. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *13*(2), 212–231.
- Rogozhin, E., Ryazantsev, D., Smirnov, A., & Zavriev, S. (2018). Primary structure analysis of antifungal peptides from cultivated and wild cereals. *Plants*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/plants7030074>
- Santos-Silva, C. A. dos, Vilela, L. M. B., Oliveira-Silva, R. L. de, Silva, J. B. da, Machado, A. R., Bezerra-Neto, J. P., Crovella, S., & Benko-Iseppon, A. M. (2021). Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses. *Biochimie*, *186*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.03.012>
- Santos Aguilar, J. G. (2021). Plant-Based Peptides With Biological Properties. *Phytopharmaceuticals*, 123–134. <https://doi.org/10.1002/9781119682059.ch6>
- Sathoff, A. E., & Samac, D. A. (2019). Antibacterial activity of plant defensins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *32*(5), 507–514. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0229-CR>

- Sathoff, A. E., Sathoff, A. E., Lewenza, S., Lewenza, S., Samac, D. A., & Samac, D. A. (2020). Plant defensin antibacterial mode of action against *Pseudomonas* species. *BMC Microbiology*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01852-1>
- Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Sher Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali Khan, M., Arif, M., & Mii, M. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. *3 Biotech*, *9*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1725-5>
- Skalska, J., Andrade, V. M., Cena, G. L., Harvey, P. J., Gaspar, D., Mello, érica O., Henriques, S. T., Valle, J., Gomes, V. M., Conceição, K., Castanho, M. A. R. B., & Andreu, D. (2020). Synthesis, Structure, and Activity of the Antifungal Plant Defensin PvD1. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(17), 9391–9402. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00543>
- Srivastava, S., Dashora, K., Ameta, K. L., Singh, N. P., El-Enshasy, H. A., Pagano, M. C., Hesham, A. E. L., Sharma, G. D., Sharma, M., & Bhargava, A. (2021). Cysteine-rich antimicrobial peptides from plants: The future of antimicrobial therapy. *Phytotherapy Research*, *35*(1), 256–277. <https://doi.org/10.1002/ptr.6823>
- Stotz, H. U., Thomson, J., & Wang, Y. (2009). *Plant Signaling & Behavior Plant defensins Defense, development and application*. <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9755>
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, *8*(4), 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tang, S. S., Prodhan, Z. H., Biswas, S. K., Le, C. F., & Sekaran, S. D. (2018). Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. *Phytochemistry*, *154*(July), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.002>
- Zhu, S. (2008). Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CS α β defensins. *Molecular Immunology*, *45*(3), 828–838. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.354>

VII. ANEXOS

Durante el desarrollo de esta tesis se participó como expositor en sesión de poster, en las “Jornadas de investigación en Ciencias Biológicas (6a edición)”, organizado por la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ). Celebrado el día 16 de noviembre de 2021 (Figura 17).



Figura 17. Constancia de participación como ponente en sesión poster de los avances de esta tesis en las “Jornadas de investigación en Ciencias Biológicas (6a edición)”.