

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Obtención de una clona de *A. rhizogenes* con el vector ptdT-Defensina y su evaluación en la transformación de *P. vulgaris*

Por:

Lidia Alejandra González Aldaco

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Obtención de una clona de *A. rhizogenes* con el vector ptdT-Defensina y su evaluación en la transformación de *P. vulgaris*

Por:

Lidia Alejandra González Aldaco

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador:



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Presidente



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Vocal



Dra. Erika Nohemí Rivas Martínez

Vocal



Dra. Aida Isabel Leal Robles

Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**Obtención de una clona de *A. rhizogenes* con el vector ptdT-Defensina y
su evaluación en la transformación de *P. vulgaris***

Por:

Lidia Alejandra González Aldaco

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

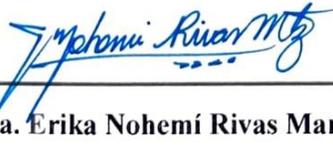
INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

Aprobada por Comité de Asesoría:



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Asesor Principal



Dra. Erika Nohemí Rivas Martínez

Co-Asesor



Dr. Javier I. Montalvo Arredondo

Co-Asesor

Saltillo, Coahuila, México

Junio 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 de 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.



Lidia Alejandra González Aldaco

Pasante de Ingeniero en Biotecnología

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por brindarme las herramientas para el desarrollo y culmino de mis estudios de licenciatura.

Al Dr. Marco Adán Juárez Verdayes y al Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo por su instrucción académica, trasmisión de conocimiento, la paciencia y la motivación para terminar este trabajo de tesis.

A la Dra. Yolanda Ortega Ortega del Departamento de Biociencias y Agrobiotecnología del Centro de Investigación en Química Aplicada por el apoyo técnico requerido durante el desarrollo experimental del trabajo de tesis.

A Carmina Sánchez Rangel por ser mi amiga, compañera de laboratorio, por su paciencia, motivación y por siempre estar para mí.

A mis amistades personales, Minerva Alviso, Marlen Valdes, Ana Gabriela Dávila, Sonia Duron, Carina Martínez, Melissa Ledezma, Marco García y Pavel Bere por su amistad y por escuchar mis explicaciones raras de este trabajo de tesis.

DEDICATORIAS

A mi madre Silvia Xiomara González Aldaco por siempre ser un ejemplo para mí, por su amor y confianza.

A mi tía Norma Lidia González Aldaco por ser como mi hermana mayor, su paciencia y cuidado.

A mi abuela Candelaria Aldaco Basaldúa y a mi hermano Luis González Aldaco por su amor, paciencia y compañía.

A mi tío Sergio Arturo González Aldaco que más que ser un tío ha sido mi padre.

A mi prima Liliana Deyanira González Ruiz por escucharme y estar siempre cuando he necesitado de alguien.

A mi perro Totol por acompañarme en las madrugadas y recordarme que ya era hora de irnos a dormir.

INDICE

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
INDICE	vii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
Péptidos antimicrobianos	4
Péptidos antimicrobianos en plantas	7
Defensinas en plantas	10
<i>Phaseolus vulgaris</i>	15
Identificación y clonación de una defensina de <i>Phaseolus vulgaris</i> expresada diferencialmente en el proceso de nodulación	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Localización del sitio experimental	17
Protocolo de transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	17
Protocolo para transformación de <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
Visualización y selección de raíces transformadas por medio de un sistema fluorescencia	21
Protocolo de extracción de ADN de las raíces transgénicas de <i>P. vulgaris</i>	21
Detección del transgén en <i>P. vulgaris</i>	22
Protocolo PCR en colonia	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24

Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	24
Transformación de <i>Phaseolus vulgaris</i>	25
Visualización y selección de raíces transformadas por medio de un sistema fluorescencia	27
Extracción de ADN de las raíces transgénicas de <i>P. vulgaris</i>	28
Amplificación de la secuencia de la defensina a partir gDNA de las “Hairy roots” ...	28
CONCLUSIONES	30
Perspectivas.....	30
LITERATURA CITADA.....	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de péptidos antimicrobianos más comunes en plantas y sus funciones.	9
Tabla 2 Defensinas en plantas.....	12
Tabla 3 Mezcla de reactivos para PCR	22
Tabla 4 Características de los primers	22
Tabla 5 Resultados obtenidos en eficiencia de germinación de las semillas	25
Tabla 6 Análisis de la eficiencia de transformación de plantas de <i>P.vulgaris</i> con diferentes clonas con la construcción ptdTPhvul.282400.....	26
Tabla 7 Repeticiones de los resultados obtenidos de los experimentos realizados con la clona C5	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMP's).....	6
Figura 2 Árbol filogenético de AMP's en plantas	8
Figura 3 Imagen representativa de ejemplos de defensinas en plantas.	13
Figura 4 Mecanismos de acción de las defensinas en plantas.....	14
Figura 5 Mapa del T-DNA para la defensa.....	16
Figura 6 Representación del proceso de germinación de las semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	19
Figura 7. Proceso de transformación de <i>P. vulgaris</i> con <i>A. rhizogenes</i>	21
Figura 8 Corrimiento electroforético de la PCR en colonia de diversas clonas de <i>A. rhizogenes</i> que contienen la defensina.	24
Figura 9 Visualización de raíces con luz blanca y con el sistema de fluorescencia.	27
Figura 10 Electroforesis del gDNA a partir de plantas transformadas..	28
Figura 11 Corrimiento electroforético de la defensina en las repeticiones del experimento.	29

RESUMEN

Los Péptidos Antimicrobianos (AMP's por sus siglas en inglés antimicrobial peptides) son moléculas de bajo peso molecular compuestas de 12 a 60 aminoácidos y se expresan de forma constitutiva o diferencial durante las etapas del desarrollo de los organismos. La principal función descrita de estos péptidos es la protección contra patógenos (bacterias, hongos, virus, etc.). En plantas los AMP's participan en otros procesos independiente a la actividad antimicrobiana del péptido, ya que se han implicado en el ciclo celular, en la germinación de la semilla, el desarrollo de hojas, la floración y desarrollo del fruto. Existen diferentes familias de AMP's en plantas y a continuación de mencionan las principales: las defensinas, snakinas, las tioninas, las knottin, las hevein-like, las transportadoras de lípidos y los ciclotidos. Las defensinas son un tipo de AMP's que se han descrito en diferentes plantas modelo, estos péptidos tienen un tamaño de 45 a 55 aminoácidos y cuenta con ocho residuos de cisteína y por lo tanto cuenta con cuatro posibles puentes disulfuro. Su estructura secundaria consta de una α hélice y tres láminas β antiparalelas. En un trabajo previo se analizó el transcriptoma de *P. vulgaris* en búsqueda de secuencias de las defensinas expresadas diferencialmente y se encontró una defensina expresada durante el proceso de nodulación. En el presente trabajo nos enfocamos en la selección de una clona de *Agrobacterium rhizogenes*(K599) que presentara una eficiencia de transformación mayor al 70%. Para esto se transformaron células calcio competentes de *A. rhizogenes* (K599) con la construcción de una defensina (ptdTPhvul.282400) realizada por (Garcia,2022). De las clonas transformadas con la construcción, se realizaron diferentes ensayos de transformación en plantas de frijol y se determinó que la clona denominada C5 fue la que presentó la mejor eficiencia de transformación. Los resultados de este trabajo permitirán el desarrollo de experimentos posteriores que permitan elucidar el papel de la defensina en el proceso de nodulación.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, Defensinas, eficiencia de transformación, *Phaseolus vulgaris*, *Agrobacterium rhizogenes*.

INTRODUCCIÓN

Los AMP's están presentes en todos los organismos vivos y forman parte de la primera línea de defensa en contra organismos patógenos como: bacterias, hongos, virus, entre otros, su principal mecanismo de acción es la lisis de la célula (Moretta et al.,2021; Huan et al.,2020).

En plantas existen diferentes familias de AMP's y las más estudiadas son: las defensinas, las snakinas, las tioninas, las knottin, las hevein-like, proteínas de transferencia de lípidos y los ciclotidos (Hammani et al., 2009), todas ellas cuentan con diferentes actividades biológicas descritas a parte de la inherente actividad antimicrobiana, entre las que destacan su participación en el desarrollo de la semilla, en la floración o en respuesta a factores abióticos (Li et al.,2021).

La familia de las defensinas en las plantas se ha caracterizado por presentar una actividad antimicrobiana o antifúngica importante; este tipo de péptidos antimicrobianos son ricos en residuos de cisteína entre los cuales se forman puentes disulfuro y su expresión se ha identificado en diversas partes de las plantas incluyendo los nódulos de las raíces de legumbres. En *Medicago truncatula* existen los péptidos antimicrobianos conocidos como NCR's (por sus siglas en ingles nodule-specific cysteine-rich peptides) que presentan una importante actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos. Sin embargo, su expresión es necesaria para la diferenciación del rizobium a bacteroide durante el proceso de nodulación (Salgado et al., 2022).

Phaseolus vulgaris es una leguminosa de importancia agronómica por su rico contenido de proteínas, carbohidratos y micronutrientes, además de ser un alimento económico y al alcance de la población mundial (O'Rourke et al., 2014). Este tipo de leguminosa cuenta con la expresión de diferentes péptidos antimicrobianos como: PvD1, PBAFP, WCBAFP, vulgarinin, entre otras (Oliveira et al., 2009).

Objetivo general

- Selección de una clona de *Agrobacterium rhizogenes* (K599) con la construcción de una defensina previamente generada (ptdT-defensina 282400) que tenga una eficiencia de transformación de más del 70% en *Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa.

Objetivos específicos

1. Transformación de *A. rhizogenes* (K599) con el vector que porta la defensina (ptdT-defensina 282400).
2. Selección de las clonas de *A. rhizogenes* (K599) por PCR en colonia.
3. Determinación de la eficiencia de transformación de *A. rhizogenes* (K599) en plantas de *P. vulgaris*.
4. Visualización de raíces transgénicas que contengan la defensina (ptdT-defensina 282400).
5. Extracción del gDNA de las “Hairy roots” transgénicas.
6. Amplificación de la secuencia de interés dentro del gDNA de las raíces transgénicas.
7. Detección del transgén de la defensina en las raíces del frijol.

Hipótesis

La familia de las defensinas tiene una expresión diferencial en condiciones de estrés biótico-abiótico y durante el desarrollo de las plantas. Un análisis previo mostró la expresión diferencial de una defensina en el proceso de nodulación entre *P. vulgaris* y el rhizobium. La obtención de una clona de *A. rhizogenes* (K599) que presente una eficiencia de transformación mayor al 70% permitirá realizar análisis posteriores y elucidar el posible papel de la defensina en el proceso de nodulación.

REVISION DE LITERATURA

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP's por sus siglas en inglés Antimicrobial peptides), pueden clasificarse tomando diferentes criterios y a continuación se mencionan las formas más comunes: la fuente de la cual es extraído, por su actividad, por su estructura o bien por su composición de aminoácidos y estas clasificaciones se ilustran en la **Figura 1**. Los AMP's se encuentran distribuidos entre los organismos y todos estos péptidos hasta el momento son procesados a partir de una proteína precursora y pueden presentar modificaciones postraduccionales como: la glicosilación, carboxilación y proteólisis (Huerta-Cantillo et al., 2016), son traducidos de manera ribosomal ó no ribosomal (común en bacterias) (Keymanesh et al., 2009) y hasta el momento todos los AMP's son reportados como proteínas de bajo peso molecular en un rango de 2 a 50kDa y cuentan con la presencia de 4 a 12 residuos de cisteína que son importantes para la formación de puentes disulfuro dentro del péptido, estos enlaces le brindan a los AMP's estabilidad química, térmica y evitando su degradación enzimática (Kohn et al., 2018). Los AMP's son considerados como parte de un mecanismo de defensa contra patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus) ya que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos (propiedades bacteriostáticas, microbicidas y citolíticas). Se han descrito diversos mecanismos de acción de los AMP's, el primer mecanismo se encuentra relacionado con la interacción del péptido con la membrana celular del organismo patógeno y dicha interacción es mediada por cargas electroestáticas entre la carga negativa de la membrana celular y la carga positiva del péptido antimicrobiano, un segundo mecanismo de acción es la de interferir en funciones vitales de las células patogénicas en donde puede inhibir la síntesis de proteínas y afectar la biosíntesis del material genético de los patógenos y la división celular (Moretta et al., 2021; Kohn et al., 2018; Olascoaga-Del Ángel et al., 2018; Huan et al., 2020).

La expresión de los AMP's se puede dar bajo diferentes estímulos, por ejemplo, cuando los receptores TLR's (receptores que reconocen patrones moleculares asociados a peligro (PAM's) presentes en las células animales encuentran su ligando el cual puede ser: la flagelina, el peptidoglicano, el ácido lipoteicoico de bacterias y componentes de la cápside

viral) se inicia una respuesta en la que los péptidos antimicrobianos como la catelicina, defensinas, lactoferrina, lisozima, dermicina entre otros AMP's tienen un papel importante como mecanismo de defensa en animales (Lehrer y Ganz, 2002; Schaubert y Gallo, 2008); También, la expresión de AMP's se ha documentado en diferentes etapas del desarrollo de los organismos, por ejemplo, se ha observado que la síntesis de catelicina hcap18/LL37 y la b-defensina-2 en los queratinocitos es mayor en fetos en comparación a queratinocitos de postnatales (Gschwandtner et al.,2014); a su vez se ha estudiado la síntesis de AMP's en diferentes etapas del ciclo celular de las plantas teniendo actividad desde la germinación de la semilla, hasta la floración u obtención del fruto (Oliveira et al.,2009).

A nivel biotecnológico los péptidos antimicrobianos pueden ser aplicados en diferentes áreas de estudio como son: en la medicina, la agricultura, la ganadería y producción de alimentos. Dentro de las aplicaciones de los AMP's en la medicina podemos mencionar que tienen el potencial de funcionar como sustitutos a los antibióticos; un reporte estima que alrededor de 700,000 personas mueren al año debido a la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos y se proyecta que para el 2050 habrá alrededor de 10 millones de muertes y más de 100 trillones de pérdidas económicas por esta causa (Liang et al.,2020). Los AMP's en la agricultura también son de gran interés ya que pueden funcionar como pesticidas y fungicidas para combatir a patógenos en plantas (Chen et al.,2021) o bien para el desarrollo de plantas transgénicas que produzcan estos péptidos heterólogos (Parachin et al.,2012).

Actualmente, podemos encontrar péptidos antimicrobianos en el mercado que son extraídos de diferentes organismos **Figura 1**. Algunos ejemplos de estos son los siguientes: la gramicidina soviética el cual es un péptido antimicrobiano producido por una bacteria *Bacillus brevis* este tipo de péptido tiene actividad antibacteriana contra bacterias Gram+ y Gram-, y se utiliza para el tratamiento de heridas (uso tópico), infecciones externas de oído, infecciones de garganta e infecciones del conducto radicular; evitando el contacto con la sangre ya que este péptido también tiene actividad hemolítica (Guan et al.,2019); la daptomicina es otro péptido antimicrobiano que podemos encontrar en el mercado, este péptido se obtiene de *Streptomyces roseosporus* y cuenta con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram + (como *Staphylococcus aureus*) y es utilizado para

el tratamiento de infecciones en la piel y de tejido suave (Sauermaann et al.,2008); la nisina es un AMP's que se utiliza como un conservador de alimentos, este péptido es producido por la bacteria *Lactococcus lactis* y tiene actividad antibacterial contra bacterias Gram- y Gram+ (Branderburg et al., 2012; De Arauz et al., 2009). Por otro lado, también podemos encontrar algunos péptidos obtenidos de organismos eucariotas como: Pexiganan (MSI-78) el cual se obtiene de la rana *Sylvirana nigrovittata*, este péptido tiene amplio espectro contra deferentes patógenos como *Helicobacter pylori* (Zaslof, 2002; Parreira et al.,2019); otro péptido que se obtiene de células eucariotas es MBI-226 el cual se obtiene de los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos bovinos y es un AMP de uso tópico de amplio espectro contra patógenos como bacterias Gram+, Gram- y hongos.

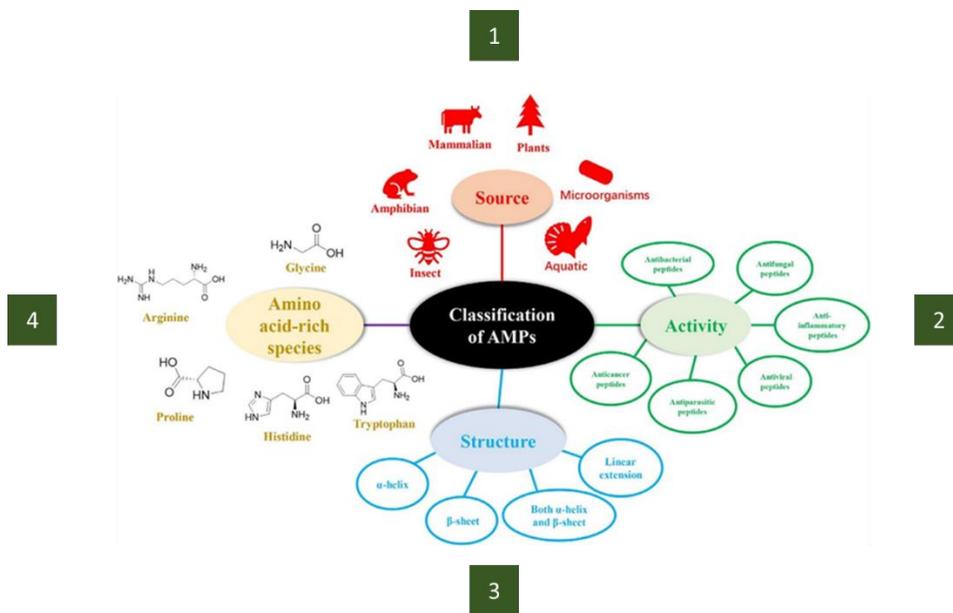


Figura 1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos (AMP's).

Los AMP's se dividen en cuatro clasificaciones (1) la fuente de la cual son extraídos (plantas, mamíferos, anfibios, insectos y microorganismos), (2) según su actividad, (3) su estructura, y (4) los aminoácidos que contengan (Huan et al.,2020).

Péptidos antimicrobianos en plantas

Durante la evolución las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra los patógenos y dentro de estos mecanismos encontramos a los AMP's. En las plantas se cuenta con diferentes clasificaciones y una de ellas es clasificarlos tomando como base la carga del péptido de tal forma que podemos encontrar péptidos catiónicos y péptidos aniónicos. Otra clasificación consiste en agruparlos en familias y de las más estudiadas en plantas son: las defensinas, las snakinas, las tioninas, las knottin, las hevein-like, las transportadoras de lípidos y los ciclotidos los cuales se muestran en la **Figura 2**, en dónde podemos observar que se pueden agrupar en siete familias y que estructuralmente los AMP's presentan laminas β y α hélices (Li et al.,2021, Campos et al.,2018).En la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos en distintas plantas y la función que llevan a cabo. Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los AMP's en plantas se encuentra relacionada con la capacidad de interactuar con la membrana del patógeno, hasta el momento existen cuatro modelos de acción de este mecanismo: barrel-stave pore, carpet mechanism, toroidal pore y el disordered toroidal pore (Li et al.,2021).

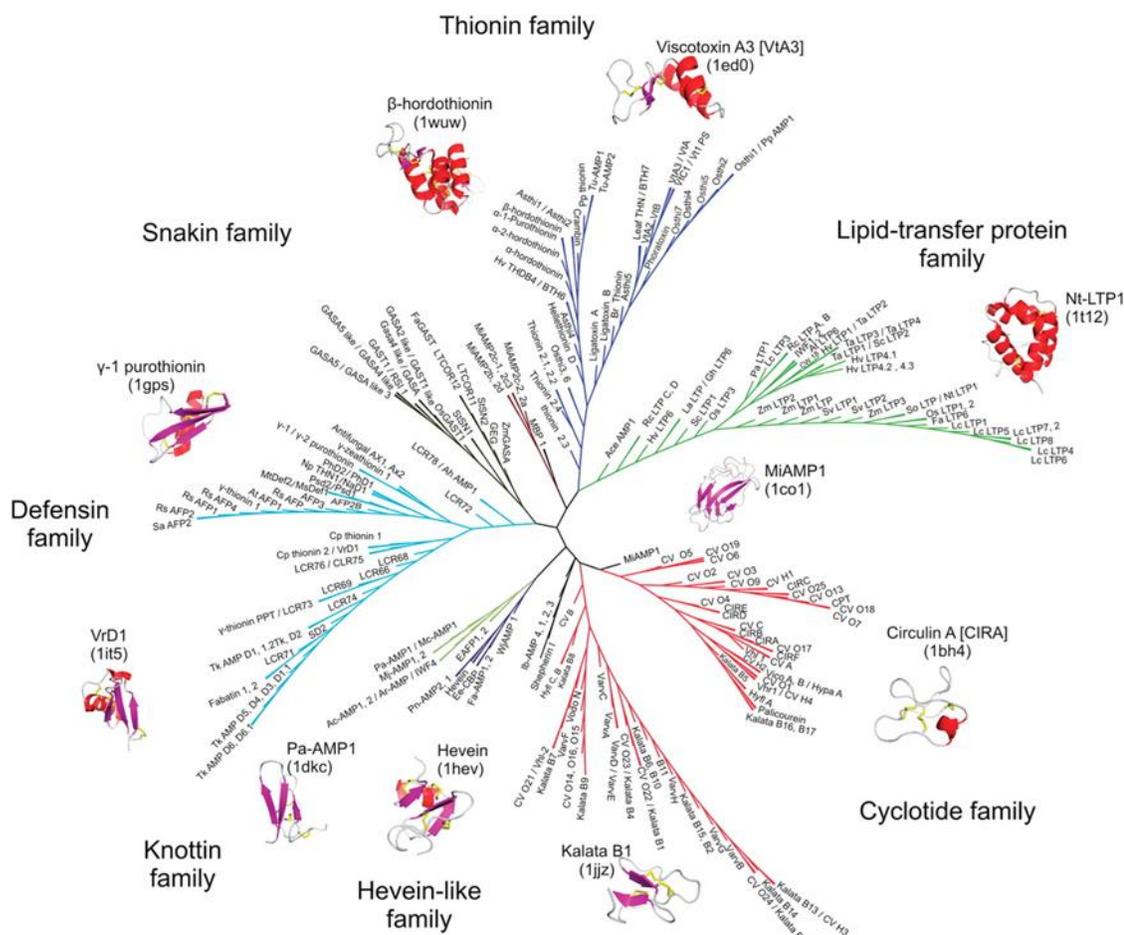


Figura 2 Árbol filogenético de AMP's en plantas. En plantas podemos encontrar una gran variedad de familias de péptidos antimicrobianos como las defensinas, las snakinas, las tioninas, las knottin, las hevein-like, proteínas transportadoras de lípidos y los ciclótidos (Hammani et al., 2009).

Tabla 1 Clasificación de péptidos antimicrobianos más comunes en plantas y sus funciones. Se pueden encontrar diferentes tipos de péptidos antimicrobianos y con diferentes actividades biológicas en plantas. Tomado y modificada de (Li et al.,2021)

Peptide	Classification	Function
Purothionins	thionin	Antibacterial
CaThi	thionin	Antibacterial, Antifungal
alfAFP	Plant defensin	Antifungal
Fa-AMP1	Plant defensin	Antibacterial, Antifungal
C. fistula PI	Plant defensin	Trypsin inhibitor
Rs-AFP1	Plant defensin	Antifungal
Rs-AFP2	Plant defensin	Antifungal
Vv-AMP1	Plant defensin	Antifungal
ZmD32	Plant defensin	Antibacterial, Antifungal
NaD1	Plant defensin	Antibacterial, Antifungal
NTC	Hevein-like peptides	Antifungal
Pn-AMP1	Hevein-like peptides	Antifungal
Ep-AMP1	Knottin-type peptides	Antibacterial, Antifungal
Psacothiasin	Knottin-type peptides	Antibacterial, Antifungal
bevuTI-I	Knottin-type peptides	Trypsin inhibitory
Tk-AMP-X1	α -hairpinin	Antifungal
Tk-AMP-X2	α -hairpinin	Antifungal
MBP-1	α -hairpinin	Antibacterial, Antifungal
Ps-LTP1	Lipid Transfer Protein	Antibacterial, Antifungal
Lc-LTP1	Lipid Transfer Protein	Antibacterial, Antifungal
Snakin-1	Snakins	Antibacterial, Antifungal
cyO2	Cyclotide family	Antibacterial, Anticancer
varv A	Cyclotide family	Anticancer
varv F	Cyclotide family	Anticancer
Poca B	Cyclotide family	Anticancer
CyO4	Cyclotide family	Anticancer

Defensinas en plantas

Generalidades de las defensinas en plantas

Las defensinas son una familia de péptidos antimicrobianos que se puede dividir en cinco clases y donde α , β y θ se encuentran en mamíferos y aves; la cuarta y quinta clasificación se encuentran en insectos y plantas, la diferencia entre esas diversas clases de defensinas radica en la posición de los puentes disulfuro los cuales se forman entre las cisteínas (Reddy et al., 2004). Las primeras defensinas aisladas de plantas fueron de semillas de *Triticum aestivum* (el trigo) y de *Hordeum vulgare* (la cebada) (Rojas et al., 2009) e inicialmente se agruparon en el grupo de las γ -tioninas por su similitud en su peso molecular, su composición de aminoácidos y que ambos cuentan con ocho cisteínas. Sin embargo, se descubrió que este grupo de proteínas tenía una mayor similitud con el grupo de las defensinas descubiertas en animales las cuales presentan el mismo número de puentes disulfuro formados entre las cisteínas. La familia de las defensinas en plantas es una familia multigénica la cual codifica para péptidos antimicrobianos con una carga positiva, con un tamaño de 45 a 55 aminoácidos, un peso de 5 a 7kDa, un punto isoelectrico de nueve y forman cuatro puentes disulfuro los cuales le dan estabilidad estructural y termodinámica (Fernandez,2015; Oliveira et al.,2009). La estructura secundaria de las defensinas consiste en un α -hélice y tres laminas- β antiparalelas (Tam et al., 2015). en la **Figura 3a** se puede observar la interacción entre los residuos para la formación de puentes disulfuro en diferentes defensinas vegetales y en la **Figura 3b** se aprecia la estructura secundaria de dos defensinas vegetales extraídas de diferentes organismos. Las defensinas se han aislado a partir de raíces, hojas, flores, tallos y semillas; un análisis de la localización de las defensinas muestra que se pueden encontrar en células estomáticas, en células que cubren la cavidad subestomática y también se han encontrado expresadas en el xilema (Garcia-Olmedo et al. 1998). Las defensinas tienen actividad a concentraciones que oscilan entre 0.1-25 μ M (Fernandez,2015) y dicha concentración esta en relación con la susceptibilidad del microorganismo ; un ejemplo es la actividad analizada en diferentes microorganismos para la defensina StPTH1 de *Solanum tuberosum*, en la cual se reporta que para varias bacterias analizadas, presenta una EC50 de 7 μ M, pero para *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* y *Ralstonia*

solanacearum tiene una concentración de 25µM para y en hongos como *Fusarium solani* de 0.2µM, *Botrytis cinerea* 1µM, para *Colletotrichum graminicola* 2µM, *Bipolaris maydis* y *Plectosphaerella cucumerina* 10µM (Berrocal-Lobo et al.,2002). A su vez, se ha trabajado en la producción de defensinas recombinantes por el ejemplo se realizó un cambio de aminoácidos de RDDFR por RGFRRR en una defensina de *Medicago sativa* denominada MsDef1 para aumentar su carga positiva la cual se nombró como MsDef1-γ4, ambas defensinas se cuentan con actividad antifúngica contra el hongo *F. graminearum*; pero MsDef1 tiene una inhibición de crecimiento de 26±12% mientras que MsDef1-γ4 tiene un 59±12%, ambas a una concentración de 1.5µM (Sagaram et al.,2011). Se han reportado alrededor de 100 defensinas en plantas como el trigo, la cebada tabaco, rábano, mostaza, arabidopsis, papa, sorgo, soja, espinacas, frijol, entre otros (Tam et al., 2015); en la **Tabla 2** se muestra una lista de diferentes familias de defensinas de plantas en donde se aislaron uno o más péptidos correspondientes a las defensinas.

Familia	Planta	Defensina	Numero de residuos de aminoácidos/Da	Cisteínas/puentes disulfuro	Tejido donde se encuentra	Actividad
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	So-D2	52/5803.73	8/4	hoja	Antifúngica, inhibidor de bacterias Gram-
<i>Arecoidaea</i>	<i>Elaeis guineensis</i>	EDGA1	47/5317.07	8/4	inflorescencias	Epigenética
<i>Brassicaceae</i>	<i>Arabidopsis halleri</i>	Ah-PDF1.1	51/5705.59	8/4	shoot	Tolerancia a metales pesados
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At-AFP1			semilla	Antifúngica
	<i>Brassica napus</i>	Bn-AMP1			semilla	Antifúngica
	<i>Brassica rapa</i>	Br-AMP1			semilla	Antifúngica
<i>Convolvulaceae</i>	<i>Ipomea batatas</i>	SPD1		8/4	tubérculo	Antifúngica. Inhibidor de bacterias Gram+, inhibidor de proteasas
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Beta vulgaris</i>	AX1	46/5085.89	8/4	hoja	Antifúngica
<i>Curcubitaceae</i>	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	TDEF1	47/5613.57	8/4	hoja	Antifúngica
<i>Fabaceae</i>	<i>Clitoria ternatae</i>	Ct-AMP1	49/5613.27	8/4	semilla	Antifúngica
	<i>Pisum Sativum</i>	PsD1	47/5208.88	8/4	semilla	Antifúngica
	<i>Vigna unguiculata</i>	VUDEF	47/5413.06	8/4	semilla	Antifúngica, inhibidor de la α -amilasa
	<i>Vigna radiata</i>	VrD1	46/5122.09	8/4	desarrollo de la semilla	Antifúngica, insecticida, inhibidor de la síntesis de proteínas
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PBAFP			semilla	Antifúngica, mitogénica, inhibidor del efecto de la HLV transcriptasa reversa
		PvD1	47/5448.11	8/4	semilla	Antifúngica
		WCBAFP	47/5472.13	8/4	semilla	Antifúngica, inhibidor de bacterias Gram+, inhibidor de la HLV retrotranscriptasa reversa, inhibidor de la síntesis de proteínas, anticancerígenas, mitogénica
		vulgarinin			semilla	Antifúngica, anticancerígena, inhibidor de la HLV retrotranscriptasa reversa, inhibidor de la síntesis de proteínas
<i>Poaceae</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Sla1	47/5382.2	8/4	semilla	Inhibidor de la α -amilasa
	<i>Triticum aestivum</i>	TAD1	49/5529.31	8/4	corona	Antifúngica, Inhibidor de bacterias Gram-
<i>Solanaceae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	CADEF1	47/5385.11	8/4	hoja	
	<i>Nicotiana glauca</i>	NaD1	47/5304.32	8/4	flor	Antifúngica
	<i>Solanum tuberosum</i>	StSN2	66/7037.14	10/5	tubérculo	Antifúngica
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Vv-AMP1	47/5355.08	8/4	fruto B8A82:H100	Sabor dulce

Tabla 2 Defensinas en plantas. Tomado y modificado de (Oliveira et al., 2009).

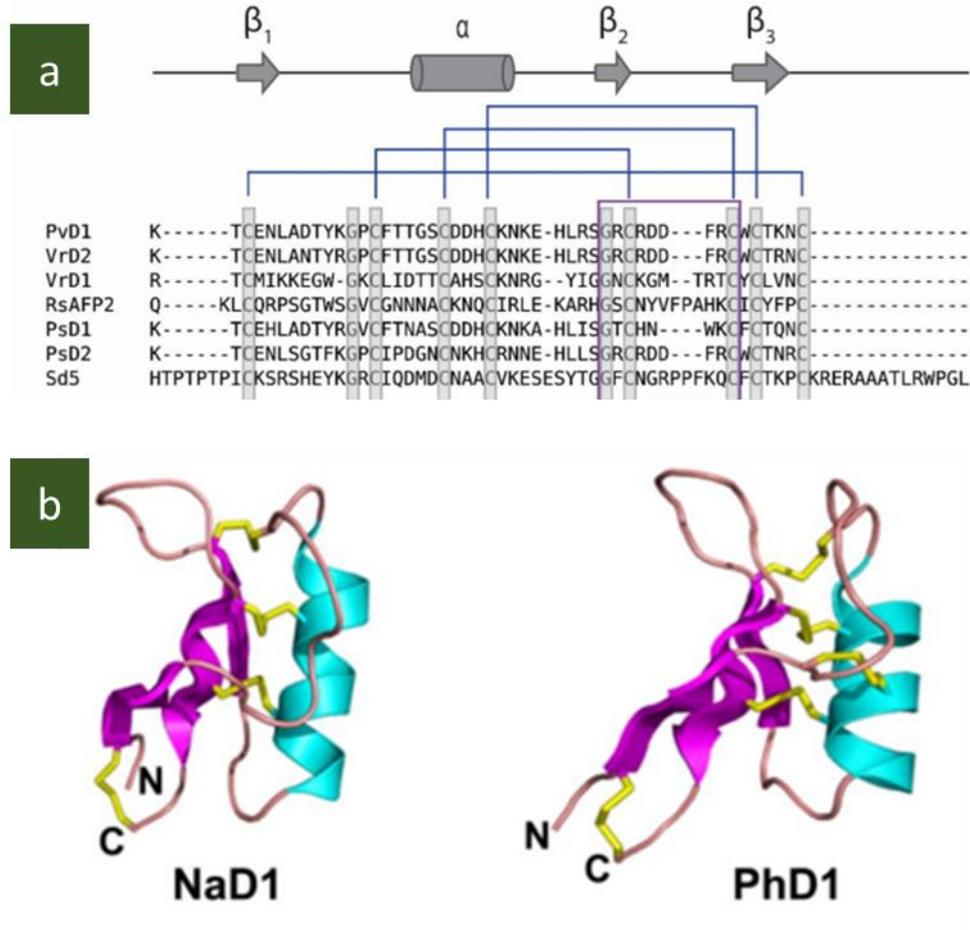


Figura 3 Imagen representativa de ejemplos de defensinas en plantas. En (a) se puede observar la estructura primaria de algunas defensinas en plantas, resaltando los residuos de cisteína y glicina conservados; los enlaces entre cisteínas para formar los puentes disulfuro y los residuos de aminoácidos encerrados en el recuadro purpura son los residuos conservados del γ -core. Imagen tomada de (Skalska et al., 2020). En la imagen (b) se muestran dos ejemplos de estructuras secundarias de defensinas en las cuales se observan la α -hélice, las tres laminas β antiparalelas y cuatro puentes disulfuro. Imagen tomada de (Tam et al., 2015).

Mecanismos de acción de defensinas en plantas

Existen dos modelos del posible mecanismo de acción en defensinas en plantas; carpet model y toroidal pore model. Ambos mecanismos son dependientes de las interacciones de las defensinas con la membrana celular que tiene una carga negativa y γ -core de las defensinas que tiene carga positiva. Brevemente, en el modelo de Carpet model el mecanismo de acción es la formación de poros debido a que los sitios hidrofóbicos de la defensina se unen a la membrana lo que permite encapsular y a su vez se secuestran partes de la membrana, lo termina con la formación de un poro. En el modelo de Toroidal pore model el AMP está unido a las cabezas de los fosfolípidos de la membrana esta interacción permite la asociación de más péptidos antimicrobianos lo que termina en la formación de un poro formado por las defensinas. En ambos mecanismos las defensinas incrementan la permeabilidad de la célula, las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species) y se activa la apoptosis (Sher et al., 2019) en la **Figura 4** se puede observar la interacción de los mecanismos con la membrana celular del microorganismo.

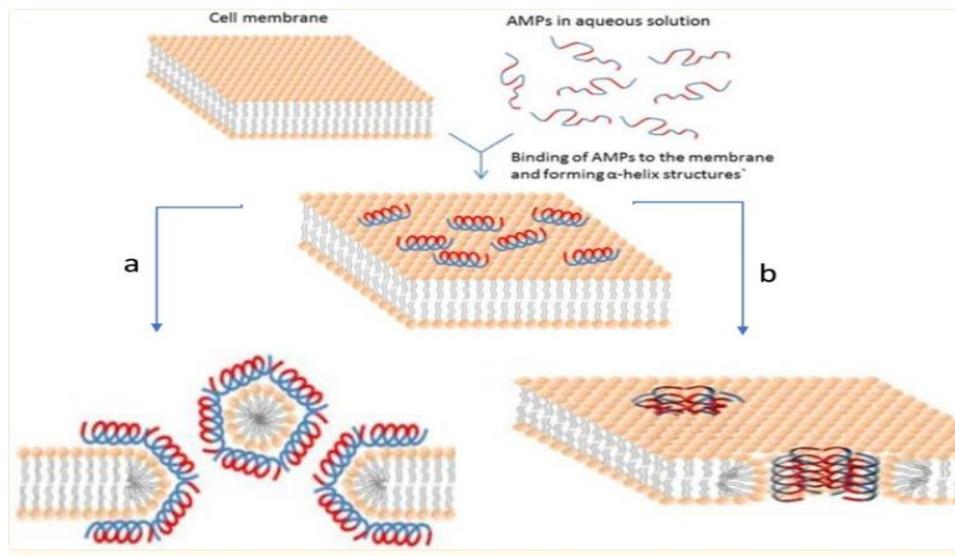


Figura 4 Mecanismos de acción de las defensinas en plantas. a) Carpet model. En este mecanismo de acción se forman poros debido a que los sitios hidrofóbicos de la defensina se unen a la membrana de manera que encapsulan una parte de la membrana y terminan formando un poro. Mientras que en el b) Toroidal pore model el AMP está unido a las cabezas de los fosfolípidos de la membrana lo cual permite la asociación de más AMPs los cuales terminan formando una estructura parecida a un poro. Imagen tomada y modificada de (Bahar y Ren, 2013).

Phaseolus vulgaris

Phaseolus vulgaris es una leguminosa que forma parte de la dieta de países latinoamericanos y del continente africano, hay estimaciones de que existen alrededor de 70 clases de frijol y se considera un alimento rico ya que contiene aminoácidos esenciales (como la isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina), carbohidratos y vitaminas como: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6 y ácido fólico, adicionalmente, cuenta con minerales como: potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), zinc (Zn), cobre (Cu) y hierro (Fe) (Sangerman-Jarquín et al.,2010; Celmeli et al.,2018). En México el cultivo de frijol forma parte de la canasta básica de la población y es uno de los cultivos más importantes del país ya que tiene una extensión de siembra aproximada de 1.69 millones de hectáreas de las cuales los estados con mayor producción son: Zacatecas, Sinaloa y Durango (Rural,2021). El frijol es una planta herbácea de la familia de las fabáceas; con tallos delgados, hojas trifoliadas, ápice acuminado y estandarte redondeado. La temperatura de crecimiento oscila de los 10 a los 27° Celsius con un pH entre 6.5-7.5 (Hanan y Mondragón,2009; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020). Es una planta capaz de realizar interacciones simbióticas con bacterias del género rhizobium, en dicha interacción se generan nuevas estructuras a nivel de la raíz conocidas como nódulos los cuales tienen la capacidad de fijar nitrógeno molecular. De manera breve, la interacción inicia a nivel de la raíz la cual constantemente se encuentra secretando compuestos del tipo flavonoide los cuales son percibidos por el rhizobium e inducen una serie de señales que culminan la síntesis y secreción de los factores nod, los cuales son percibidos por los receptores presentes en el pelo radical y en estas células desencadenan una serie de cambios físicos y bioquímicos, entre físicos tenemos que se enrosca y se atrapa al rhizobium y de manera simultánea se inicia la formación del hilo de infección por el cual el rhizobium se dirige a las células del cortex que entraron en división celular, en esta zona el hilo se ramifica e infecta a las células, las cuales continúan con la programación celular y culminan formando un nódulo fijador de nitrógeno (Tong et al.,2020).

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

En un trabajo de tesis previo, se identificó y se clono en un vector de expresión de plantas la secuencia codificante de una defensina expresada diferencialmente en el proceso de nodulación de *P. vulgaris*, los detalles de la construcción se muestran en la **Figura 5**.

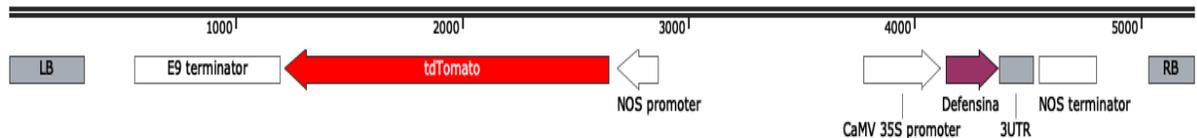


Figura 5 Mapa del T-DNA para la defensina. En la imagen se observan los bordes del T-DNA señalados como LB y RB, el casete de expresión para el gen reportero se presenta la siguiente estructura, pNOS -tdT(tandem dimer tomato) TE9, en el cual promotor NOS controla la transcripción de la secuencia codificante tdT y el terminador de la transcripción E9, el casete de expresión para la defensina tiene la siguiente estructura p35S-Defensina-TNOS, en donde la secuencia de la defensina se encuentra bajo el control del promotor constitutivo 35s y el terminador de la transcripción NOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de bioingeniería molecular y bioinformática de 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.

Protocolo de transformación de *Agrobacterium rhizogenes*

1. En un tubo Eppendorf de 1.5mL se colocaron 10µL de la construcción de la defensina (ptdTPhvul.282400) y se incubaron en hielo por 5 minutos.
2. Pasados los 5 minutos se agregaron los 10µL a las de células calcio competentes de *A. rhizogenes*(K599) e incubar en hielo por 30 minutos.
3. Después de los 30 minutos de incubación en hielo se realizó el choque térmico, sumergiendo el tubo Eppendorf en agua a 42°C por 1 minuto y transcurrido el tiempo regreso al hielo.
4. Posteriormente, agregaron 600µL de medio LB e incubaron por 1 hora en una incubadora a 30°C a 80rpm.
5. Finalmente, sembraron en una placa Petri 100 µL de la muestra y se realizó la técnica de dispersión en placa con ayuda de perlas de ebullición estériles. Se dejaron incubar a 30°C por 24hr.

Protocolo para transformación de *Phaseolus vulgaris*

Se utilizó un protocolo del instituto de biotecnología de la UNAM (Estrada et al.,2007) realizándole algunas modificaciones.

Lavado de las semillas

1. Se colocaron aproximadamente 100 semillas en un matraz y enjuagaron dos veces con 100 mL de agua estéril.
2. Después se agregaron 100 mL de hipoclorito de sodio a 20% y se agitaron por 5 minutos.
3. Pasados los 5 minutos se eliminó el hipoclorito de sodio y enjuagaron cuatro veces con agua estéril

Germinación de las semillas de frijol

1. Primero se preparó una bandeja de acero inoxidable, en la cual se colocaron unas toallas de papel en el interior de esta y se cubrió con aluminio y se llevó a la autoclave para su esterilización.
2. Después, se llevó a la campana de flujo laminar en donde se retiró el aluminio y se humedeció las toallas con agua estéril.
3. Se colocaron los frijoles con las pinzas intercalándolos entre filas.
4. Finalmente se cubrieron con el aluminio y se incubaron de 2-3 días en oscuridad con una temperatura de entre 25 y 28°C como se muestra en la **Figura 6**.

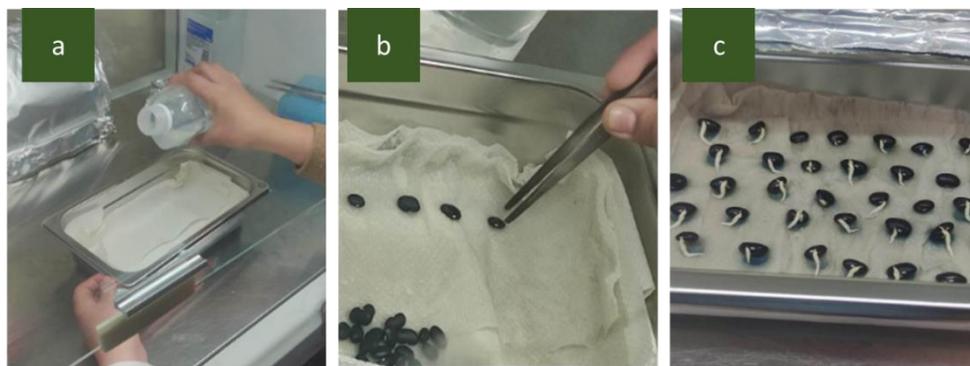


Figura 6 Representación del proceso de germinación de las semillas de *Phaseolus vulgaris*. a) Se humedecieron las toallas de papel con agua estéril; b) se acomodaron los frijoles en hileras intercaladas y se llevaron a incubar por 48 horas; c) pasado el tiempo de incubación se obtuvieron frijoles germinados.

Proceso de transformación del frijol con *A. rhizogenes* (K599)

1. Se preparó una solución nutritiva de Fahraeus(0.132 g/L CaCl₂, 0.12 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.1 g/L KH₂PO₄, 0.075 g/L Na₂HPO₄.2H₂O, 5 mg/L Fe-citrate,0.07 mg/L MnCl₂.4H₂O, CuSO₄.5H₂O, ZnCl₂, H₃BO₃,Na₂MoO₄.2H₂O, pH 7.5) autoclavadas y almacenadas a 4°C, .
2. Posteriormente, se tomaron los tubos de plástico de 15 mL y se les realizó una tapa de aluminio con dos orificios; estos tubos a su vez se colocaron dentro de los tubos de ensayo 25x200.
3. Después se vació el medio preparado en el tubo grande buscando que el medio entre en el tubo pequeño que estaba dentro y se dejó un poco de medio en el tubo grande para que la planta creara un microambiente.
4. Con la aguja de insulina se hicieron heridas en la zona más cercana a los cotiledones.
5. Después se agregó el inoculo en la zona en la que se realizó la herida.
6. Terminando la infección del frijol se pasó al tubo de 15mL colocando la raíz en uno de los orificios de la tapa de aluminio
7. Finalmente se colocó la tapa del tubo grande y se llevan a incubar hasta que se observó la formación de callo en la zona de la herida (el cual debe de desarrollarse

en los 7 días posteriores a la infección y la generación de Hairy roots se observó de 14-20 días después de la infección).

Las plantas se incubaron a temperatura ambiente con fotoperiodos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz. Se rellenó el medio cada tres días.

En la **Figura 7** se puede visualizar el proceso desde la germinación de la planta hasta el corte del sistema radicular principal,

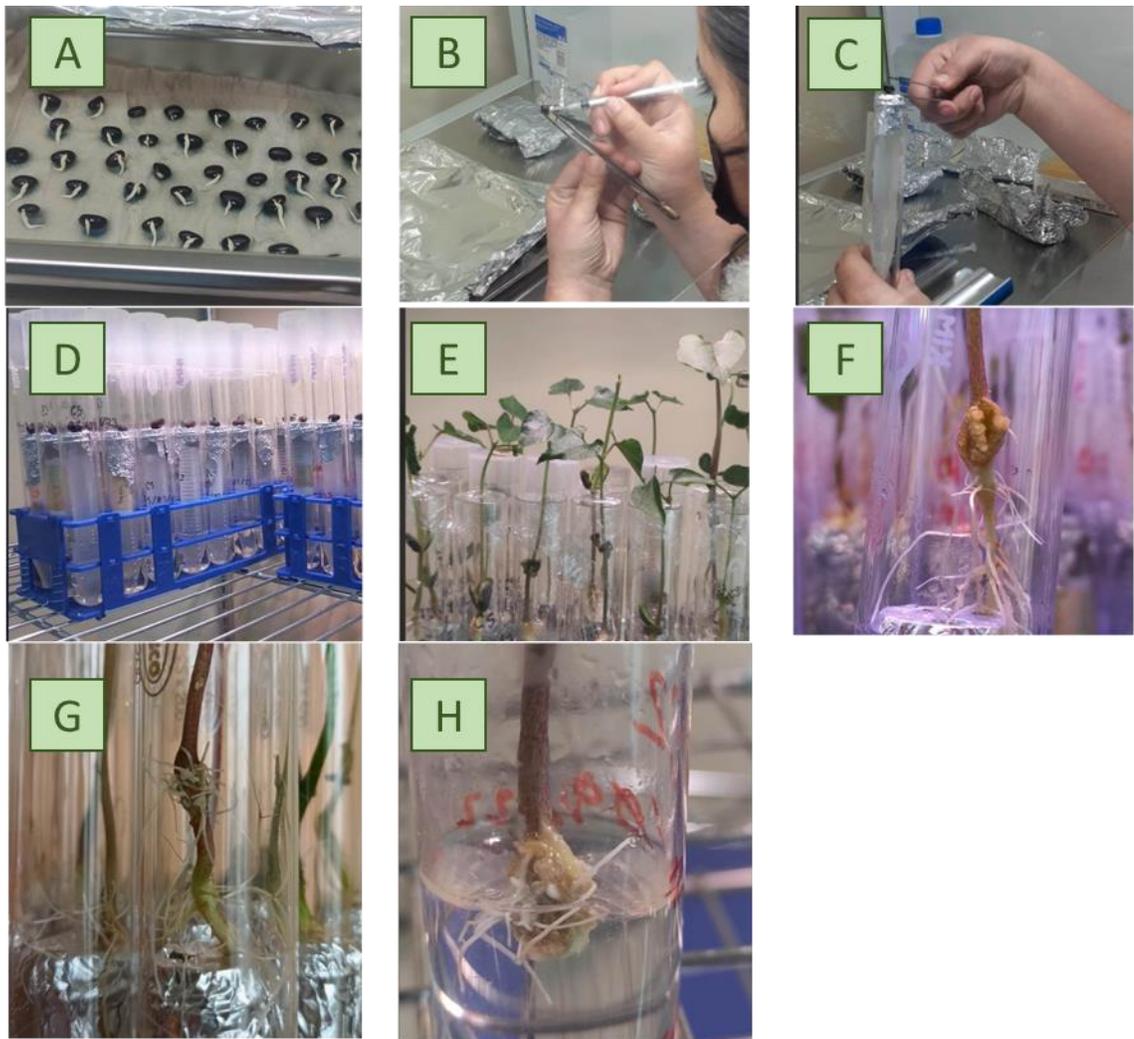


Figura 7 Proceso de transformación de *P.vulgaris* con *A. rhizogenes*. A) se observan los frijoles germinados (2-3 días); B) y C) se observa la realización de la herida y el acomodo del frijol en los tubos; D) Incubación de las plantas; E) Crecimiento de las plantas (elongación de tallos y desarrollo de hojas); F) Desarrollo de callos; G) Diferenciación de las células del callo en raíces y H) Corte de la raíz principal del frijol para inducir el crecimiento y desarrollo de las raíces transformadas

Visualización y selección de raíces transformadas por medio de un sistema fluorescencia

1. Se observaron en un estéreo microscopio acoplado a un sistema de fluorescencia para la observación de las raíces que contienen el gen reportero tdT, las cuáles presentaran una fluorescencia roja.
2. Se colocaron las “Hairy roots” en una placa con medio.
3. Se enfocó el microscopio.
4. Se observaron las raíces con el campo claro.
5. Posteriormente se apagó la luz blanca y se observó la muestra con fluorescencia. Al observar las raíces se disectaron aquellas que no cuenten con la fluorescencia roja.
6. Finalmente, la planta se regresó a medio y se llevaron a incubar para promover el desarrollo de más raíces transgénicas.

Protocolo de extracción de ADN de las raíces transgénicas de *P. vulgaris*

1. Se cortaron las raíces de la planta (previamente seleccionadas) y se pesaron en una balanza.
2. Se colocaron 500 mg de las raíces en un mortero estéril y se agregó 1mL de CTAB.
3. Se realizó la disgregación mecánica del tejido con ayuda de un mortero y pistilo.
4. El producto de la disgregación se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL estéril y se le agregó 400 μ L de una solución de cloroformo / alcohol isoamilico (24:1) la muestra se centrifugó a 10000xg por 5 minutos.
5. Después de centrifugar se formó una fase líquida (donde está el ADN y CTAB) y una fase orgánica donde se encuentran otros componentes celulares. Se tomó la fase líquida y se colocó en otro tubo Eppendorf de 1.5mL.
6. A este tubo se le agregó 600 μ L de etanol al tubo con el sobrenadante y se centrifugó a 10000xg por 5 minutos.
7. Al pasar los cinco minutos en la centrifuga se formó un pellet (ADN) en el fondo del tubo y se desechó el líquido.
8. Se realizó un último lavado del ADN etanol al 80% y se centrifugó a 10000xg por 5 minutos.
9. Después de centrifugar, se retiró el líquido y dejó secar.
10. Finalmente, se rehidrato la muestra con agua y se corrió un gel de electroforesis; para la visualización electroforética se realizó en geles de agarosa al 1%.

Detección del transgén en *P. vulgaris*

La amplificación del transgén se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó como molde el ADN genómico extraído de las raíces transgénicas de *P. vulgaris*. Se realizó la mezcla de la reacción de PCR en un volumen de 20µL con las proporciones que se muestran en la **Tabla 3**. Brevemente se utilizó la presentación de Crystal Taq Master (2x) tomando las recomendaciones del fabricante. Los datos generales de los primers utilizados se pueden observar en la **Tabla 4**. Se utilizaron los parámetros las siguientes condiciones de reacción, un periodo inicial de 2 minutos a 95°; seguido de 30 ciclos a 95°C 30 segundos, alineamiento 62° C por 20 segundos y el paso final de cada ciclo es la etapa elongación a 72°C por 30 segundos; Al finalizar la reacción las muestras se colocaron a 18°C.

Tabla 3 Mezcla de reactivos para PCR

Reactivo	Volumen (µL)
Master mix (2x)	10
Primer forward p35S	1
Primer reverse RiRNA282400	1
gDNA	1
H2O	7

Tabla 4 Características de los primers diseñados por (García, 2022) para amplificar la secuencia de interés

	Nombre	Secuencia	TM(°C)	GC(%)
Forward	p35S	GGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAAC	62	38
Reverse	RiRNA282400	GGTCACTCTAAGTCATTACATTAGAC	55	38

Protocolo PCR en colonia

Para la realización de la PCR en colonia se realiza con los mismos parámetros del protocolo previamente descrito a excepción de la adición del ADN molde. En este caso se toma la clona bacteriana directamente de una caja Petri y se coloca en la mezcla de reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de *Agrobacterium rhizogenes*

Al realizar la transformación de *Agrobacterium rhizogenes* K599 con la construcción de la defensina se obtuvieron varias colonias bacterianas las cuales fueron etiquetadas con la siguiente nomenclatura C1, C2, C3, C4, C(n). Posteriormente se les realizó PCR en colonia para verificar que contenían la construcción defensina; para esto en la **Figura 8** se observa el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% de una muestra a un voltaje de 90mV por una hora y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb Axygen™, la imagen es representativa de siete clonas analizadas. Para este corrimiento electroforético se esperaban y obtuvieron fragmentos de 431pb.

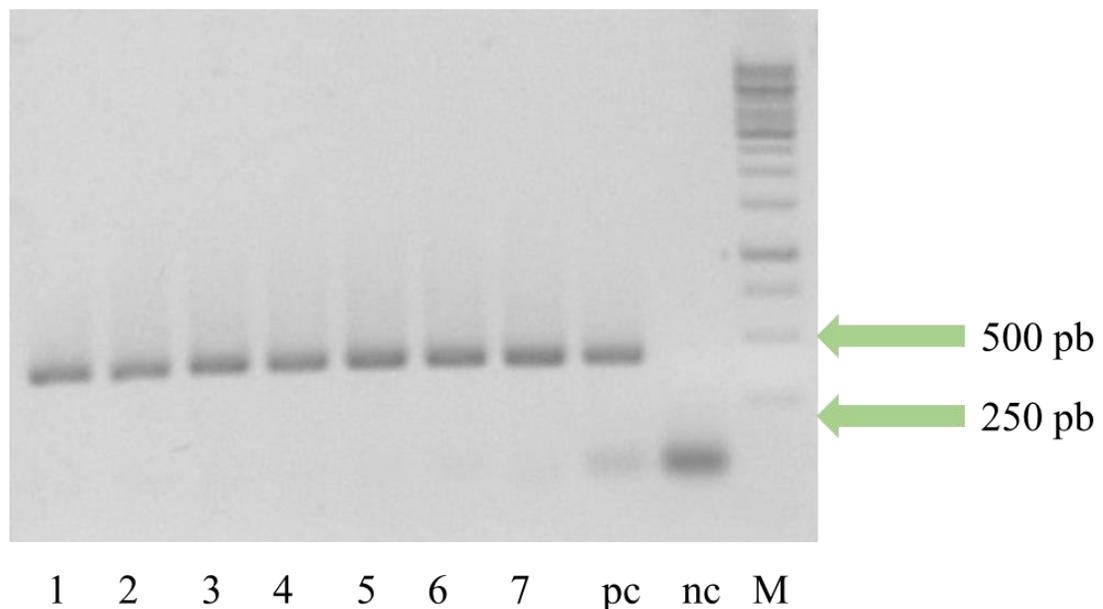


Figura 8. Corrimiento electroforético de la PCR en colonia de diversas clonas de *A. rhizogenes* que contienen la defensina. Del carril 1-7 son las muestras de diferentes colonias de *A. rhizogenes* transformadas; el carril 8 contiene el control positivo (vector purificado); el carril 9 contiene el control negativo (muestra sin molde) y el carril 10 el marcador de peso molecular. En la imagen se muestra que se obtuvieron los fragmentos del tamaño deseado, de 431pb.

Transformación de *Phaseolus vulgaris*

Germinación de semillas

En la germinación se observó una eficiencia del 80-90%. En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos en distintos experimentos.

Tabla 5 Resultados obtenidos en eficiencia de germinación de las semillas

Semillas iniciales	Semillas germinadas	Eficiencia de germinación
50	40	80%
70	62	88%
40	31	77.50%
	Promedio	81.83%

Transformación de *P. vulgaris* con *A. Rhizogenes* K599.

Para motivos de este trabajo se seleccionaron algunas clonas para probar su eficiencia de transformación en *Phaseolus vulgaris*. Las colonias de *A. rhizogenes* seleccionadas fueron C2, C3, C5, C11, C9, C15 y C17. Se observó una diferencia en los tiempos de desarrollo de las “Hairy roots” con respecto al protocolo utilizado (Estrada-Navarrete et al., 2007), cuando se utilizaron las cepas *Agrobacterium rhizogenes* con la defensina ya que en el protocolo se estiman los tiempos de generación de callo de 7 días después de la infección y del desarrollo de las “Hairy roots” en 14 días después de la infección. Dentro de los experimentos realizados se apreció que las plantas infectadas con las clonas transformadas formaron callos en periodos de 7-10 días y el desarrollo de “Hairy roots” aproximadamente a los 20 días. Las plantas infectadas con la cepa control tuvieron un comportamiento similar al descrito por (Estrada-Navarrete et al., 2007).

Se obtuvieron los siguientes resultados mostrados en la **Tabla 6**. En donde se observó que la clona con mejor eficiencia de transformación fue la clona C5, ya que en comparación con otras clonas tuvo una mejor eficiencia de transformación, por lo cual se procedió a realizar dos experimentos biológicos independientes con esta misma clona y documentar su eficiencia de transformación en eventos independientes.

Tabla 6 Análisis de la eficiencia de transformación de plantas de *P.vulgaris* con diferentes clonas con la construcción ptdTPhvul.282400

Clona	# de plantas infectadas	# plantas transformadas	% de eficiencia de transformación
c2	8	6	75
c3	12	3	25
c5	8	7	87.5
c9	8	1	12.5
c11	10	0	0
c15	8	3	37.5
c17	24	10	41.6

Dentro de la repetición de los experimentos con la clona que presento la mayor eficiencia de transformación (C5), se observaron resultados muy similares. estos resultados se muestran en la **Tabla 7**. Al realizar el promedio de los porcentajes de la eficiencia de obtuvimos una eficiencia de transformación de 87.31%.

Tabla 7 Repeticiones de los resultados obtenidos de los experimentos realizados con la clona C5

# experimento	# de plantas infectadas	# de plantas transformadas	# de eficiencia de transformación
1	8	7	87.5
2	24	21	87.5
3	23	20	86.95
		PROMEDIO	87.31666667

Visualización y selección de raíces transformadas por medio de un sistema fluorescencia

Las plantas que han generado raíces y han integrado el transgén se conocen como plantas compuestas; debido a que el transgén solo se encuentra en la zona donde se realizó la infección con *Agrobacterium rhizogenes* (Taylor et al.,2006). Para evidenciar la presencia del T-DNA las raíces se visualizaron bajo un microscopio óptico acoplado con un sistema de fluorescencia que permitió la observación de manera indirecta del evento de transformación en las raíces emergentes del callo. Las imágenes se digitalizaron y son mostradas en la **Figura 9**; en donde en la imagen de la izquierda se enfocaron dos raíces en el campo de luz clara y al observarlas con el sistema de fluorescencia se puede observar que estas mismas raíces brillan en rojo por la presencia del gen reportero tdT.

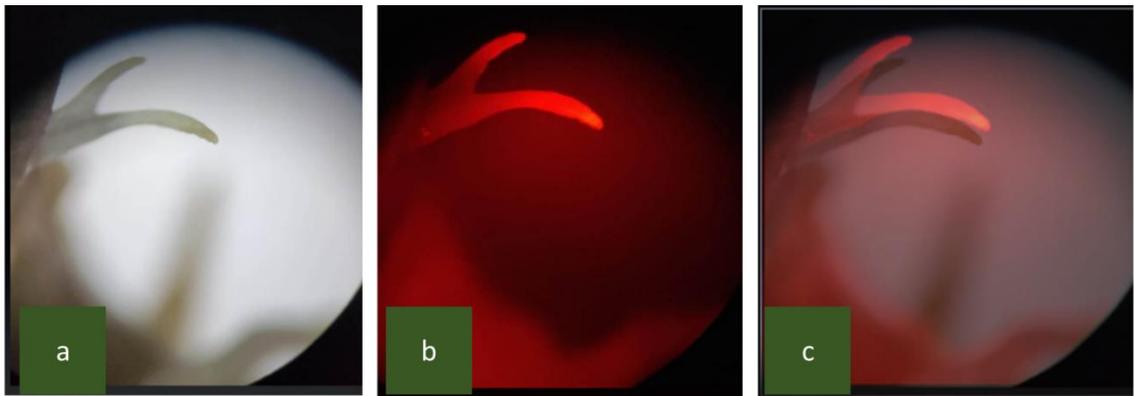


Figura 9. Visualización de raíces con luz blanca y con el sistema de fluorescencia. a) Visualización en campo claro; b) visualización en campo con fluorescencia y c) imágenes traslapadas.

Extracción de ADN de las raíces transgénicas de *P. vulgaris*

Se realizó la extracción del ADN genómico a las raíces transgénicas de cuatro plantas al azar, para comprobar que la extracción del ADN se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% los cuales fueron teñidos con GelRed Nucleic Acid Gel Stain. Los resultados son mostrados en la **Figura 10**.

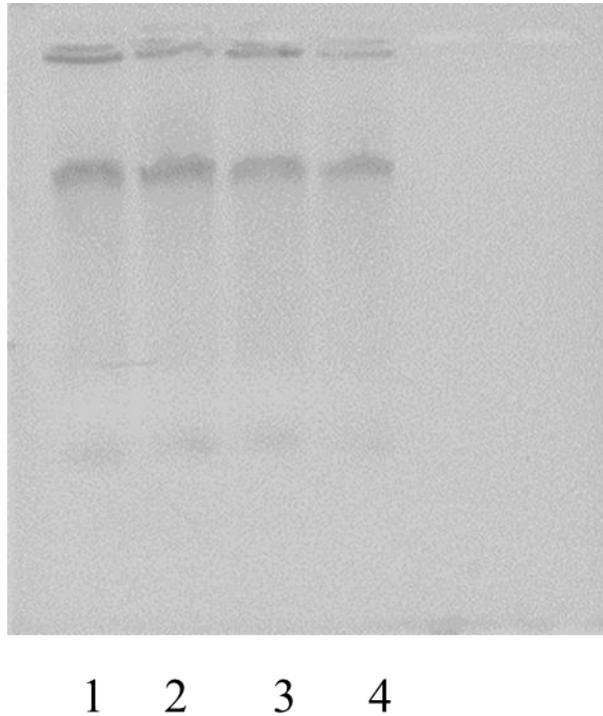


Figura 10. Electroforesis del gDNA a partir de plantas transformadas. En el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% en el cual las muestras fueron cargadas en el siguiente orden. muestra M1 en el carril 1, muestra M2 carril 2, muestra M3 en el carril 3 y muestra M4 en el carril 4.

Amplificación de la secuencia de la defensina a partir gDNA de las “Hairy roots”

Después de la obtención de las raíces transgénicas de cada repetición del experimento se realizó la extracción del gDNA de estas y posteriormente se amplificó la secuencia de la defensina utilizando la PCR con los oligos que se utilizaron para la detección de la PCR en colonia y de nuestro fragmento de interés finalmente se almaceno la muestra del gDNA

de cada experimento en refrigeración. Al obtener los resultados se realizó una última PCR con todas las muestras de DNA genómico para la comparación visual de que en todos los experimentos estuvo presente el transcrito y se corrieron en un gel de agarosa al 1% de una muestra a un voltaje de 90V por una hora y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb Axygen™. El gel electroforético se muestra en la **Figura 11**.

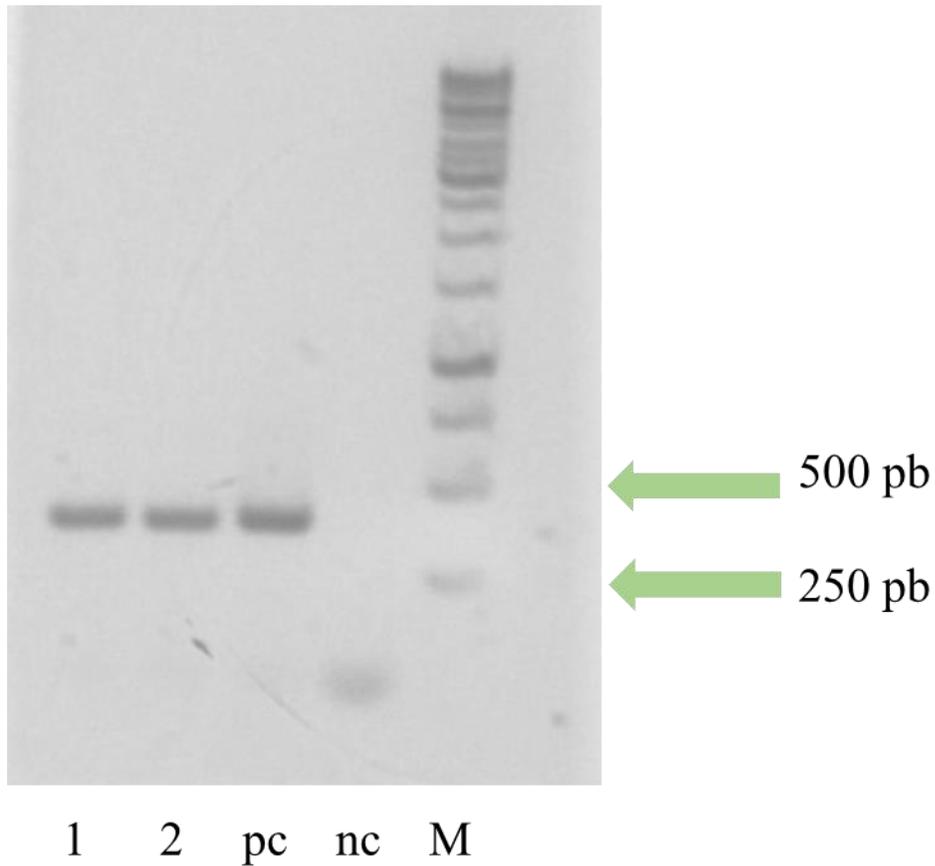


Figura 11. Corrimiento electroforético de la defensina en las repeticiones del experimento. En el carril 1 y 2 se encuentra el ADN extraído de las raíces transgénicas de dos de las repeticiones de los experimentos; en el carril 3 se encuentra el control positivo; en el carril 4 el control negativo y en el 5 el marcador de peso molecular.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599) y la selección de la mejor clona capaz de transformar a *P. vulgaris* con la construcción de la defensina (ptdTPHvul.282400); de las clonas probadas identificamos que la clona C5 fue la que presentó la mejor eficiencia de transformación.

PERSPECTIVAS.

Con la identificación de la clona que presento la mejor eficiencia de transformación es posible elucidar el papel de la defensina en la nodulación para lo cual se deben considerar posiblemente los siguientes experimentos:

1. Nodulación. Este experimento consistiría en el pase de la planta a vermiculita cuando está ya cuenta con las raíces transgénicas y posteriormente inocular con *Rhizobium* para observar si se potencia la nodulación o si se inhibe.
2. Detección si el péptido se encuentra en la raíz o si es excretado al medio de cultivo. Para esto se puede hacer una prueba de inhibición de crecimiento colocando una gota del medio de cultivo en una caja Petri con medio Luria y después inoculando con una bacteria como *E. coli*.
3. Efecto bactericida y fungicida. Este experimento consistiría en la obtención de un extracto de las raíces transgénicas para posteriormente hacer una prueba de inhibición de crecimiento en cajas Petri con bacterias como *E. coli* u hongos del género *Candida*.

LITERATURA CITADA

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

André de Oliveira Carvalho, Valdirene Moreira Gomes, Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties, *Peptides*, Volume 30, Issue 5, 2009, Pages 1007-1020, ISSN 0196-9781, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>.

Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F., & Molina, A. (2002). Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, 128(3), 951-961. <https://doi.org/10.1104/pp.010685>

Brandenburg, L.-O., Merres, J., Albrecht, L.-J., Varoga, D., & Pufe, T. (2012). Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. *Polymers*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/polym4010539>

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. (2009). Plant defensins—Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007-1020. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>

Celmeli, T., Sari, H., Canci, H., Sari, D., Adak, A., Eker, T., & Toker, C. (2018). The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties. *Agronomy*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090166>

Chen, E. H.-L., Weng, C.-W., Li, Y.-M., Wu, M.-C., Yang, C.-C., Lee, K.-T., Chen, R. P.-Y., & Cheng, C.-P. (2021). De Novo Design of Antimicrobial Peptides With a Special Charge Pattern and Their Application in Combating Plant Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.753217>

De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., & Vessoni Penna, T. C. (2009). Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3), 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>

Fernández, A. (2015). Defensinas de flores de *Silybum marianum* con potencial aplicación antimicrobiana (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

García-García J.A. (2022). Identificación y clonación de una defensina de *Phaseolus vulgaris* expresada diferencialmente en el proceso de nodulación. Ed. UAAAN (tesis de licenciatura). Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/48140>

García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., & Rodríguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47(6), 479-491. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<479::AID-BIP6>3.0.CO;2-K)

Guan, Q., Huang, S., Jin, Y., Campagne, R., Alezra, V., & Wan, Y. (2019). Recent Advances in the Exploration of Therapeutic Analogues of Gramicidin S, an Old but Still Potent Antimicrobial Peptide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(17), 7603-7617. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00156>

Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D963-D968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>

Hanan Alipi Ana María y Mondragón Pichardo Juana (2009), Malezas de Mexico, *Phaseolus vulgaris*—Ficha informativa. Recuperado 20 de marzo de 2023, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolusvulgaris/fichas/ficha.htm>

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://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.582779>

Iqbal, A., Khan, R. S., Shehryar, K., Imran, A., Ali, F., Attia, S., Shah, S., & Mii, M. (2019). Antimicrobial peptides as effective tools for enhanced disease resistance in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01668-6>

Keymanesh, K., Soltani, S., & Sardari, S. (2009). Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 933-944. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9984-7>

Kohn, E. M., Shirley, D. J., Arotzky, L., Picciano, A. M., Ridgway, Z., Urban, M. W., Carone, B. R., & Caputo, G. A. (2018). Role of Cationic Side Chains in the Antimicrobial Activity of C18G. *Molecules*, 23(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/molecules23020329>

Lay, F.T., Poon, S., McKenna, J.A. et al. The C-terminal propeptide of a plant defensin confers cytoprotective and subcellular targeting functions. *BMC Plant Biol* 14, 41 (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-41>

Lehrer, R. I., & Ganz, T. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 96-102. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X)

Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: Structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>

Liang, Y., Zhang, X., Yuan, Y., Bao, Y., & Xiong, M. (2020). Role and modulation of the secondary structure of antimicrobial peptides to improve selectivity. *Biomaterials Science*, 8(24), 6858-6866. <https://doi.org/10.1039/D0BM00801J>

Moretta A, Scieuzo C, Petrone AM, Salvia R, Manniello MD, Franco A, Lucchetti D, Vassallo A, Vogel H, Sgambato A, Falabella P. Antimicrobial Peptides: A New Hope in Biomedical and Pharmaceutical Fields. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jun

14;11:668632. doi: 10.3389/fcimb.2021.668632. PMID: 34195099; PMCID: PMC8238046.

Odintsova, T. I., Slezina, M. P., & Istomina, E. A. (2020). Defensins of Grasses: A Systematic Review. *Biomolecules*, 10(7), 1029. <https://doi.org/10.3390/biom10071029>

Olascoaga-Del Angel, K. S., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, M. del C., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., & Castañeda-Sánchez, J. I. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta de México*, 154(6), 762. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003445>

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>

Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, 38(2), 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.020>

Parreira, P., Monteiro, C., Graça, V., Gomes, J., Maia, S., Gomes, P., Gonçalves, I. C., & Martins, M. C. L. (2019). Surface Grafted MSI-78A Antimicrobial Peptide has High Potential for Gastric Infection Management. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53918-4>

Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., and Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 536–547. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005

Rural, S. de A. y D. (s. f.). *La importancia de la producción de frijol en México*. gov.mx. Recuperado 17 de abril de 2023, de <http://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-de-la-produccion-de-frijol-en-mexico>

- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011). Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE*, 6(4), e18550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018550>
- Salgado, M. G., Demina, I. V., Maity, P. J., Nagchowdhury, A., Caputo, A., Krol, E., Loderer, C., Muth, G., Becker, A., & Pawlowski, K. (2022). Legume NCRs and nodule-specific defensins of actinorhizal plants—Do they share a common origin? *PLOS ONE*, 17(8), e0268683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268683>
- Sangerman-Jarquín, D. M., Acosta-Gallego, J. A., Schwenstesius de Rindermann, R., Damián Huato, M. Á., & Larqué Saavedra, B. S. (2010). Considerations and social importance of the bean crop in central Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(3), 363-380.
- Sauermann, R., Rothenburger, M., Graninger, W., & Joukhadar, C. (2008). Daptomycin: A Review 4 Years after First Approval. *Pharmacology*, 81(2), 79-91. <https://doi.org/10.1159/000109868>
- Schauber, J., & Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 122(2), 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.03.027>
- Rural, S. de A. y D. (s. f.). Frijol, historia y sabor. gov.mx. Recuperado 20 de marzo de 2023, de <http://www.gob.mx/agricultura/articulos/frijol-historia-y-sabor>
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from Plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
- Tong, W., Li, X., Wang, E., Cao, Y., Chen, W., Tao, S., & Wei, G. (2020). Genomic insight into the origins and evolution of symbiosis genes in *Phaseolus vulgaris* microsymbionts. *BMC Genomics*, 21, 186. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6578-0>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), Article 6870. <https://doi.org/10.1038/415389a>

