

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**  
**PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**



**Título**

Clonación y secuenciación de la malato deshidrogenasa mitocondrial PvMDH8 de  
*Phaseolus vulgaris*

**Por:**

Angel Eduardo Bernabe Gonzalez

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:  
Ingeniero en Biotecnología

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre, 2025

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**Programa Docente de Ingeniero en Biotecnología**

**TESIS TITULADA**

**Clonación y secuenciación de la malato deshidrogenasa mitocondrial PvMDH8 de  
*Phaseolus vulgaris***

**Por: Angel Eduardo Bernabe Gonzalez**

**Tesis**

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**Ingeniero en Biotecnología**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



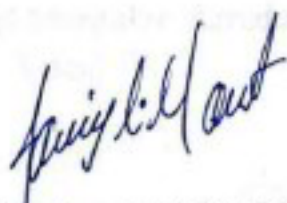
**Dr. Marco Adán Juárez Verdayes**

**Asesor principal**



**Dr. Ronal Pacheco Sanchez**

**Asesor principal externo**



**Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo**

**Coasesor**



**Dra. Mona Kassem**

**Coasesor**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**Programa Docente de Ingeniero en Biotecnología**

**TESIS TITULADA**

Clonación y secuenciación de la malato deshidrogenasa mitocondrial PvMDH8 de  
*Phaseolus vulgaris*

**PRESENTADA POR:**

Angel Eduardo Bernabe Gonzalez

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito para  
obtener el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

De acuerdo al artículo 90 del reglamento para Alumnos de Licenciatura

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes  
Presidente

Dr. Ronal Pacheco Sánchez  
Vocal

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo  
Vocal

Dra. Mona Kassem  
Vocal



MC. Sergio Sánchez Martínez  
Coordinador de la división

Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2025

## **Agradecimientos**

Nunca bastaran las palabras para poder agradecer a las personas que me ayudaron a llegar hasta aquí, Dios me ha bendecido y me ha creído merecedor de tener una familia tan presente, dispuesta, amorosa, unida, entregada y capaz; unos padres excepcionales, que desde que me dieron la vida lo han dado todo por mí, que no me ha faltado nada, que cada necesidad en mi vida la han resuelto, que siempre han buscado lo mejor, que nunca han dejado de trabajar y esforzarse para darme todo en esta vida, demostrándome que no hay nada demasiado grande, nada que no se pueda superar, nada a lo que no pueda anteponerme, que siempre podemos ayudarnos entre nosotros sin dejar de ayudar a los demás y que ante la adversidad la esperanza prevalece, ellos que me enseñaron y me dieron la fuerza para salir y haber logrado esto, ellos que no necesitan decir que me aman, porque cada día de mi vida me lo han demostrado; a mis dos hermanas, que amo tanto, con las que me he divertido y me dan alegría cuando lo necesito, mis amigas más cercanas, esas adolescentes con las que siempre puedo contar, que durante todo este trayecto me han inspirado a continuar y a superar mis limitantes; a toda mi familia, primos, tíos y abuelos, mi familia de sangre, mi familia política y la que se ha ganado el título de familia en el camino, todos ustedes repartidos desde el norte hasta el sur del país, les agradezco el conocimiento, la inspiración y la visión del mundo que entre todos me pudieron dar, eso ha sido una parte importante de mi camino para llegar hasta aquí; a mi asesor, el Dr. Marco, que me guió y acompañó por este camino, que me dio clases, y no solo en las aulas, si no que cada charla con él es una constante clase de la que no dejo de aprender, que me enseña ciencia, que me enseña cómo debe ser un profesor, un asesor, que me ayudó a aprender de mis errores y me compartió su conocimiento para lograr esto; a mi novia, Olivia, la mujer que tanto amo, quien me acompañó cada día de este proceso, que me ofreció su apoyo y amor incondicional, estando a mi lado durante todas las horas que duró este trabajo, ella que creyó plenamente en mí y nunca ha dudado de lo que soy capaz, por darme felicidad y esperanza durante todo este tiempo, y a toda su familia, que me incluyeron como uno más en su hogar y me brindaron su apoyo durante este proceso; A mis compañeros de laboratorio, que me acompañaron y ayudaron en el proceso, con los cuales aprendí a explicar, me divertí y genere una gran amistad con ellos Paty y Yael.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo quiero dedicar a mis dos hermanas, Victoria y Sofía, a ellas que les espera un gran futuro por delante, que sepan que son mucho mas capaces de lo que yo lo soy y que tienen cualidades que las llevaran muy lejos. Que puedan tomarme como ejemplo, no como ideal, no como muestra de como deben ser, de como deben estudiar o comportarse, si no como ejemplo de que pueden y deben buscar su felicidad, lo que les otorgue vida, lo que les de una razón de ser, que puedan salir de su zona segura y de comodidad para encontrar su camino, que, aunque la distancia pueda ser muy grande, el amor, la unión y la pasión que las compone, es mayor.

Que, aunque sientan inseguridad, aunque haya quienes las quieran frenar, las quieran hacer menos, aunque se sientan incapaces; que, ante todo eso, ellas puedan ver siempre su valor y sus capacidades, que sepan en su interior que son especiales, que, si no fueran capaces, Dios no las hubiera puesto ahí.

Que este trabajo, que, aunque en el gran panorama no signifique mucho, sea un mensaje para ellas de mi parte, que pueden, que han podido y que siempre podrán salir adelante, crecer, superar sus propias limitantes y encontrar la felicidad y paz en sus vidas.

Agradezco que ustedes sean mis hermanas, estaré para ayudarlas y acompañarlas durante toda su vida.

## Índice

Agradecimientos .....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas .....	VII
Resumen.....	VIII
Declaración de no plagio .....	IX
Introducción .....	1
Justificación.....	3
Objetivos particulares.....	3
Hipótesis.....	3
Revisión de la literatura .....	4
La familia Leguminosae ( <i>Fabaceae</i> ) .....	4
El género <i>Phaseolus</i> .....	4
<i>Phaseolus coccineus</i> .....	5
<i>Phaseolus acutifolius</i> .....	7
<i>Phaseolus lunatus</i> .....	8
<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	9
Producción de frijol común ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	10
Proceso de nodulación en <i>Phaseolus</i> .....	11
La mitocondria de células vegetales.....	11
Organización y estructura de las mitocondrias vegetales.....	12
Importación de las proteínas a la mitocondria .....	14
Funciones de la mitocondria vegetal.....	15
La válvula de malato suministra el sustrato a las mitocondrias de las plantas.....	16
La malato deshidrogenasa mitocondrial en plantas.....	19
Materiales y métodos .....	20
Identificación, dominios conservados y estructura génica de las proteínas MDH en los genomas de <i>Phaseolus</i> .....	20
Características fisicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de <i>Phaseolus</i> .....	20

Análisis filogenético de las proteínas MDH mitocondriales.....	21
Elementos reguladores <i>cis</i> en los promotores de MDH mitocondriales .....	21
Expresión <i>in silico</i> del gen mitocondrial PvMDH8 .....	21
Germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i> .....	21
Extracción del RNA total .....	22
Reacción de RT-PCR .....	22
Generación del vector de clonación pENTR-PvMDH8.....	23
Transformación de <i>Escherichia coli</i> (DB3.1) con el vector pENTR-PvMDH8 .....	23
Selección de las clonas por PCR en colonia .....	24
Extracción del ADN plasmídico .....	24
Resultados y Discusión.....	26
Identificación y dominios conservados de las proteínas MDH en los genomas de <i>Phaseolus</i> .	26
Características físicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de <i>Phaseolus</i> .....	29
Análisis filogenético para las MDHs .....	33
Análisis <i>in silico</i> elementos <i>cis</i> del promotor de PvMDH8 .....	35
Análisis <i>in silico</i> del perfil de expresión de PvMDH8 en raíces y nódulos .....	37
Resultado de la secuenciación de pENTR-PvMDH8.....	39
Conclusiones.....	40
Perspectivas del trabajo.....	40
Literatura citada .....	41

## Índice de figuras

Figura 1 <b>Planta de <i>Phaseolus coccineus</i></b> .....	6
<i>Figura 2 Ejemplos de visitantes florales de <i>Phaseolus coccineus</i> L</i> .....	6
Figura 3. A) Hojas, B) flor, C) semillas, D) Vainas de <i>Phaseolus acutifolius</i> .....	7
Figura 4. (A) Vainas y hojas de frijol de <i>P. lunatus</i> (B) Flor (C) Semillas y vainas de frijol de Lima (D) Variabilidad de las semillas de <i>P. lunatus</i> . Imagen tomada y modificada de (Adebo 2023).....	8
Figura 5. <b>Planta y vainas de <i>P. vulgaris</i> var. Cuarenteño</b> .....	9
Figura 6. <b>Estructura mitocondrial en plantas</b> .....	13
Figura 7. <b>Vías de importación de proteínas en las mitocondrias de plantas</b> .....	15
Figura 8. <b>Interacción de las válvulas de malato y sus conexiones entre cloroplastos y mitocondrias</b> .....	17
Figura 9. <b>El ciclo TCA de las plantas y las reacciones asociadas</b> .....	18
Figura 10 <b>Figura 9. Árbol filogenético y dominios conservados de las MDH de <i>Phaseolus</i></b> .....	28
Figura 11. <b>Alineamiento de las MDH mitocondriales de frijol, soya, tomate y algodón</b> .....	32
Figura 12. <b>Relaciones filogenéticas de las MDH en <i>Phaseolus</i>, <i>S. lycopersicum</i> y <i>G. max</i></b> .....	34
Figura 13. <b>Análisis de elementos cis en los promotores de las MDH mitocondriales de <i>P. vulgaris</i>, <i>P. coccineus</i>, <i>P. lunatus</i> y <i>P. acutifolius</i></b> .....	36
Figura 14. <b>Patrones de expresión de PvMDH8 en diversos tejidos. Los datos de transcriptoma fueron obtenidos de O'Rourke et al. (2014)</b> .....	38
Figura 15. <b>Análisis de la secuencia PvMDH8 clonada en pENTRD</b> .....	39

## Índice de tablas

Tabla 1. <b>Oligonucleótidos empleados en para la amplificación de la PvMDH8</b> .....	23
Tabla 2. <b>Características fisicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de <i>Phaseolus</i></b> .....	30

## Resumen

La malato deshidrogenasa (MDH) es una enzima evolutivamente conservada que cataliza la oxidación reversible de malato a oxaloacetato utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. En eucariotas, presenta isoformas con localización subcelular específica (mitocondria, citoplasma, cloroplasto, glioxisoma y peroxisoma) con funciones particulares. La MDH mitocondrial (MDHmt) muestra alta conservación y desempeña un papel clave en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas. En *Arabidopsis thaliana*, mutantes nulas para MDHmt exhiben crecimiento reducido y menor biomasa, mientras que en algodón la disminución de la expresión/silenciamiento de GhmMDH1 afecta el desarrollo de la raíz bajo deficiencia de fósforo. Las leguminosas, entre ellas chícharo, garbanzo y frijol, son de gran relevancia agrícola y ecológica por su capacidad de establecer simbiosis con rizobios fijadores de nitrógeno. En esta interacción se forman nódulos en las raíces donde las bacterias, reducen el nitrógeno atmosférico ( $\text{N}_2$ ) a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) por la acción del complejo enzimático nitrogenasa. El  $\text{NH}_3$  es tomado por la planta en forma de  $\text{NH}_4^+$  y de forma recíproca la planta produce malato y lo transfiere a la bacteria como principal fuente de carbono, lo que sostiene la fijación biológica de nitrógeno. El frijol es un cultivo estratégico en México por su importancia cultural y económica. En este trabajo se clonó la isoforma mitocondrial PvMDH8 con el fin de determinar su localización subcelular y explorar posteriormente su posible función durante la simbiosis. El análisis de esta enzima permitirá ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que vinculan el metabolismo energético de la planta con la fijación biológica de nitrógeno.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, mitocondria, GFP, simbiosis, clonación

## **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 (copia y pega). reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio), comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia, omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas, emplear ideas o razonamientos de un autor sin citarlo, aplicar material digital como imágenes. videos. ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



**Angel Eduardo Bernabe Gonzalez**

## Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa importante para la seguridad alimentaria a nivel mundial, constituye una fuente rica de proteínas, minerales, vitaminas y fibra en países de América Latina y África (Broughton et al. 2003). En México, el frijol es un cultivo emblemático tanto por su relevancia cultural como económica, con una producción que se extiende por múltiples estados (Matul-Ramos et al. 2024). Sin embargo, la productividad de este cultivo se enfrenta constantemente al desafío de condiciones ambientales adversas, entre las que destacan la sequía y las altas temperaturas.

Ante este escenario, la comprensión de los mecanismos moleculares que confieren tolerancia al estrés se convierte en una prioridad para los programas de fitomejoramiento. Estudios recientes en diversas especies vegetales han asociado la expresión y actividad de isoformas específicas de la enzima malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37) mitocondrial con la respuesta a estrés abiótico. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* carentes de las isoformas mMDH presentan una respiración foliar alterada y crecimiento reducido, lo que evidencia su papel esencial en metabolismo energético y fotorespiratorio (Tomaz et al. 2010).

La enzima malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37) desempeña una función crucial al catalizar la interconversión reversible de oxaloacetato y malato, utilizando NADH/NAD<sup>+</sup> como cofactor. El malato a su vez es una molécula con múltiples papeles celulares, siendo una molécula central en el metabolismo de la nutrición, adquisición de fósforo y tolerancia al aluminio, así mismo es un regulador de la homeostasis del pH, como un equivalente reductor que se transporta entre compartimentos subcelulares y como importante exudado radicular. En la fijación simbiótica del nitrógeno, el malato es el sustrato primario para la respiración bacteroide en los nódulos fijadores de nitrógeno (Schulze et al. 2002; Finkemeier y Sweetlove 2009).

En plantas existen múltiples isoformas de MDH localizadas en distintos compartimentos subcelulares. La MDH mitocondrial en plantas es particularmente importante, ya que es clave para mantener el flujo de carbono a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y para la provisión de poder reductor (NADH) hacia la cadena respiratoria mitocondrial (Baird et al. 2024). La participación de MDH (PvMDH3, PvMDH6 y PvMDH8) en respuesta al estrés salina fue descrita en *P. vulgaris* (Yıldız et al. 2022). Sin embargo, su anotación y caracterización en otras especies estrechamente relacionadas aún es limitada. Por lo tanto, el presente trabajo se centra en la anotación de las MDH en las especies *P. coccinuous*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*. Además, en la clonación y secuenciación de la secuencia codificante (CDS) de la isoforma mitocondrial PvMDH8 de *P. vulgaris*.

## **Justificación**

La anotación y caracterización de las MDH en otras especies permitirá entender las posibles relaciones evolutivas en las especies de *Phaseolus* con genomas anotados y la clonación de la mitocondrial MDH mitocondrial (PvMDH8) en el vector pENTRD permitirá los análisis posteriores como son la localización subcelular y con estos resultados, contribuir a el entendimiento de los procesos de uno de los cultivos básicos más importantes del mundo.

## **Objetivos particulares**

- Realizar la anotación de la familia de las MDH en *P. coccinuous*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*
- Realizar la amplificación de la PvMDH8 mitocondrial
- Realizar clonación y secuenciación de la PvMDH8 mitocondrial

## **Hipótesis**

Las MDH son enzimas conservadas evolutivamente en todos los organismos. La anotación de la familia de MDH en *Phaseolus coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius* permitirá identificar isoformas conservadas y divergentes en comparación con *P. vulgaris*, sugiriendo posibles adaptaciones evolutivas relacionadas. Adicionalmente, la clonación y secuenciación de la isoforma mitocondrial PvMDH8 de *P. vulgaris* facilitará estudios funcionales posteriores.

## Revisión de la literatura

### La familia Leguminosae (*Fabaceae*)

La familia *Fabaceae* es la tercera familia más grande de plantas con flores, después de *Orchidaceae* y *Asteraceae*. Contiene aproximadamente 770 géneros y unas 19,500 especies distribuidas en todo el mundo en casi todos los ecosistemas y sus miembros pueden ser árboles, arbustos, hierbas o enredaderas. Actualmente, se reconocen las seis subfamilias principales siguientes *Cercidoidea*, *Detarioideae*, *Dialioideae*, *Duparquetioideae*, *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* (*Faboideae*). Dentro de la subfamilia *Faboideae*, se encuentran especies de interés agrícola como la soya (*Glycine max*), el cacahuete (*Arachis hypogaea*), la alfalfa (*Medicago sativa*), el chícharo (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris*), entre otras (Azani et al. 2017; Nadon y Jackson 2020).

### El género *Phaseolus*

El género *Phaseolus* comprende alrededor de 89 especies, la mayoría con un origen de la región neotropical y en donde el género parece haberse diversificado en los últimos 4-6 millones de años (Ma). Sin embargo, únicamente las especies *P. coccineus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus dumosus*, *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* son domesticadas. Dentro de estas cinco especies se considera que *P. vulgaris* es la de mayor importancia económica y científica (Brilhante et al. 2025; Bitocchi et al. 2017). A continuación, se proporciona una breve descripción de las especies *P. coccineus*, *Phaseolus acutifolius*, *P. lunatus* y *P. vulgaris*.

### ***Phaseolus coccineus***

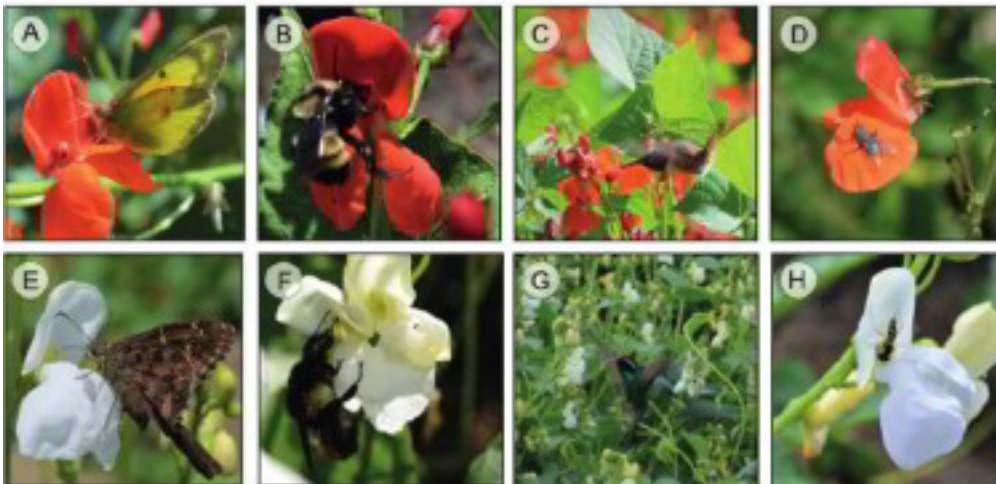
*P. coccineus* es una leguminosa cuyo centro de origen y domesticación, de acuerdo con evidencias arqueológicas, históricas y botánicas, se ubica en México, en los Altos de los estados de Puebla, Oaxaca y Chiapas (Lopez-Martinez 2020). Existen registros arqueológicos que indican que las formas silvestres de esta especie se utilizaban para consumo humano hace más de 7000 años en Ocampo, México. Su domesticación ocurrió hace aproximadamente 2000 años en Tehuacán, Puebla, México (Schwember et al. 2017). *P. coccineus* es una leguminosa trepadora de crecimiento vigoroso con raíces engrosadas y el tallo que puede alcanzar varios metros de longitud (Figura. 1). Sus hojas son trifoliadas y sus flores agrupadas en racimos largos. Se han descrito tres variedades botánicas de *P. coccineus*, var. albiflorus (flores blancas), var. coccineus (flores rojas) y var. Bicolor (flores blancas y rojas) (Figura. 2). Estas flores son atractivas para insectos polinizadores y colibríes (Arriagada et al. 2021).

*P. coccineus* es una especie de fácil adaptación a diferentes tipos de ambientes (Vargas Vázquez et al. 2018; Salinas 1988) y constituye un cultivo importante para comunidades campesinas ubicadas en zonas de cultivo marginadas en diferentes regiones de México (Vázquez et al. 2014). Las semillas de *P. coccineus* se utiliza como alimento humano tanto en estado inmaduro como seco. Esta especie tiene su principal área de cultivo en Mesoamérica (México, Guatemala, Honduras, Costa Rica) con menor extensión en Sudamérica. En Europa, su producción se localiza fundamentalmente en el Reino Unido, los Países Bajos, Italia y España (Guerra-García et al. 2017).



**Figura 1** Planta de *Phaseolus coccineus* en etapa de floración, con tallos trepadores, hojas trifoliadas, racimos florales y vainas en desarrollo.

Imagen tomada de <https://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/FullImageDisplay.aspx?documentid=40379>

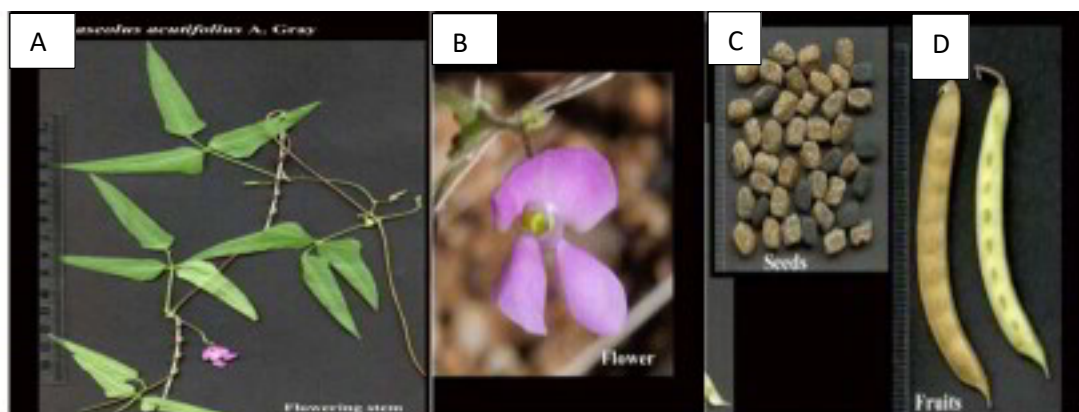


**Figura 2** Ejemplos de visitantes florales de *Phaseolus coccineus* L: A. *Colias eurytheme* Boisduval, 1852; B. *Bombus* sp. 1; C. *Selasphorus rufus* Gmelin, 1788; D. *Musca domestica* Linnaeus, 1758; E. *Urbanus dorantes* Stoll, 1790; F. *Bombus ephippiatus* Say, 181837; G. *Hylocharis leucotis* Bourcier & Mulsant, 1846; H. *Allograpta obliqua* Say, 1823. (Fotos: K. A. Cué-Hernández). Imagen toma de (Cué-Hernández et al. 2022)

### *Phaseolus acutifolius*

La principal área de distribución y probablemente de origen de *P. acutifolius* es el desierto sonorense de Norteamérica. Esta especie ha sido domesticada y producida en los estados de Jalisco y Colima hasta el suroeste de Estados Unidos, y su consumo humano es limitado y mayoritariamente local (Parker y Gepts 2024; Jiménez Galindo y Acosta Gallegos 2012; Cervantes-Jiménez et al. 2022). Hasta el momento se han descrito dos variedades botánicas, *P. acutifolius* var. *acutifolius* y *P. acutifolius* var. *tenuifolius*. Esta especie presenta atributos particulares entre los que destacan la resistencia a enfermedades, mayor tolerancia al calor, a la sequía y a la baja fertilidad del suelo. Además, presenta adaptaciones morfológicas como enraizamiento profundo, hojas pequeñas y control estomático eficiente para reducir el uso de agua (Suárez et al. 2022; Mhlaba et al. 2018).

*P. acutifolius* var. *tenuifolius*. presenta foliolos angostos de forma lanceolada. Sus inflorescencias pueden ser pequeñas con flores color crema o blancas. tallo, en el caso de *P. acutifolius* var. *acutifolius* varían de delgados y con poca capacidad de trepar (Figura 3) (Meza-Vázquez et al. 2015). Se considera que la domesticación de *P. acutifolius* ocurrió hace unos 5000 años en las regiones áridas y semiáridas del noroeste de México y el suroeste de Estados Unidos. Las evidencias arqueológicas sugieren que la domesticación temprana ocurrió en Hohokam (Nuevo México) y en Tehuacán (México central) (Mhlaba et al. 2018).



**Figura 3.** A) Hojas, B) flor, C) semillas, D) Vainas de *Phaseolus acutifolius*.

Imagen tomada de [https://aznps.com/aznps\\_species/phaseolus-acutifolius/](https://aznps.com/aznps_species/phaseolus-acutifolius/)

## *Phaseolus lunatus*

*Phaseolus lunatus* es una especie plurianual que presenta un tipo de crecimiento trepador y un mecanismo de reproducción mixto, principalmente autógamo (Andueza-Noh et al. 2016). *P. lunatus* tiene un origen neotropical con al menos dos grandes centros de diversidad, sugeridos a partir de análisis proteicos de las semillas donde se presentan semillas pequeñas, y el otro origen es el andino (principalmente Perú y Ecuador) correspondiente a formas con semillas grandes (Debouck et al. 1989).

Las plantas de *P. lunatus* presentan una morfología floral similar a la de otras especies de *Phaseolus*. Las poblaciones silvestres muestran una mayor variabilidad en el tipo de crecimiento, con períodos de floración prolongados y la producción de vainas de mayor tamaño en comparación con las formas domesticadas. Poseen raíces delgadas y tallos que pueden alcanzar hasta 2 m de longitud. Sus brotes y vainas inmaduras se consumen, aunque el cultivo se destina principalmente a la producción de semillas. Las hojas son trifoliadas, con folíolos ovados. El fruto se encuentra en una vaina generalmente aplanada, con forma de media luna, que contiene de dos a cuatro semillas (Meza-Vázquez et al. 2015; Andueza-Noh et al. 2016; Adebo 2023). Las especies silvestres y domesticadas de *P. lunatus* están ampliamente distribuidas a lo largo de la costa del Pacífico de México, la costa del Golfo de México, la Península de Yucatán y Chiapas (Figura 4) (Andueza Noh y Martínez-Castillo 2022).



**Figura 4.** (A) Vainas y hojas de frijol de *P. lunatus* (B) Flor (C) Semillas y vainas de frijol de Lima (D) Variabilidad de las semillas de *P. lunatus*. Imagen tomada y modificada de (Adebo 2023).

## *Phaseolus vulgaris*

*Phaseolus vulgaris* (frijol común) es una especie de origen en América, pero actualmente se cultiva en todos los continentes. Debido a su importancia agrícola, existen numerosos programas de investigación para la mejora genética de esta especie. Actualmente se cuenta con varios genomas secuenciados y se han desarrollado herramientas moleculares para su estudio. Se estima que existen más de 40 000 variedades de *P. vulgaris* que son cultivadas en casi todos los continentes utilizando diferentes sistemas de cultivo (Sica et al. 2021; Carrère et al. 2023). *P. vulgaris* fue domesticado de forma independiente en Mesoamérica y en los Andes hace unos 8000 años (Schmutz et al. 2014; Bitocchi et al. 2017). Es una planta anual, predominantemente autógama y con gran diversidad de hábitos de crecimiento (arbustivo, semitrepador, trepador). Todos los cultivares tienen hojas alternas, verdes o púrpuras, con tres folíolos ovales. Las flores pueden ser blancas, rosas o moradas. Las vainas varían en tamaño de 8 a 20 cm de largo y pueden ser negras, verdes, púrpuras o amarillas y en su interior las semillas con colores variados dependiendo la variedad, la vaina puede contener de cuatro a seis, semillas (Figura 5) (Ng et al. 2011; Lépiz Ildefonso et al. 2010; Vargas-Vázquez et al., 2024).



**Figura 5. Planta y vainas de *P. vulgaris* var. Cuarenteño en madurez fisiológica. Imagen tomada y modificada de (Lépiz-Ildefonso et al. 2016).**

*Phaseolus vulgaris* (frijol común), es uno de los cultivos más empleados en todo el mundo como fuente de proteína vegetal para el consumo humano. El frijol, fue uno de los alimentos principales de las culturas precolombinas en México y actualmente, es un alimento básico para la población del país. La importancia del frijol en la dieta humana radica en su alto contenido de proteína, su aporte calórico, fibra y minerales (Cruz-Cruz et al. 2021).

### **Producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)**

En el año 2020, la producción mundial de granos se estimó en 27,5 millones de toneladas, cultivadas en una superficie aproximada de 34,8 millones de hectáreas. En lo que respecta a las semillas, los registros muestran un crecimiento sostenido desde 1990 hasta la fecha, con un incremento cercano al 60% en la producción y un aumento del 36% en la superficie cultivada durante el mismo periodo. Desde una perspectiva regional, Asia es el principal productor, al contar con el 43% de la producción global. En segundo lugar, se ubican las regiones de América (Norte, Central y Sur) con un 29%, seguidos por África con un 26%. Este comportamiento de crecimiento se ha mantenido en las últimas tres décadas y puede explicarse a los avances en la mejora genética de las variedades y a la implementación de prácticas agronómicas más eficientes (Uebersax et al. 2023).

Reportes generados entre los años 1986 y 2021, referentes a la producción promedio de frijol común en México indican que se alcanzaron aproximadamente 1,11 millones de toneladas. Durante este intervalo, el consumo nacional mostró una tendencia creciente, la cual ha sido cubierta parcialmente por las importaciones (Aguilar-Lopez et al. 2024). En México, la producción agrícola se concentra principalmente en un número reducido de estados, entre los que destacan Nayarit, Estado de México, Jalisco, Veracruz y Oaxaca. Un análisis de la superficie sembrada en 2021 contabilizó más de 21 millones de hectáreas, en las que se la tendencia fue el sistema de temporal sobre el de riego. Por otra parte, los estados con mayor superficie cultivada son Jalisco, Veracruz, Tamaulipas, Oaxaca, Chiapas, Zacatecas, Michoacán y Sinaloa, de las cuales Jalisco, Veracruz y Oaxaca sobresalen tanto por su extensión agrícola como por los volúmenes de producción registrados (Sánchez Gómez et al. 2025).

## **Proceso de nodulación en *Phaseolus***

El proceso de nodulación en leguminosas es un mecanismo complejo que se inicia con un diálogo molecular entre la planta y los rizobios, y puede ocurrir principalmente a través de dos rutas de infección: la vía intracelular mediante pelos radicales y la vía intercelular conocida como “bacterial cracking nodule”. Brevemente, bajo condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno en el suelo, las raíces incrementan la exudación de flavonoides hacia la rizósfera. Estos compuestos actúan como señales quimioatrayentes que inducen en las bacterias rizobianas la síntesis y secreción de los Factores Nod (FN). La percepción de los FN por receptores específicos en la membrana de los pelos radicales activa la denominada vía de señalización simbiótica común. Esta vía coordina de manera simultánea dos procesos fundamentales: la infección bacteriana y la organogénesis del nódulo (Wilkinson et al. 2023; Mendoza-Suárez et al. 2021).

El mecanismo de infección predominante implica la formación de un hilo de infección, una estructura tubular que se desarrolla a partir de un pelo radical deformado. A través de este hilo, las bacterias son transportadas hacia el interior del cortex radical, donde son liberadas en el citoplasma de las células hospedadoras mediante un proceso similar a la endocitosis. Una vez internalizadas, los rizobios se diferencian en bacteroides funcionales, quedando envueltos por una membrana vegetal denominada membrana peribacteroidal. El conjunto formado por el bacteroide y esta membrana constituye el simbiosoma, que es la unidad funcional donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico. Este nitrógeno es posteriormente intercambiado por fuentes de carbono proporcionadas por la planta, completando así el mutualismo (Sharma et al. 2020; Lepetit y Brouquisse 2023).

## **La mitocondria de células vegetales**

Se considera que las mitocondrias se originaron por un proceso de endosimbiosis, en el cual una bacteria relacionada con las  $\alpha$ -proteobacterias fue incorporada por un huésped *arquea* del superfilo *Asgard*. Esta asociación permitió al huésped aprovechar la respiración aeróbica del endosimbionte para producir ATP de forma más eficiente. Además, el establecimiento de este organelo, la mitocondria aportó nuevas rutas bioquímicas a las células eucariotas (Van Aken 2021). Otra explicación posible para la simbiosis propone que la simbiosis original entre una  $\alpha$ -proteobacteria y una *arquea* se basó en un intercambio metabólico mutuo. Con el tiempo, la mitocondria transfirió la mayor parte de sus genes al núcleo, de modo que la mayoría de sus proteínas son actualmente codificadas por genes nucleares. Esto exige una coordinación estrecha

entre ambos genomas para asegurar un funcionamiento celular adecuado. Así, independientemente de su origen evolutivo, la comunicación mitocondrial con otros compartimentos representa una de las formas más antiguas de señalización en eucariotas (Barreto et al. 2022).

La investigación relacionada con mitocondrias vegetales inicio a partir de los años cincuenta con los primeros aislamientos en tejidos animales y vegetales. Posteriormente, varias décadas después, los estudios se centraron en caracterizar sus propiedades y en entender la respiración de las plantas mediante enfoques bioquímicos y fisiológicos, la información acumulada permitió identificar diferencias entre las mitocondrias vegetales y de mamíferos, entre ellas: (1) una mayor velocidad en la capacidad de oxidar compuestos como malato, glicina y NAD(P)H citosólica; (2) una resistencia parcial a la rotenona, atribuida a la presencia de una segunda NADH deshidrogenasa localizada en la membrana interna mitocondrial y (3) una tolerancia al cianuro, por la presencia de una oxidasa alternativa también localizada en la membrana interna mitocondrial (Møller et al. 2021).

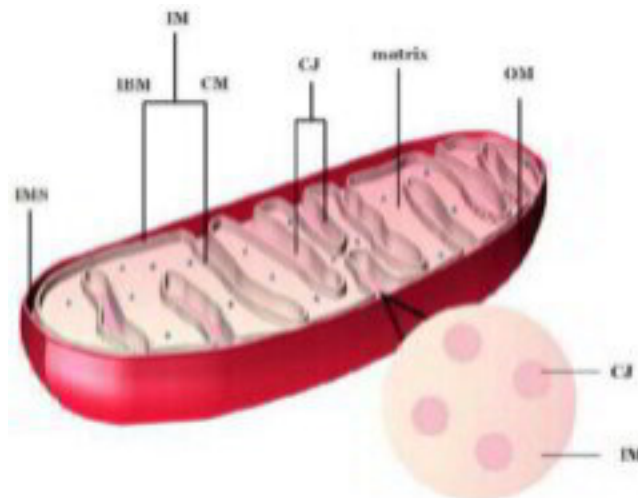
### **Organización y estructura de las mitocondrias vegetales**

En las plantas, el ADN mitocondrial (ADNmt) puede ser hasta 600 veces más grande que el de los mamíferos, aunque solo codifica un número ligeramente mayor de genes. Este genoma conserva el código genético estándar y muestra una baja tasa de mutación puntual, pero una notable capacidad recombinatoria. Dichas recombinaciones pueden originar nuevos marcos de lectura asociados a fenómenos como la esterilidad. Por otro lado, el proteoma mitocondrial vegetal es especialmente complejo. Se calcula que una sola mitocondria contiene más de 1,4 millones de proteínas, con abundancias muy variables, desde miles de copias hasta menos de una copia por organelo. Un ejemplo de proteínas muy abundantes son los canales aniónicos dependientes de voltaje y como ejemplo de proteínas poco abundantes están algunas proteínas de repetición pentatricopeptídica, fundamentales en la regulación del procesamiento, edición y traducción del ARN mitocondrial (Møller et al. 2021; Zhang et al. 2025).

Las mitocondrias vegetales son orgánulos esféricos o alargados de entre 1  $\mu\text{m}$  y 3  $\mu\text{m}$  de longitud y aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentes en cientos de copias por célula. Observaciones en células vivas, han mostrado que se pueden desplazar constantemente con el flujo citoplasmático asociado al citoesqueleto pueden fusionarse para formar estructuras reticuladas. Este dinamismo, caracterizado por procesos frecuentes de fisión y fusión, contribuye a mantener

la homogeneidad de la población mitocondrial y se encuentra regulado en parte por interacciones físicas con el retículo endoplásmico (Jaipargas et al. 2015; White et al. 2020; Logan 2006).

La estructura de las mitocondrias se caracteriza por ser orgánulos delimitados por una doble membrana son: la membrana externa, el espacio intermembranal, la membrana interna y la matriz mitocondrial. La membrana externa actúa como frontera entre la mitocondria y el citosol, mientras que la interna se divide en dos dominios con funciones específicas, la membrana limitante interna, situada paralela a la membrana externa y la membrana de las crestas mitocondriales, que se proyecta hacia la matriz mitocondrial. Esta última no constituye una simple extensión de la membrana interna, sino que se conecta a la membrana limitante interna mediante estructuras tubulares estrechas denominadas uniones de las crestas, consideradas incluso como un tercer compartimento mitocondrial. La membrana limitante interna y las crestas mitocondriales presentan diferencias tanto en su topología como en la composición de sus proteínas. La membrana limitante interna participa principalmente en el ingreso de proteínas hacia la mitocondria, mientras que las crestas mitocondriales constituyen el sitio central de la fosforilación oxidativa, al albergar los complejos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa F1Fo. Diversos estudios han evidenciado que la morfología de las uniones de las crestas está estrechamente vinculada a los procesos de fusión y fisión mitocondrial, así como a la organización de la MCP (Figura 6).

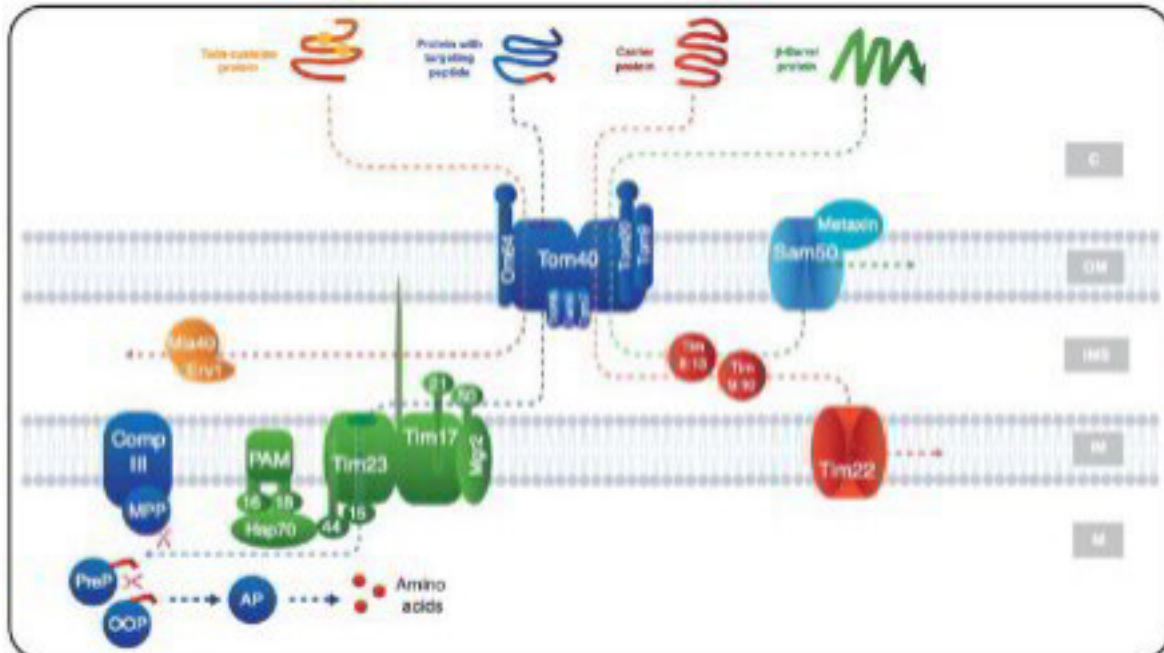


**Figura 6. Estructura mitocondrial en plantas.** IMS: espacio intermembranal; IM: membrana interna; CM: membrana de las crestas; CJ: uniones de las crestas; IBM: membrana limitante interna; OM: membrana externa. Los puntos azules en la matriz representan a ribosomas; los puntos rojos en la CM representan los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Imagen tomada y modificada de (Tang y Zhu 2023)

## **Importación de las proteínas a la mitocondria**

La mayoría de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el genoma nuclear, de modo que su síntesis ocurre en el citosol y posteriormente deben ser importadas hacia los distintos compartimentos de la mitocondria. El proceso de importación está mediado por una maquinaria especializada, compuesta por canales, receptores y transportadores localizados en las membranas externa e interna. Los complejos de translocación reconocen las señales de “direccionamiento” (secuencias de importación a las mitocondrias) y facilitan el paso de las proteínas a través de las membranas, garantizando su adecuada localización (Stojanovski et al. 2003; Ghifari y Murcha 2020).

La mitocondria de la célula vegetal presenta cuatro vías distintas de importación de preproteínas, las cuales describimos brevemente a continuación. Las proteínas que son importadas a la mitocondria utilizan al complejo TOM (complejo translocasa de la membrana externa) como la principal puerta de entrada (figura 6). La vía de importación general corresponde a preproteínas con una presecuencia escindible, que son reconocidas por el complejo TOM y posteriormente son dirigidas hacia el complejo TIM (complejo translocasa de la membrana interna), el cual se compone de las proteínas Tim17 y Tim23 (TIM17:23). En el caso de preproteínas que contienen péptidos señales internas y principalmente las destinadas a la membrana interna, la importación ocurre primero a través del complejo TOM y posteriormente a través de las proteínas pequeñas TIM (8, 9, 10 y 13) las cuales la direccionan hacia el complejo TIM22 (Figura 6). Por otro lado, las proteínas con estructura de barril- $\beta$  de la membrana externa y las proteínas con motivos de cisteína gemela del espacio intermembranal se translocan mediante dos rutas diferentes: la vía de la maquinaria de distribución y ensamblaje (SAM) y la vía de ensamblaje mitocondrial del espacio intermembranal (MIA). Adicionalmente, las proteínas destinadas al espacio intermembranal, pueden ser importadas por una ruta dependiente o independiente de la maquinaria del espacio intermembranal (Ghifari y Murcha 2020; Avendaño-Monsalve et al. 2021).



**Figura 7. Vías de importación de proteínas en las mitocondrias de plantas.** Cuatro vías principales de importación de proteínas (líneas discontinuas) para diferentes tipos de proteínas provenientes del citosol (C), Todas atraviesan el complejo translocas TOM. La vía general (azul) describe la importación de proteínas que contienen un péptido señal en el N-terminal, que utiliza el complejo translocasa de la membrana interna (TIM17:23) y el motor asociado a la translocasa de presecuencias (PAM) asociado, hacia la matriz (M). La vía de importación de transportadores (rojo) representa la importación de proteínas con péptido señal interno, en su mayoría proteínas transportadoras hacia la membrana interna, a través del canal TIM22. La vía SAM es específica para proteínas barriles-  $\beta$  dirigidas a la membrana externa (OM). Tanto la vía de transportadores como la vía SAM utilizan pequeñas TIM en la asistencia a la translocación. La vía de ensamblaje mitocondrial del espacio intermembranal (MIA) se emplea para la translocación de proteínas con pares de cisteínas hacia el espacio intermembranal (IMS). Imagen tomada de (Ghifari y Murcha 2020).

### **Funciones de la mitocondria vegetal**

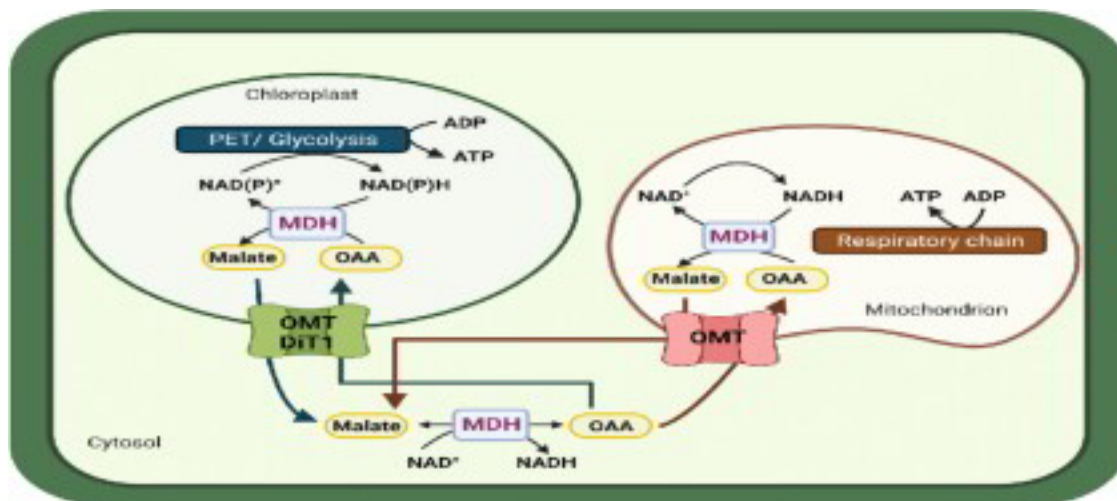
Las plantas obtienen principalmente su energía de la luz solar, captada por los cloroplastos. Sin embargo, en tejidos no fotosintéticos o en ausencia de luz, dependen fundamentalmente de la respiración mitocondrial. En este proceso, el carbono fijado se oxida para liberar  $\text{CO}_2$ , y la energía resultante se distribuye al resto de la célula. Además de esta función clásica de producción de energía, las mitocondrias vegetales desempeñan un papel central en la integración del metabolismo, coordinándose con los cloroplastos y los peroxisomas. Esta interacción es esencial para sostener procesos vitales como la fotosíntesis, la fotorrespiración y la respuesta a diferentes tipos de estrés. Un aspecto clave de esta coordinación es el transporte de poder reductor (NADPH) desde el cloroplasto hacia la mitocondria, que se realiza principalmente a través de la "válvula de

malato". Este mecanismo no solo facilita el intercambio de equivalentes reductores, sino que es fundamental para equilibrar el metabolismo energético celular, especialmente durante la interacción entre la fotosíntesis y la respiración.(Raghavendra y Padmasree 2003; Ciereszko y Kuźniak 2024; Liszka et al. 2020).

### **La válvula de malato suministra el sustrato a las mitocondrias de las plantas**

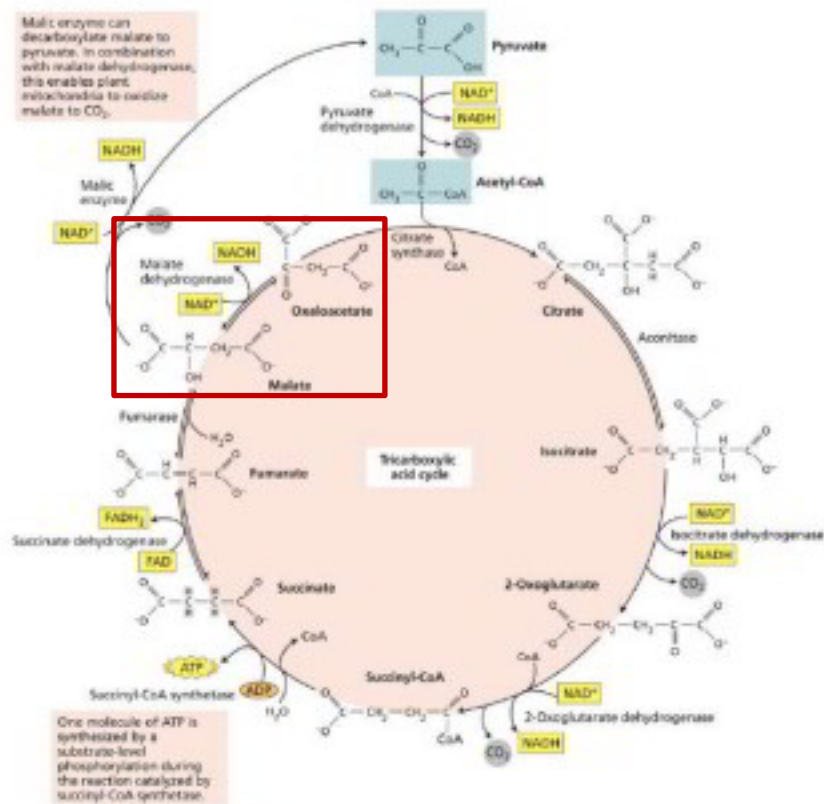
Las válvulas de malato, formadas por malato deshidrogenasas y transportadores de dicarboxilatos, son esenciales para equilibrar el metabolismo energético y la homeostasis redox en las plantas. La diversidad de isoformas de MDH en distintos compartimentos subcelulares permite a las plantas adaptarse al estrés y regular su crecimiento y desarrollo (Selinski y Scheibe 2019).

Las membranas de los cloroplastos son prácticamente impermeables a moléculas cargadas como el NADPH y el ATP, por lo que los sistemas de transporte resultan fundamentales para el intercambio de equivalentes redox y energía entre los cloroplastos y el citosol. La válvula de malato participa en el traslado de estos equivalentes redox a través de la envoltura interna del cloroplasto. El poder reductor generado en las reacciones lumínicas de los cloroplastos, como NADPH, se transfiere al citosol, a las mitocondrias y a otros compartimentos como NADH. El NADH es producido mediante las reacciones catalizadas por distintas isoformas de la malato deshidrogenasa (MDH) presentes en diversos orgánulos celulares vegetales, esta oxidación puede estar desacoplada de la producción de ATP (Figura 7) (Van Aken 2021; Selinski y Scheibe 2019).



**Figura 8. Interacción de las válvulas de malato y sus conexiones entre cloroplastos y mitocondrias.** Los nucleótidos de piridina se transportan de manera indirecta a través del malato y el oxalacetato. Los transportadores de dicarboxilatos, el transportador OAA/malato (OMT), también conocido como Dit1, en la membrana del cloroplasto, son responsables del intercambio de malato y oxalacetato (OAA). La malato deshidrogenasa dependiente de NADP (MDH) convierte el OAA en malato. Las plantas utilizan este mecanismo para aliviar el exceso de poder reductor (NAD(P)H) durante la sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones fotosintética y evitar la producción de ROS. Imagen tomada de (Medeiros et al. 2021).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos constituye el núcleo del metabolismo energético en las mitocondrias. La enzima piruvato deshidrogenasa mitocondrial cataliza la reacción irreversible que transforma el piruvato en acetil-CoA. Este, junto con oxalacetato, es utilizado por la enzima citrato sintasa para producir citrato. La aconitasa convierte el citrato en isocitrato, que luego es transformado en  $\alpha$ -cetoglutarato por la acción de la enzima isocitrato deshidrogenasa. Posteriormente, la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa convierte el  $\alpha$ -cetoglutarato en succinil-CoA en presencia de acetil-CoA y NAD<sup>+</sup>. La succinil-CoA sintetasa cataliza la formación de succinato, asociada a la producción de GTP a partir de GDP y Pi, que puede convertirse en ATP. La oxidación del succinato a fumarato es llevada a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa. Finalmente, la fumarasa transforma el fumarato en malato, y la malato deshidrogenasa convierte este último en oxalacetato, listo para combinarse con otra molécula de acetil-CoA y reiniciar el ciclo (Figura 8) (Huang et al. 2023; Møller et al. 2021).



**Figura 9. El ciclo TCA de las plantas y las reacciones asociadas.** Se muestran las reacciones y enzimas del ciclo TCA. El piruvato se oxida completamente a tres moléculas de CO<sub>2</sub>, y en combinación, la malato deshidrogenasa (cuadro rojo) y la enzima málica permiten a las mitocondrias de las plantas oxidar completamente el malato. Los electrones liberados durante estas oxidaciones se utilizan para reducir cuatro moléculas de NAD<sup>+</sup> a NADH y una molécula de FAD a FADH<sub>2</sub>. La matriz de las mitocondrias de las plantas también contiene una NADP-isocitrato deshidrogenasa imagen tomada de (Møller et al. 2021).

## **La malato deshidrogenasa mitocondrial en plantas**

La malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), como ya se había mencionado previamente es una enzima clave del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), donde cataliza la conversión reversible de malato a oxalacetato, utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. en plantas, existen varias isoformas de MDH localizadas en distintos compartimentos subcelulares, incluyendo el citosol, los peroxisomas, los cloroplastos y las mitocondrias. La isoforma mitocondrial (MDHmt) participa no solo en la regeneración del oxalacetato dentro del TCA, sino también en el intercambio de equivalentes redox entre organelos mediante la “válvula de malato”. Esta función es esencial para mantener el equilibrio energético y redox entre cloroplastos, mitocondrias y citosol, especialmente bajo condiciones cambiantes de luz o estrés (Medeiros et al. 2021).

En mitocondrias vegetales, la MDHmt desempeña un papel fundamental en la conexión entre respiración, fotorrespiración y metabolismo de carbono. Además, estudios recientes han mostrado que sus isoformas pueden diferir en su regulación redox, estabilidad y afinidad por el sustrato, lo que sugiere adaptaciones específicas al metabolismo energético de las plantas. Debido a su papel central en la bioenergética y a su conservación evolutiva, la caracterización genética y molecular de la MDHmt constituye un paso importante para comprender la organización funcional del metabolismo mitocondrial en plantas.

## **Materiales y métodos**

### **Identificación, dominios conservados y estructura génica de las proteínas MDH en los genomas de *Phaseolus***

Las posibles secuencias de la familia de proteínas malato deshidrogenasa (MDH) en las especies de *Phaseolus* se obtuvieron de la base de datos Phytozome v14 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Utilizando las secuencias previamente reportadas para *Phaseolus vulgaris* v2.1 (Yıldız et al. 2022), las cuales fueron utilizadas como referencia en búsquedas mediante BLASTP en los genomas de *Phaseolus acutifolius* WLD v2.0, *Phaseolus lunatus* v1 y *Phaseolus coccineus* v1.1. Posteriormente las secuencias de las presuntas MDH se utilizaron para realizar un análisis de los perfiles de modelos ocultos de Markov (HMM) correspondientes a los dominios MDH (PF00056 y PF02866). Estos archivos fueron obtenidos de la base de datos InterPro. Para realizar el análisis se utilizó el software TBtools (Chen et al. 2020). Posteriormente, las secuencias candidatas se validaron realizando una búsqueda de dominios conservados en las bases de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y Conserved Domain Search de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Finalmente, las figuras de la estructura génica y la distribución de dominios conservados para todas las especies analizadas fueron generadas con TBtools (Chen et al. 2020).

### **Características fisicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de *Phaseolus***

Se determinó el peso molecular (MW) y el punto isoeléctrico (pI) teórico de las MDH utilizando la herramienta Protein Parameter Calculator de TBtools (Chen et al. 2020). La localización subcelular de las MDH fue predicha utilizando la plataforma DeepLoc (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>).

## **Análisis filogenético de las proteínas MDH mitocondriales**

Con el objetivo de estudiar las relaciones evolutivas de las MDH en las especies de *Phaseolus* en comparación con otras especies, se descargaron secuencias proteicas de *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius* de la base de datos Phytozome v14 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las proteínas de las especies *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *Solanum lycopersicum* y *Glycine max*. Con las secuencias alineadas se reconstruyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) con TBtools (Chen et al. 2020), y posteriormente se visualizó con la herramienta iTOL (<https://itol.embl.de/>).

## **Elementos reguladores *cis* en los promotores de MDH mitocondriales**

Para identificar elementos reguladores *cis* en diferentes especies de *Phaseolus*, se analizaron secuencias promotoras de 2000 pb localizadas río a arriba del sitio de inicio de traducción de los genes MDH. El análisis se llevó a cabo en la base de datos PlantCARE y los resultados se representaron como un mapa de calor generado en TBtools (Chen et al. 2020).

## **Expresión *in silico* del gen mitocondrial PvMDH8**

Los perfiles de expresión del gen PvMDH8 en distintos tejidos (flores, semillas, hojas, tallos, vainas, raíces y nódulos) y etapas de desarrollo se obtuvieron del Atlas de expresión génica del Frijol Común (PvGEA) (O'Rourke et al. 2014). Los datos de expresión, en valores de RPKM, se visualizaron en mapas de calor generados con TBtools (Chen et al. 2020).

## **Germinación de semillas de *P. vulgaris***

Las semillas de frijol se lavaron con agua corriente de 3 a 5 veces, hasta eliminar completamente el polvo y otros residuos. Posteriormente, dentro de la campana de flujo laminar, se le adicionó etanol comercial durante 1 min, seguido de dos lavados con agua estéril. Después, se adicionó una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 5 min y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. La germinación se llevó a cabo en una charola estéril, colocando las semillas sobre papel absorbente humedecido con medio Fåhræus estéril, compuesto por: CaCl<sub>2</sub> (90 mM), MgSO<sub>4</sub> (58.8 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (73 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.08 mM), FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (204 mM) y

trazas Gibson:  $\text{MnSO}_4$  (120  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  (76.5 nM),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (460  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (32 nM) y  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (38.8 nM). Finalmente, las semillas se incubaron a 28 °C durante 48 horas en oscuridad. Las plántulas de dos días de germinación se usaron para la extracción de ARN total.

## **Extracción del RNA total**

Las raíces de las plántulas se pulverizaron en un mortero con Nitrógeno líquido. El macerado se colocó en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL y se agregó 1 mL de Trizol (Invitrogen); la mezcla se homogenizó mediante vórtex. Después, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y la mezcla se agitó manualmente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a  $12\,000 \times g$  durante 10 min para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de 2-propanol. La mezcla se homogenizó y se centrifugó nuevamente a  $12\,000 \times g$  durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC. Finalmente, la muestra se almacenó a -80 °C.

## **Reacción de RT-PCR**

Este procedimiento se llevó a cabo en dos etapas: (1) la síntesis de ADN complementario a partir de ARN mensajero, mediante la acción de una transcriptasa reversa y (2) la PCR de punto final con un par de oligonucleótidos específicos del transcrito de la PvMDH8. La reacción de RT se realizó en un tubo de PCR de 0.2 mL, al cual se añadieron 10  $\mu\text{L}$  (2  $\mu\text{g}$ ) de ARN total y 1  $\mu\text{L}$  (500 ng) del oligonucleótido oligo (dT) en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 8  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (5 mM), 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y 4  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 5X. La mezcla se incubó a 42 °C durante 2 min, tras lo cual se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la enzima comercial Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) y se continuó la incubación a 50 °C por 30 min. Finalmente, la mezcla se incubó a 70 °C durante 10 min para inactivar la enzima. El ADN complementario obtenido se empleó como molde para la PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30  $\mu\text{L}$ , que contenía: 15  $\mu\text{L}$  de la enzima Phusion Flash High-Fidelity (2X) (Thermo Scientific), 2  $\mu\text{L}$  de ADN complementario, 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido (FMDH8 y FMDH8, a 10  $\mu\text{M}$ ; véase Tabla 1) y 11  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Techne <sup>3</sup>prime.

## Generación del vector de clonación pENTR-PvMDH8

Para clonar el PvMDH8, se amplificó su secuencia codificante mediante PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (Tabla 1) y posteriormente se insertó en el vector de clonación pENTR-D U26. Este vector fue generado previamente en el laboratorio (trabajo no publicado) y tiene la secuencia promotora U26. El vector fue linealizado con la enzima de restricción *SwaI* en una reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L que contenía 5  $\mu$ L de tampón 10X, 1  $\mu$ L de *SwaI*, 10  $\mu$ L del vector y 34  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. La verificación de la se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Finalmente, la muestra fue purificada y eluida en un volumen de 50  $\mu$ L. Para insertar la secuencia codificadora de PvMDH8 en el vector pENTR-D U26 linealizado y el producto de PCR se mezclaron 1  $\mu$ L del inserto y 6  $\mu$ L del vector. La reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ L de la solución salina KCM y la mezcla se incubó durante 30 min en hielo. Finalmente, se llevó a cabo la transformación de *E. coli* siguiendo el protocolo previamente descrito.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en para la amplificación de la PvMDH8**

Nombre	Secuencia	Tamaño esperado (pb)
FPvMDH8	5'-CACATGATGAAGCCATCCATGCTCAG-3'	1039
RPvMDH8	5'-CTGGTTTGCAAATTTGATTCCTTCTC-3'	

## Transformación de *Escherichia coli* (DB3.1) con el vector pENTR-PvMDH8

Para clonar el gen PvMDH8 primeramente, se cultivó de *Escherichia coli* en medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido a 37 °C y 150 rpm. Su desarrollo se monitoreó mediante mediciones de densidad óptica a 550 nm. Para los cultivos sólidos se utilizó LB suplementado con 1.5 % de agar. Las concentraciones de antibióticos empleadas fueron 50  $\mu$ g/mL de espectinomicina y 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. La transformación se en células quimiocompetentes. Para ello, se agregaron 10 ng y 20 ng de producto de PCR/vector en a las células competentes y la muestra se incubó por 30 min en hielo. Luego se realizó un choque térmico a 42 °C por 30 s. Posteriormente, las células se colocaron en hielo y se les agregaron 250  $\mu$ l de medio LB y se incubaron por 1 h a

37 °C a 100 rpm. Finalmente, las células se sembraron por dispersión en placas con LB sólido con el respectivo antibiótico de selección para las colonias transformadas.

### **Selección de las clonas por PCR en colonia**

Para seleccionar colonias transformadas con el vector pENTR-PvMDH8, se realizaron PCR de colonias crecidas en placas con LB como se describió anteriormente. El procedimiento consistió en resuspender una asada de la colonia bacteriana en un volumen de 100 µL de H<sub>2</sub>O estéril en un tubo tipo Eppendorf. Posteriormente, las bacterias se lisaron mediante tres ciclos de congelación a -70 °C y ebullición a 100 °C. Del lisado obtenido se empleó 1 µL del sobrenadante como molde en una reacción de PCR de 30 µL. La mezcla de PCR contenía: 3 µL de tampón 10X, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos FPvMDH8 y RPvMDH8, 18 µL de H<sub>2</sub>O y 2 µL de la enzima recombinante Taq DNA Polymerase LC (Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo a 98 °C por 2 min; 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 55 °C por 15 s y 72 °C por 1 min y un ciclo final a 72 °C por 7 min. Como control negativo se empleó la mezcla de reacción sin templado. Posteriormente, se analizaron 10 µL de la mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con Diamond™ Nucleic Acid Dye. (Promega). Finalmente, algunas de las colonias que resultaron positivas a la transformación con el vector pENTR-PvMDH8, se recultivaron en medio LB líquido para la multiplicación extracción del plásmido.

### **Extracción del ADN plasmídico**

La extracción del plásmido pENTR-PvMDH8, se usó el kit FavorPrep™ Plasmid Extraction Kit (FAVORGEN BIOTECH CORP). El protocolo seguido fue el siguiente: un cultivo bacteriano de 5 ml se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 10 000 × g durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 250 µL de tampón FAPD1 con RNasa A. Enseguida se añadieron 250 µL de tampón FAPD2 y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 min para la lisis celular sin el uso de vórtex. Posteriormente, se incorporaron 350 µL de tampón FAPD3 para neutralizar el lisado y la muestra se centrifugó a 10 000 × g durante 10 min. El sobrenadante clarificado se transfirió a una columna FAPD colocada en un tubo de recolección y se centrifugó a 10 000 × g durante 30 segundos y se descartó la elución líquida filtrada. La columna se lavó primero con 400 µL de tampón WF y luego con 700 µL de

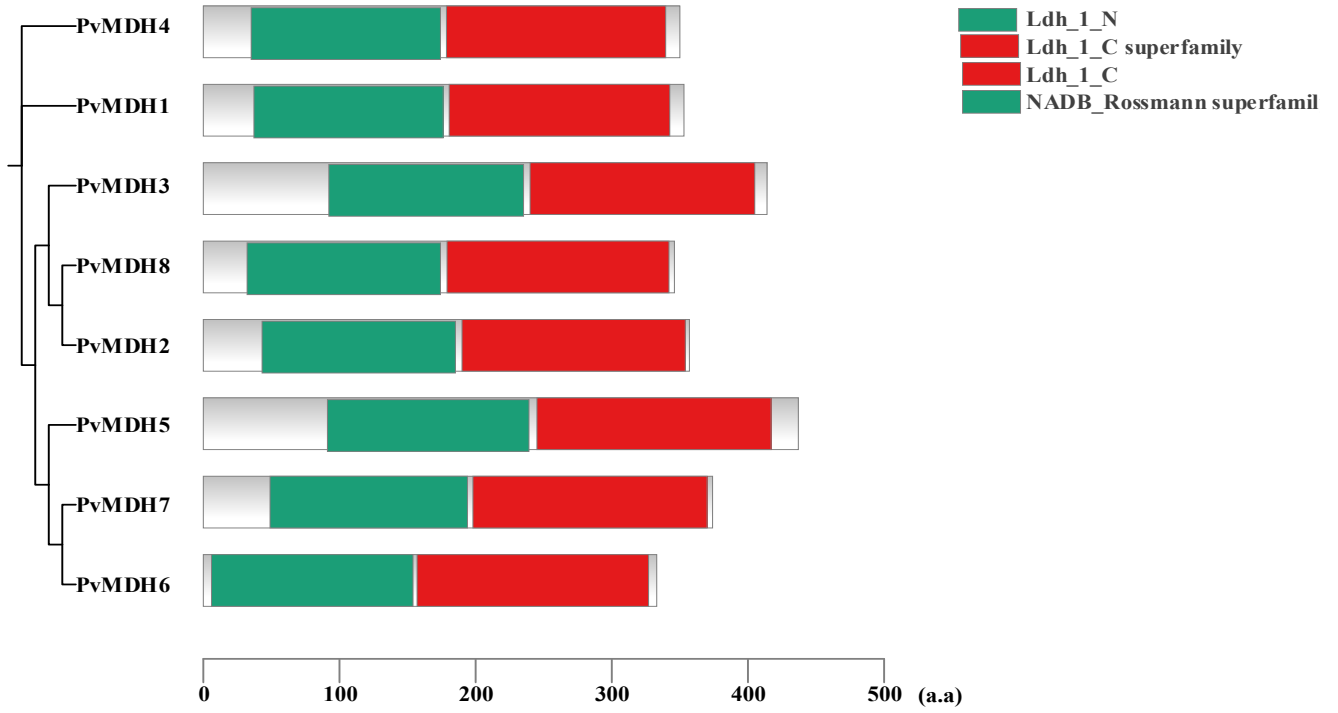
tampón de lavado. Después, se centrifugó a máxima velocidad  $10\ 000 \times g$  durante 1 min para eliminar completamente los residuos. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL y el ADN fue eluido en 100  $\mu$ L de tampón de elución. El vector fue conservado a  $-20\ ^\circ\text{C}$ .

## Resultados y Discusión

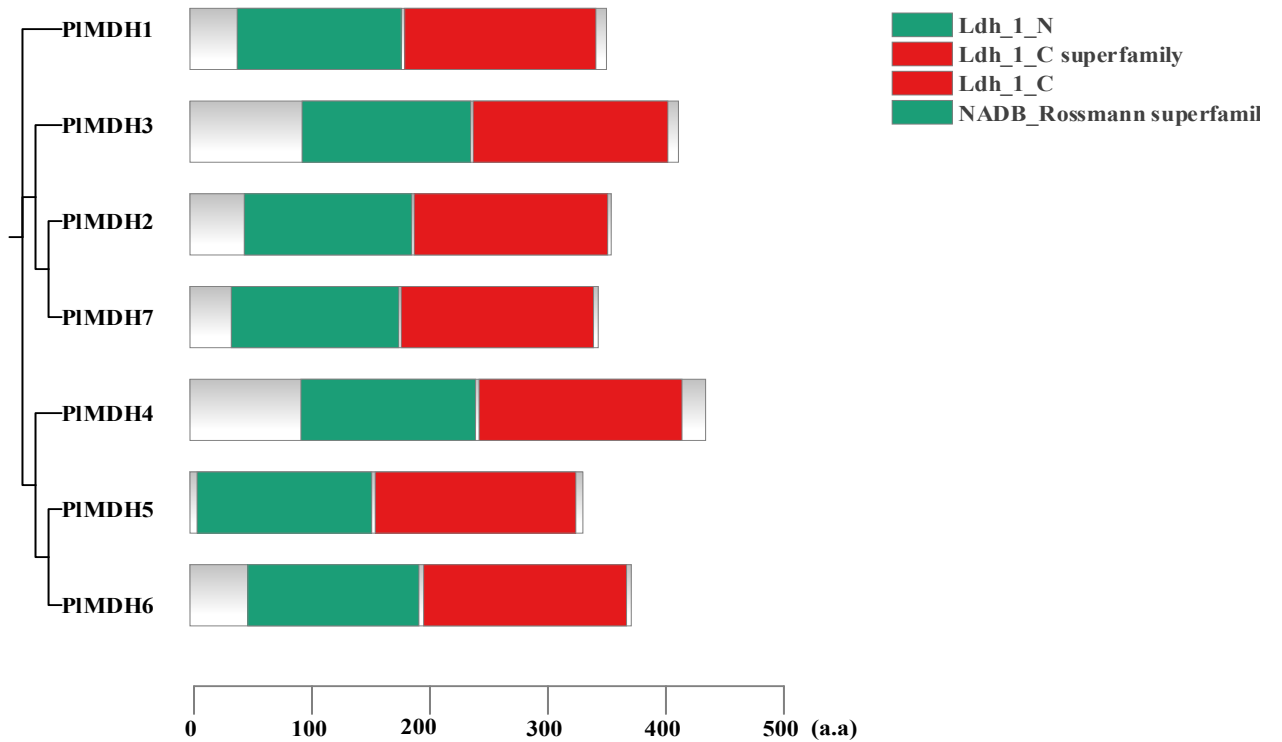
### Identificación y dominios conservados de las proteínas MDH en los genomas de *Phaseolus*

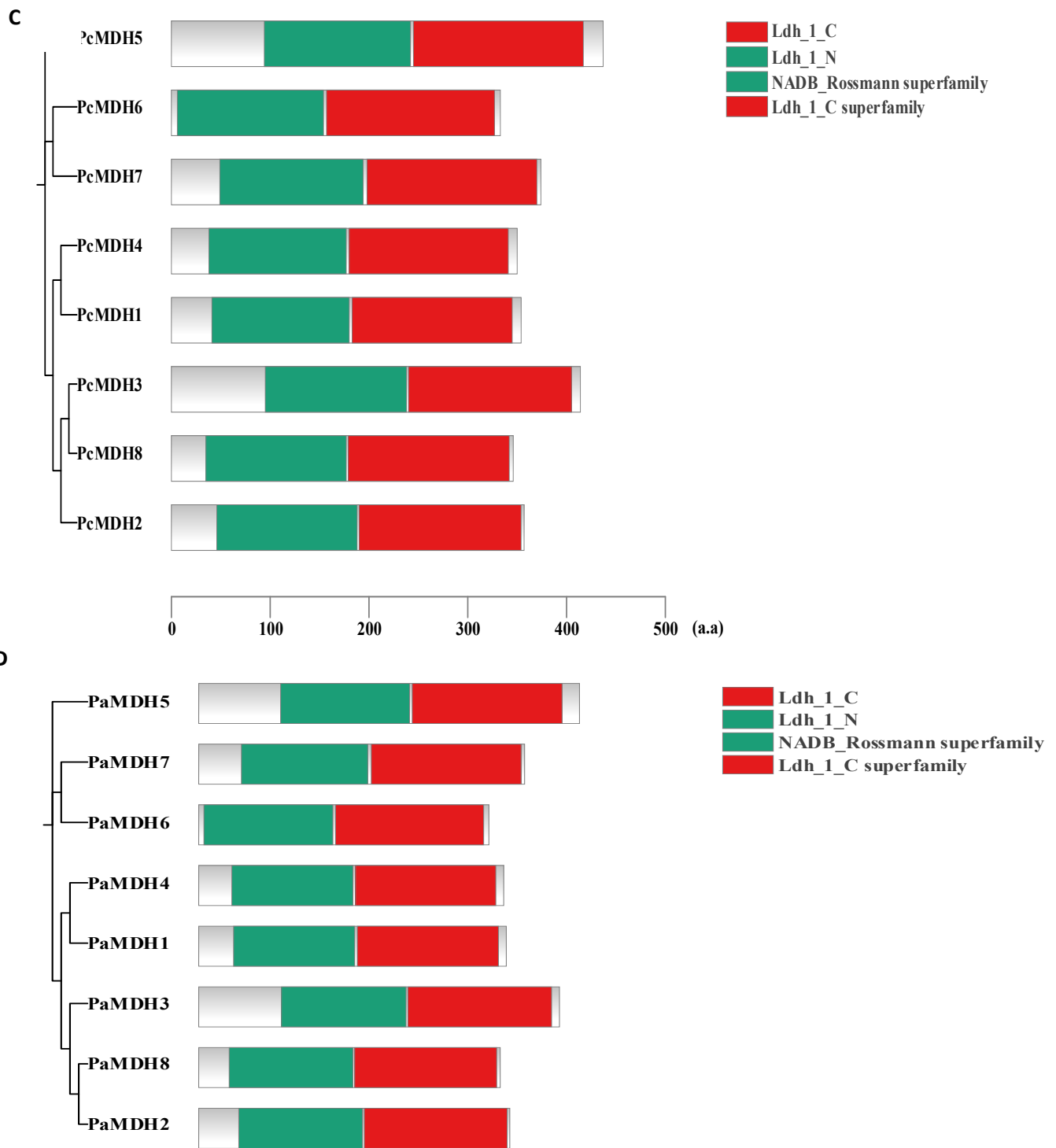
La MDH desempeña un papel fundamental en el metabolismo vegetal, catalizando la conversión reversible de malato a oxaloacetato. Reacción esencial para el crecimiento de las plantas, las respuestas al estrés abiótico y la formación de nódulos radicales (Imran et al. 2022; Schwember et al. 2019; Tomaz et al. 2010). Estudios previos han caracterizado las MDH en diversas especies vegetales como *Medicago sativa* (Miller et al., 1998), *Malus domestica* (Yao et al. 2011), *Gossypium raimondii* y *Gossypium hirsutum* (Imran et al. 2016), así como en *Phaseolus vulgaris* (Yıldız et al. 2022). La actividad enzimática de las MDH se encuentra dividida en dos dominios : un dominio N-terminal de unión a NAD y un dominio C-terminal catalítico (Hung et al. 2013). En el presente trabajo se consideraron como MDH las que presentan ambos dominios. De esta manera se identificaron de 31 MDH en las 4 especies de *Phaseolus* analizadas (Figura 9). En el genoma de *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus acutifolius*, los genes *MDH* se localizaron en ocho cromosomas, mientras que en *Phaseolus lunatus* los genes *MDH* se localizaron en siete cromosomas. Los genes fueron nombrados con base en su distribución secuencial a lo largo de los cromosomas de cada especie (Tabla 2).

A



B





**Figura 9. Árbol filogenético y dominios conservados de las MDH de *Phaseolus*.** Para cada especie: Panel A) *P. vulgaris* (PvMDH), Panel B) *P. coccineus* (PcMDH), Panel C) *P. lunatus* (PIMDH) y Panel D) *P. acutifolius* (PaMDH). Los dominios conservados de las MDH se indican de la siguiente manera: el color verde representa Ldh\_1\_N, el color rojo representa Ldh\_1\_C.

## **Características fisicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de *Phaseolus***

Las plantas poseen al menos seis isoformas de MDH localizadas en el citosol, las mitocondrias, los plastidios y los peroxisomas. Una isoforma clave, dependiente de NADP y de naturaleza dimérica, funciona en los cloroplastos convirtiendo oxaloacetato en malato mientras oxida NADPH, lo cual complementa la actividad de la MDH mitocondrial para sostener la fotosíntesis. La presencia adicional de isoformas gloxisomales/peroxisomales resalta la amplia expansión evolutiva de la familia MDH a lo largo de las especies vegetales (Baird et al. 2024; Wolyniak et al. 2024).

Las características biofísicas de las proteínas MDH en *Phaseolus* se resumen en la Tabla 2. La longitud de aminoácidos de las proteínas MDH varió entre especies, con un rango de 332 residuos (PvMDH7, PcMDH6 y PIMDH5) hasta 436 residuos (PvMDH5, PcMDH5, PIMDH5 y PaMDH5). Los valores de punto isoeléctrico (pI) oscilaron entre 5.5 (PvMDH7) y 8.7 (PvMDH8, PIMDH8 y PaMDH8), observándose que el 58% de las proteínas (18/31) presentaron valores de pI superiores a 7, lo que indica una predominancia de aminoácidos básicos en la mayoría de las isoformas.

El índice de inestabilidad se encontró en un rango de 22.32 (PcMDH2) a 39.56 (PcMDH8), lo que sugiere diferencias en la estabilidad relativa entre los miembros de la familia véase Tabla 2. Las predicciones de localización subcelular revelaron una distribución específica por compartimentos: 12 isoformas fueron predichas en el citoplasma, 8 en plastidios 4 en mitocondrias, 3 en peroxisomas y 4 en el retículo endoplásmico.

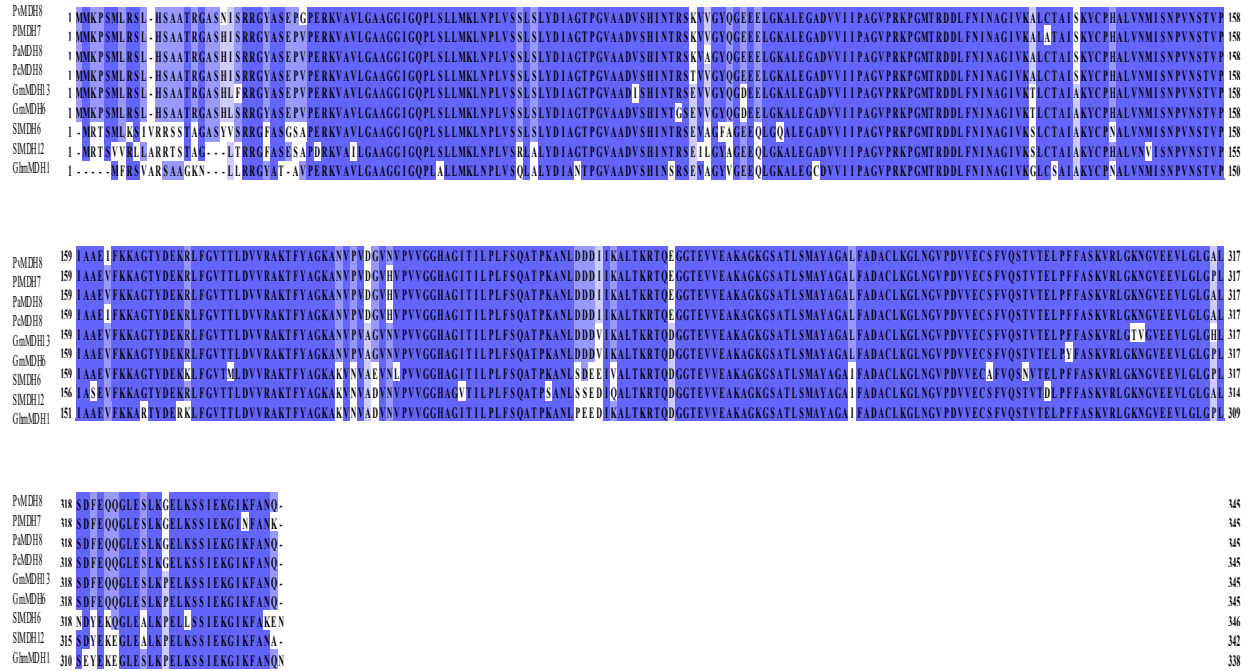
Los análisis biofísicos también respaldaron la existencia de una diversificación funcional, con valores de índice alifático que oscilaron entre 91.49 (PIMDH4) y 109.23 (PaMDH4), y valores de GRAVY que variaron entre  $-0.165$  (PaMDH5) y  $0.152$  (PIMDH2) Tabla 2. Estas diferencias en la hidrofobicidad probablemente influyen en la localización subcelular y en las interacciones proteína-proteína, aportando evidencia adicional de la especialización funcional dentro de la familia MDH en *Phaseolus*.

**Tabla 2. Características fisicoquímicas de las proteínas MDH en las especies de *Phaseolus***

Sequence (NID)	a.a	pI	Instability Index	Aliphatic Index	GRAVY	Cellular localization Deep loc
Phvul.002G062000 (PvMDH1)	352	6.6	35.04	105.77	0.058	Cytoplasm
Phvul.002G216800 (PvMDH2)	356	7.6	23.24	101.12	0.117	Cytoplasm
Phvul.003G189700 (PvMDH3)	413	8.6	38.66	95.93	0.064	Plastid
Phvul.003G219400 (PvMDH4)	349	6.5	33.32	108.94	0.072	Cytoplasm
Phvul.007G140600 (PvMDH5)	436	6.4	32.09	91.95	-0.138	Plastid
Phvul.007G273500 (PvMDH6)	373	5.7	26.74	101.96	0.051	Cytoplasm
Phvul.010G055700 (PvMDH7)	332	5.5	30.51	97.23	0.08	Endoplasmic reticulum
Phvul.011G159000 (PvMDH8)	345	8.7	38.19	96.41	0.074	<b>Mitochondrion</b>
Phcoc.02G061000 (PcMDH1)	353	6.4	35.93	106.57	0.072	Cytoplasm
Phcoc.02G212100 (PcMDH2)	356	8.1	22.32	101.4	0.133	Peroxisome
Phcoc.03G183400 (PcMDH3)	413	8.4	37.58	95.93	0.065	Plastid
Phcoc.03G214500 (PcMDH4)	349	6.5	33.35	108.4	0.066	Cytoplasm
Phcoc.07G144400 (PcMDH5)	436	6.7	31.58	91.95	-0.139	Plastid
Phcoc.07G274200 (PcMDH6)	332	5.9	29.76	97.23	0.079	Cytoplasm
Phcoc.10G052000 (PcMDH7)	373	5.7	26.97	102.23	0.05	Endoplasmic reticulum
Phcoc.11G160200 (PcMDH8)	345	8.5	39.56	97.25	0.098	<b>Mitochondrion</b>
PI02G0000133900 (PIMDH1)	352	6.2	35.74	105.77	0.06	Cytoplasm
PI02G0000345900 (PIMDH2)	356	8.2	23.34	102.22	0.152	Peroxisome
PI03G0000262100 (PIMDH3)	413	8.6	35.8	97.82	0.076	Plastid
PI07G0000239300 (PIMDH4)	436	6.7	30.21	91.49	-0.142	Plastid
PI07G0000399100 (PIMDH5)	332	6.1	30.83	97.23	0.083	Cytoplasm
PI10G0000005100 (PIMDH6)	373	5.7	26.22	104.05	0.082	Endoplasmic reticulum
PI11G0000336000 (PIMDH7)	345	8.7	38.77	96.96	0.076	<b>Mitochondrion</b>
Phacu.WLD.002G063800 (PaMDH1)	352	6.2	36.85	105.48	0.056	Cytoplasm
Phacu.WLD.002G246000 (PaMDH2)	356	7.6	23.49	102.22	0.142	Peroxisome
Phacu.WLD.003G218100 (PaMDH3)	413	8.4	38.09	95.93	0.055	Plastid
Phacu.WLD.003G251300 (PaMDH4)	349	6.5	33.54	109.23	0.07	Cytoplasm
Phacu.WLD.007G168800 (PaMDH5)	436	7.5	30.7	91.72	-0.165	Plastid
Phacu.WLD.007G318100 (PaMDH6)	373	5.7	26.46	102.49	0.057	Cytoplasm
Phacu.WLD.010G051800 (PaMDH7)	332	5.9	29.79	97.23	0.091	Endoplasmic reticulum
Phacu.WLD.011G197700 (PaMDH8)	345	8.7	39	96.41	0.081	<b>Mitochondrion</b>

Análisis funcionales en *Arabidopsis* han confirmado la compartimentación de las isoformas de MDH en variantes peroxisómicas, plastídicas y cloroplásticas (Hebbelmann et al. 2012; Pracharoenwattana et al. 2007; Selinski et al. 2014). En soya, utilizando fusiones traduccionales con GFP, se localizaron a 6 isoformas de GmMDH, GmMDH3, 8, 9 y 14 en el citosol; GmMDH2 en los cloroplastos y GmMDH6 en las mitocondrias (Zhou et al., 2024). De manera similar, la isoforma mitocondrial de *Gossypium hirsutum*, GhmMDH1, ha sido validado experimentalmente (Wang et al., 2015). En conjunto, estos hallazgos demuestran que las isoformas de MDH ocupan nichos subcelulares especializados, lo cual refleja roles metabólicos divergentes entre los distintos orgánulos.

Las proteínas que tienen un destino mitocondrial son importadas de manera postraduccional desde el citosol y evitan el tráfico cotraduccional a través del retículo endoplásmico. Esta importación está mediada por péptidos señal, los cuales presentan variabilidad en su secuencia, según las predicciones estructurales o ensayos experimentales (Abe et al. 2024). En especies de *Phaseolus*, se predijo que cuatro secuencias de MDH mitocondriales contienen péptidos señal. La alineación con ortólogos de *S. lycopersicum* y con secuencias validadas experimentalmente de *G. hirsutum* y *G. max* confirmó la presencia de un posible péptido señal mitocondrial funcional en PvMDH8 (Figura 10).

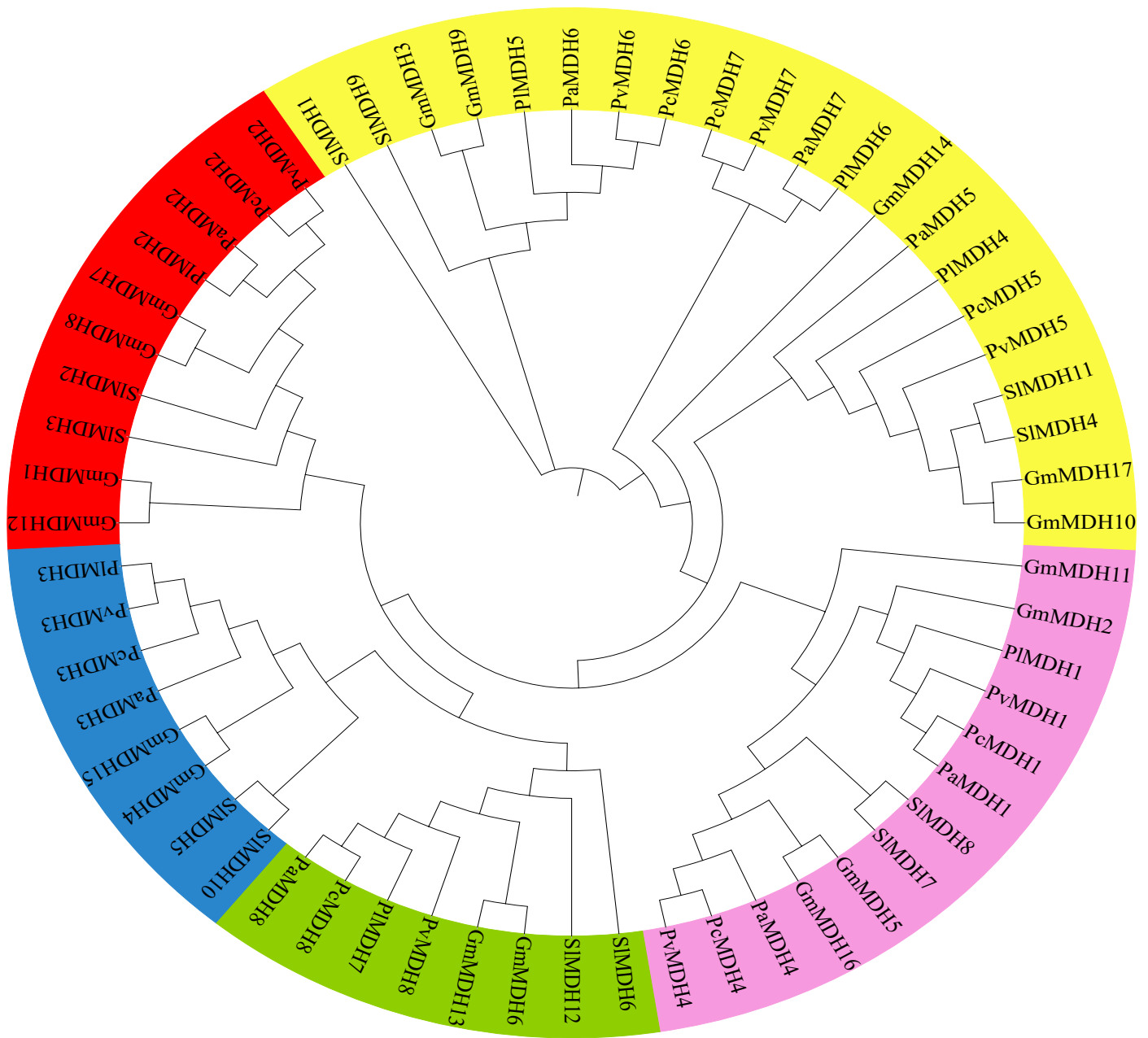


**Figura 11. Alineamiento de las MDH mitocondriales de frijol, soja, tomate y algodón.** Los aminoácidos conservados son mostrados en violeta (violeta oscuro= conservado, violeta claro= baja conservación). El putativo péptido señal es señalado con una línea negra solida arriba de las secuencias.

## **Análisis filogenético para las MDHs**

El análisis filogenético permitió agrupar a las MDH identificadas en las especies de *Phaseolus* dentro de cinco clados, lo que coincide con la clasificación previamente establecida para las MDH en *S. lycopersicum* y *Glycine max* (Figura 11) (Imran et al. 2022; Zhou et al. 2024). La formación de estos clados refleja un patrón de conservación evolutiva entre las diferentes isoformas de MDH, lo cual indica que dichas proteínas comparten un origen común y han mantenido funciones esenciales a lo largo de la diversificación de las especies vegetales. El agrupamiento conservado en *Phaseolus* respalda la estrecha relación evolutiva de sus enzimas MDH con las ortólogas presentes en otras plantas. Esto lo que sugiere que, a pesar de los eventos de duplicación génica y de la diversificación entre especies, las MDH han conservado sus dominios estructurales y en consecuencia, sus funciones catalíticas. Este patrón también sugiere la existencia de presiones selectivas que habrían favorecido la retención de funciones específicas relacionadas con el metabolismo energético, la respuesta al estrés abiótico y el desarrollo de órganos especializados como los nódulos radicales.

De igual forma, la distribución en clados diferenciados proporciona un marco de referencia para inferir posibles relaciones de ortólogas y parálogas entre los genes *MDH* de *Phaseolus* y de otras especies vegetales. Esto es relevante para futuros estudios de caracterización funcional, ya que, permite identificar qué genes presentan una mayor probabilidad de estar implicados en procesos metabólicos conservados y cuáles podrían haber adquirido funciones divergentes a lo largo de la evolución (Baird et al. 2024).

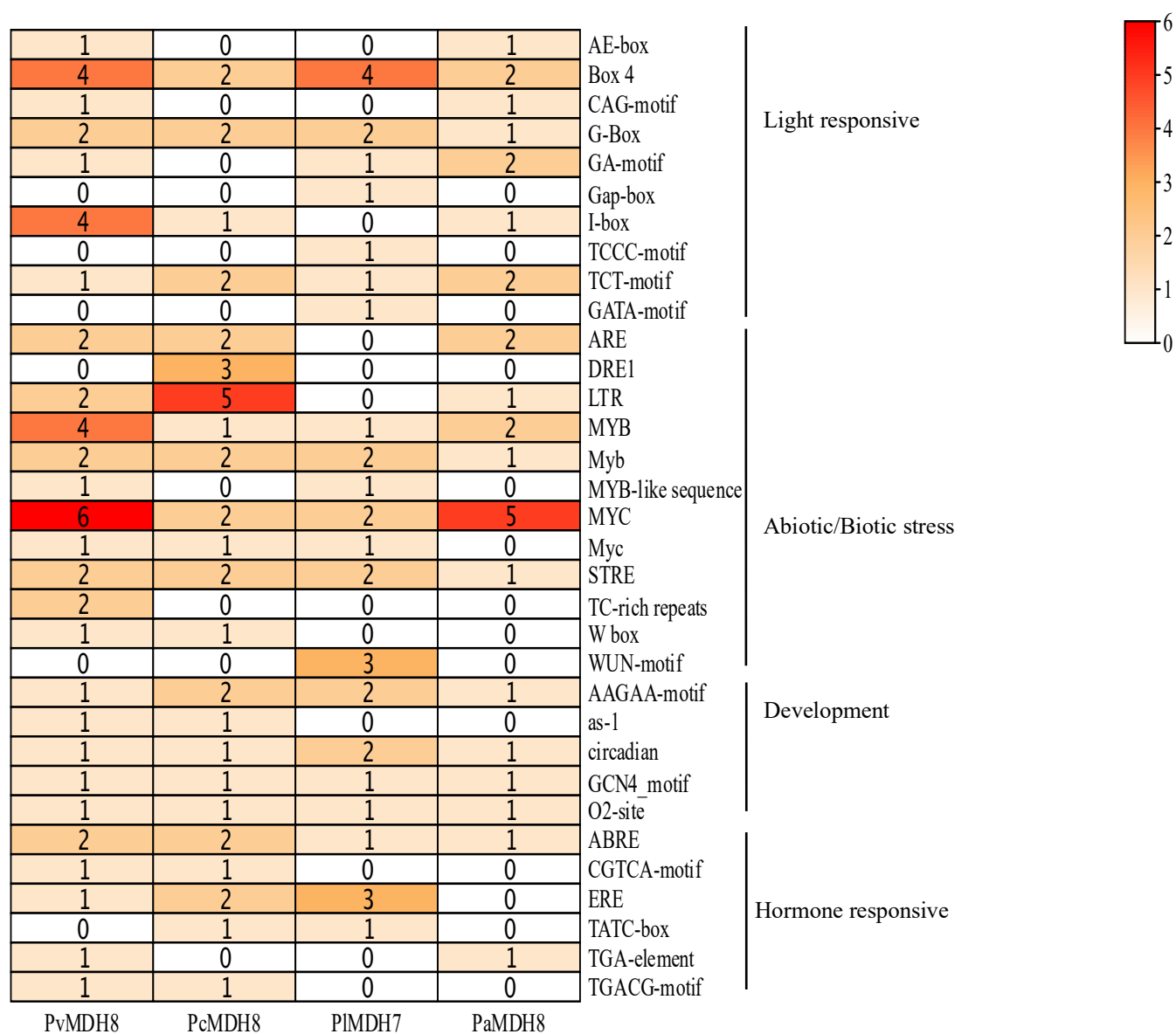


**Figura 12. Relaciones filogenéticas de las MDH en *Phaseolus*, *S. lycopersicum* y *G. max*.** Los diferentes colores representan distintos grupos de proteínas MDH: rojo (Grupo I), azul (Grupo II), verde (Grupo III), rosa (Grupo IV) y amarillo (Grupo V).

## **Análisis *in silico* elementos *cis* del promotor de PvMDH8**

La expresión del gen *MDH* está asociada con la presencia de elementos *cis*-regulatorios en su región promotora. Los elementos *cis* identificados se clasificaron en cuatro categorías principales: respuesta a la luz, estrés abiótico/biótico, desarrollo y respuestas hormonales (Figura 12). En total, se detectaron 149 elementos *cis* en los 4 genes mitocondriales de MDH (MDHmt). Entre ellos, *PvMDH8* presentó el mayor número de elementos (48) seguido de *PcMDH8* (39), *PlMDH7* (34) y *PaMDH8* (28). El análisis de distribución reveló que los elementos relacionados con la respuesta a estrés abiótico y biótico fueron los más abundantes, representando el 44.2 % (66/149) del total. En segundo lugar, se ubicaron los elementos de respuesta a la luz, con un 28.1 % (42/149), mientras que los elementos asociados con crecimiento y desarrollo y respuesta hormonal constituyeron las proporciones más bajas, con un 14 % (21/149) y un 13.4 % (20/149), respectivamente.

Estos resultados sugieren que la MDHmt podría desempeñar un papel clave en la síntesis de hormonas, el crecimiento vegetal y las respuestas a estreses bióticos y abióticos en especies de *Phaseolus*, lo que la convierte en un gen candidato para investigaciones futuras. Adicionalmente, las MDH han sido descritas como mediadores esenciales en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés tanto abiótico como biótico (Reddy y Stahmann 1975; Tesfaye et al. 2001; Yao et al. 2011; Zhou et al. 2023).

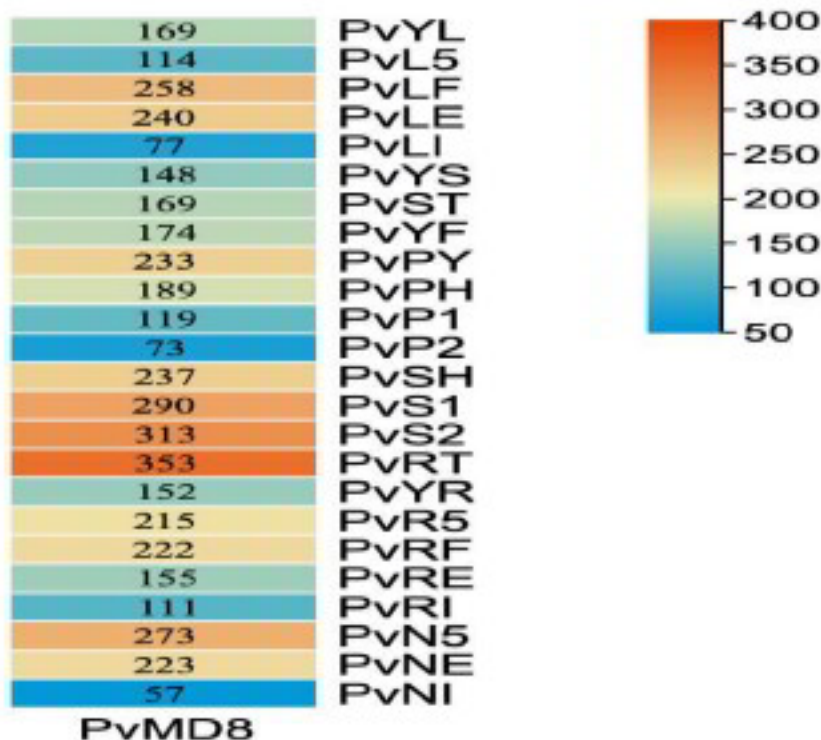


**Figura 13. Análisis de elementos cis en los promotores de las MDH mitocondriales de *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*.** Los elementos reguladores cis identificados en los promotores de los genes MDH mitocondriales de Phaseolus fueron clasificados en cuatro categorías funcionales. La distribución y abundancia relativa de cada elemento se representan en el mapa de calor, donde la intensidad de la escala de color rojo corresponde al número de ocurrencias por promotor, y el número se indica dentro de cada celda.

## **Análisis *in silico* del perfil de expresión de PvMDH8 en raíces y nódulos**

La expresión de *MDH* es crítica para el crecimiento vegetal, el desarrollo de semillas y la floración. En *Arabidopsis*, mutaciones homocigóticas para la MDH mitocondrial resultan letales a nivel embrionario, deteniéndose en la etapa de torpedo. En contraste, los mutantes heterocigotos (MDH) son viables, pero producen silicuas con una mezcla de semillas verdes y blancas, evidenciando su papel esencial en la maduración de la semilla (Beeler et al. 2014; Selinski y Scheibe 2019). La expresión *in silico* de *PvMDH8* durante la nodulación mostró regulación específica por tejido, con diferencias entre órganos reproductivos y vegetativos. Las estructuras reproductivas exhibieron niveles elevados de expresión, probablemente asociados con el suministro de carbono necesario para un rápido crecimiento. Conforme las vainas maduran, la expresión disminuye, reflejando la transición de un estado de crecimiento activo a uno de almacenamiento de reservas. En las semillas, se observaron altos niveles de transcritos a lo largo de todas las etapas de desarrollo, desde el embrión en fase temprana de corazón hasta la maduración tardía.

En raíces, *PvMDH8* presentó niveles de expresión similares bajo condiciones noduladas y no noduladas. Sin embargo, en nódulos recolectados al mismo tiempo, PvNI (21 dpi, nódulos no fijadores) y PvNE (21 dpi, nódulos fijadores), la expresión de *PvMDH8* fue particularmente baja en PvNI. Esto sugiere un papel importante de *PvMDH8* en la simbiosis, específicamente en nódulos funcionales, posiblemente a través del suministro de malato a los bacteroides, un paso crucial para la fijación de nitrógeno (Figura 13). Estos hallazgos se alinean con la función conocida del malato como fuente primaria de carbono en nódulos de leguminosas. Durante el desarrollo del nódulo, la actividad de la MDH y de la nitrogenasa aumentan simultáneamente, indicando una coordinación entre el metabolismo energético y la fijación de nitrógeno (Appels, y Haaker, H. 1988; Zhu et al. 2021). Por lo tanto, la regulación tisular específica de *PvMDH8* refleja su importancia funcional en el crecimiento y en la simbiosis.

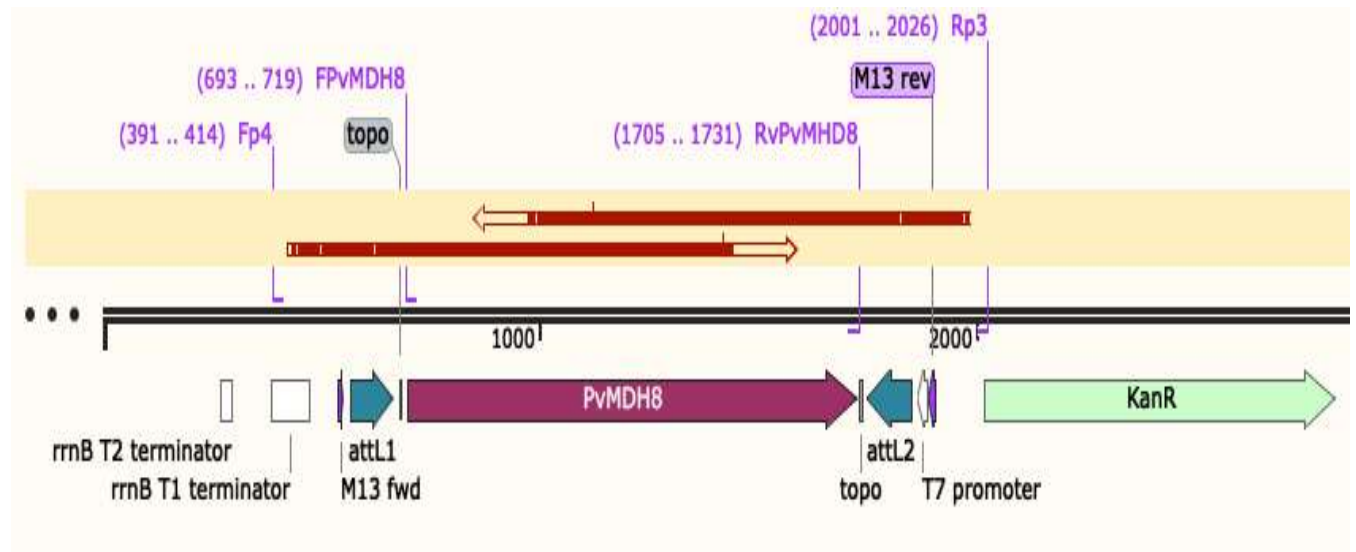


**Figura 14. Patrones de expresión de PvMDH8 en diversos tejidos. Los datos de transcriptoma fueron obtenidos de O'Rourke et al. (2014).** La abundancia de transcritos se representa mediante una escala de color, donde el rojo indica mayor expresión y el azul menor expresión. Las muestras incluyeron hojas del segundo trifoliado en plantas fertilizadas (PvYL), hojas de plantas de 5 días con rizobio efectivo (PvL5), hojas recolectadas en el mismo tiempo de LE y LI con fertilizante (PvLF), hojas de plantas de 21 días con rizobio efectivo (PvLE) e inefectivo (PvLI), entrenudos del tallo en el segundo trifoliado (PvYS), ápices del tallo con meristemo apical en el segundo trifoliado (PvST), flores jóvenes en botón floral (PvFY), vainas jóvenes (PvPY), vainas de aproximadamente 9 cm (PvPH), 10 cm (PvP1) y 12 cm (PvP2), semillas en estadio de corazón (PvSH), semillas en estadios 1 (PvS1) y 2 (PvS2), puntas de raíz en segundo trifoliado con fertilizante (PvRT), raíces completas en segundo trifoliado (PvYR), raíces denoduladas a 5 dpi (PvR5), nódulos a 5 dpi (PvN5), raíces completas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo que RE y RI (PvRF), raíces denoduladas a 21 dpi inoculadas con rizobio no fijadores (-) (PvRI) o con rizobio WT (PvRE), así como nódulos fijadores (+) (PvNE) y fix (-) (PvNI) a 21 dpi. Los valores de RPKM se representan utilizando la escala de color mostrada junto a cada mapa de calor. Para información detallada sobre abreviaciones de tejidos y tratamientos, consúltese O'Rourke et al. (2014) para *P. vulgaris*.

## Resultado de la secuenciación de pENTR-PvMDH8

El análisis de la secuenciación del vector pENTR con la secuencia de PvMDH8 tiene una identidad del 100% con la secuencia teórica (Figura 14).

(A)



**Figura 15. Análisis de la secuencia PvMDH8 clonada en pENTRD.** En (A) se muestra una representación gráfica de la secuencia de PvMDH8 clonada en el vector pENTR y las líneas rojas muestran la cobertura de la secuenciación. imagen visualizada con Snapgene ver.4.07.

## **Conclusiones**

- Se identificaron 31 genes que codifican MDH en cuatro especies de *Phaseolus*, con los dominios catalíticos conservados, lo que evidencia funciones metabólicas esenciales a pesar de la diversificación de isoformas.
- El análisis *in silico* de las isoformas de MDH presentaron una distribución subcelular específica (mitocondrias, citoplasma, plastidios, peroxisomas y retículo endoplásmico), lo que especialización funcional.
- Los análisis filogenéticos muestran conservación evolutiva y agrupamiento en cinco clados, lo que sugiere presión selectiva para mantener funciones relacionadas en los diferentes compartimentos celulares.
- La isoforma mitocondrial PvMDH8 posee un putativo péptido señal conservado entre las especies de *Phaseolus* y *G. max*.
- El análisis *in silico* de la expresión de PvMDH8 es elevada en semillas, órganos reproductivos y nódulos fijadores, lo que está relacionado con su rol en el suministro de malato durante la simbiosis y en la coordinación del metabolismo mitocondrial.

## **Perspectivas del trabajo.**

1. Generar un vector para la sobreexpresión de PvMDH8
2. Generar raíces transgénicas con el vector de sobreexpresión
3. Realizar el análisis funcional en hojas de *Nicotiana benthamiana*

## Literatura citada

- Abe, Naoya, Masaki Odahara, Shamitha Rao Morey, y Keiji Numata. 2024. "Development of a Versatile Plant-Derived Mitochondrial Targeting Sequence Based on a Reporter Protein Sorting Analysis and Biological Information". *ACS Chemical Biology* 19 (12): 2515–24. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.4c00625>.
- Adebo, Janet Adeyinka. 2023. "A Review on the Potential Food Application of Lima Beans (*Phaseolus lunatus* L.), an Underutilized Crop". *Applied Sciences* 13 (3). <https://doi.org/10.3390/app13031996>.
- Aguilar-Lopez, Antonio, Enrique Melo-Guerrero, Miguel Ángel Martínez-Damian, Juan Hernández-Ortiz, y Luis Manuel Valenzuela-Nuñez. 2024. "Horizontal price transmission in Mexico's dry-bean (*Phaseolus vulgaris* L.) market". *Ecosistemas y recursos agropecuarios* 11 (1).
- Andueza Noh, Rubén Humberto, y Jaime Martínez-Castillo. 2022. "Domesticación del frijol Lima (*Phaseolus lunatus* L.) en México". *Siembra* 9.
- Andueza-Noh, Rubén H., Luciana Camacho-Pérez, Jaime Martínez-Castillo, y Filogonio May-Pat. 2016. "Distribución geográfica de los parientes silvestres del acervo genético mesoamericano del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en México". *Polibotánica*, núm. 41: 101–13.
- Appels, Michiel A., y Huub Haaker, H. 1988. "Identification of cytoplasmic nodule-associated forms of malate dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*". *European Journal of Biochemistry* 171 (3): 515–22. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13820.x>.
- Arriagada, Osvin, Andrés R. Schwember, María Jesús Greve, Milan O. Urban, Ricardo A. Cabeza, y Basilio Carrasco. 2021. "Morphological and Molecular Characterization of Selected Chilean Runner Bean (*Phaseolus coccineus* L.) Genotypes Shows Moderate Agronomic and Genetic Variability". *Plants* 10 (8). <https://doi.org/10.3390/plants10081688>.
- Avendaño-Monsalve, Maria Clara, José Carlos Ponce-Rojas, y Soledad Funes. 2021. "Viaje al centro de la mitocondria: importación de proteínas, sus alteraciones y enfermedades relacionadas". *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas* 24.
- Azani, Nasim, Marielle Babineau, C. Donovan Bailey, et al. 2017. "A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG)". *TAXON* 66 (1): 44–77. <https://doi.org/10.12705/661.3>.
- Baird, Lisa M., Christopher E. Berndsen, y Jonathan D. Monroe. 2024. "Malate dehydrogenase in plants: evolution, structure, and a myriad of functions". *Essays in Biochemistry* 68 (2): 221–33. <https://doi.org/10.1042/EBC20230089>.
- Barreto, Pedro, Alessandra Koltun, Juliana Nonato, Juliana Yassitepe, Ivan de Godoy Maia, y Paulo Arruda. 2022. "Metabolism and Signaling of Plant Mitochondria in Adaptation to Environmental Stresses". *International Journal of Molecular Sciences* 23 (19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911176>.

- Beeler, Seraina, Hung-Chi Liu, Martha Stadler, et al. 2014. "Plastidial NAD-Dependent Malate Dehydrogenase Is Critical for Embryo Development and Heterotrophic Metabolism in Arabidopsis". *Plant Physiology* 164 (3): 1175–90. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233866>.
- Bitocchi, Elena, Domenico Rau, Elisa Bellucci, et al. 2017. "Beans (*Phaseolus* spp.) as a Model for Understanding Crop Evolution". *Frontiers in Plant Science* Volume 8-2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00722>.
- Brilhante, Miguel, Federico Richter, Maria M. Romeiras, y Pedro Talhinhos. 2025. "Evaluation of *Phaseolus* and *Vigna* species in the Mediterranean climate: a morphological and chemical analysis". *Genetic Resources and Crop Evolution*, advance online publication, junio 30. <https://doi.org/10.1007/s10722-025-02474-0>.
- Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, y J. Vanderleyden. 2003. "Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes". *Plant and Soil* 252 (1): 55–128. <https://doi.org/10.1023/A:1024146710611>.
- Carrère, Sébastien, Baptiste Mayjonade, David Lalanne, Sylvain Gaillard, Jérôme Verdier, y Nicolas W.G. Chen. 2023. "First whole genome assembly and annotation of a European common bean cultivar using PacBio HiFi and Iso-Seq data". *Data in Brief* 48 (junio): 109182. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109182>.
- Cervantes-Jiménez, Ricardo, Marisol Martínez Martínez, Adán Mercado-Luna, et al. 2022. "Effect of Induced Mechanical Leaf Damage on the Yield and Content of Bioactive Molecules in Leaves and Seeds of Tepary Beans (*Phaseolus acutifolius*)". *Plants* 11 (24). <https://doi.org/10.3390/plants11243538>.
- Chen, Chengjie, Hao Chen, Yi Zhang, et al. 2020. "TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data". *Molecular plant* 13 (8): 1194–202.
- Ciereszko, Iwona, y Elżbieta Kuźniak. 2024. "Photorespiratory Metabolism and Its Regulatory Links to Plant Defence Against Pathogens". *International Journal of Molecular Sciences* 25 (22). <https://doi.org/10.3390/ijms252212134>.
- Cruz-Cruz, Efraín, Jorge Alberto Acosta-Gallegos, Luis Reyes-Muro, y José Antonio Cueto-Wong. 2021. *Variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) del INIFAP*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).
- Cué-Hernández, Karina Alejandra, Abel Gil Muñoz, Armando Aguirre-Jaimes, Pedro Antonio López, y Oswaldo Rey Taboada-Gaytán. 2022. "Visitantes florales en el cultivo de *Phaseolus coccineus* (Fabaceae) en el Altiplano de Puebla, México: importancia del manejo agrícola y color de flor". Artículo de Investigación. *Acta Botanica Mexicana*, núm. 129 (julio). <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2054>.
- Debouck, Daniel G., A. Maquet, y Carmen Elisa Posso G. 1989. *Biochemical evidence for two different gene pools in lima beans, *Phaseolus lunatus* L.*
- Finkemeier, Iris, y Lee J. Sweetlove. 2009. "The Role of Malate in Plant Homeostasis." *F1000 Biology Reports* (England) 1 (junio): 47. <https://doi.org/10.3410/B1-47>.

- Ghifari, Abi S, y Monika W Murcha. 2020. "Plant Mitochondria". En *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029217>.
- Guerra-García, Azalea, Marco Suárez-Atilano, Alicia Mastretta-Yanes, Alfonso Delgado-Salinas, y Daniel Piñero. 2017. "Domestication Genomics of the Open-Pollinated Scarlet Runner Bean (*Phaseolus coccineus* L.)". *Frontiers in Plant Science* Volume 8-2017. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.01891>.
- Hebbelmann, Inga, Jennifer Selinski, Corinna Wehmeyer, et al. 2012. "Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase". *Journal of Experimental Botany* 63 (3): 1445–59. <https://doi.org/10.1093/jxb/err386>.
- Huang, Dandan, Guangqin Jing, y Shuhua Zhu. 2023. "Regulation of Mitochondrial Respiration by Hydrogen Sulfide". *Antioxidants* 12 (8). <https://doi.org/10.3390/antiox12081644>.
- Hung, Chih-Hung, Tzann-Shun Hwang, Yu-Yung Chang, Huei-Ru Luo, Szu-Pei Wu, y Chun-Hua Hsu. 2013. "Crystal Structures and Molecular Dynamics Simulations of Thermophilic Malate Dehydrogenase Reveal Critical Loop Motion for Co-Substrate Binding". *PLOS ONE* 8 (12): e83091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083091>.
- Imran, Muhammad, Muhammad Zeeshan Munir, Sara Ialhi, et al. 2022. "Identification and Characterization of Malate Dehydrogenases in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)". *International Journal of Molecular Sciences* 23 (17): 10028.
- Imran, Muhammad, Kai Tang, y Jin-Yuan Liu. 2016. "Comparative Genome-Wide Analysis of the Malate Dehydrogenase Gene Families in Cotton". *PLOS ONE* 11 (11): e0166341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166341>.
- Jaipargas, Erica-Ashley, Kiah A. Barton, Neeta Mathur, y Jaideep Mathur. 2015. "Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics". *Frontiers in Plant Science* Volume 6-2015. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2015.00783>.
- Jiménez Galindo, José Cruz, y Jorge Alberto Acosta Gallegos. 2012. "Caracterización de genotipos criollos de frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) y común (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo temporal". *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3 (8): 1565–77.
- Lepetit, Marc, y Renaud Brouquisse. 2023. "Control of the rhizobium–legume symbiosis by the plant nitrogen demand is tightly integrated at the whole plant level and requires inter-organ systemic signaling". *Frontiers in Plant Science* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1114840>.
- Lépez Ildelfonso, Rogelio, J. Jesús López Alcocer, J. Jesús Sánchez González, Fernando Santacruz-Ruvalcaba, Ricardo Nuño Romero, y Eduardo Rodríguez Guzmán. 2010. "Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador". *Revista fitotecnica mexicana* 33 (1): 21–28.

- Lépiz-Ildefonso, Rogelio, José de J López-Alcocer, Carlos González-Rivas, y Eduardo Rodríguez-Guzmán. 2016. "Cuarenteño, nueva variedad de frijol de tipo cacahuete para el estado de Jalisco, México". *Revista fitotecnia mexicana* 39 (4): 415–16.
- Liszka, Aleksandra, Regina Schimpf, Krupskaya Ivannova Cartuche Zaruma, et al. 2020. "Three cytosolic NAD-malate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*: on the crossroad between energy fluxes and redox signaling". *Biochemical Journal* 477 (19): 3673–93. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200240>.
- Logan, David C. 2006. "The mitochondrial compartment". *Journal of Experimental Botany* 57 (6): 1225–43. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj151>.
- Lopez-Martinez, Leticia X. 2020. "Bioactive Compounds of Runner Bean (*Phaseolus coccineus* L.)". En *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes*, editado por Hosakatte Niranjana Murthy y Kee Yoeup Paek. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-44578-2\\_31-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-44578-2_31-1).
- Matul-Ramos, Kevin, David Fonseca Hernández, Lilia Carolina Acevez Mares, Elba Montserrat Alcázar Valle, Eugenia Lugo Cervantes, y Luis Mojica. 2024. "Importancia cultural y nutricional de especies de frijol (*Phaseolus*) endémicas de México". *Enfoques Transdisciplinarios: Ciencia y Sociedad* 2 (2). <https://doi.org/10.5281/zenodo.12774554>.
- Medeiros, David B., Fayezeah Aarabi, Félix Juan Martínez Rivas, y Alisdair R. Fernie. 2021. "The knowns and unknowns of intracellular partitioning of carbon and nitrogen, with focus on the organic acid-mediated interplay between mitochondrion and chloroplast". *Journal of Plant Physiology* 266: 153521. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153521>.
- Mendoza-Suárez, Marcela, Stig U. Andersen, Philip S. Poole, y Carmen Sánchez-Cañizares. 2021. "Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the Rhizobium-Legume Symbioses". *Frontiers in Plant Science* Volume 12-2021. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.690567>.
- Meza-Vázquez, Karen Elizabeth, Rogelio Lépiz-Ildefonso, José de J. López-Alcocer, y Moisés Martín Morales-Rivera. 2015. "Caracterización morfológica y fenológica de especies silvestres de frijol (*Phaseolus*)". *Revista fitotecnia mexicana* 38 (1): 17–28.
- Mhlaba, Zinhle Babongile, Jacob Mashilo, Hussein Shimelis, Amelework Beyene Assefa, y Albert Thembinkosi Modi. 2018. "Progress in genetic analysis and breeding of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray): A review". *Scientia Horticulturae* 237 (julio): 112–19. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.012>.
- Møller, Ian Max, Allan G. Rasmusson, y Olivier Van Aken. 2021. "Plant mitochondria – past, present and future". *The Plant Journal* 108 (4): 912–59. <https://doi.org/10.1111/tpj.15495>.
- Nadon, Brian, y Scott Jackson. 2020. *Chapter Seven - The polyploid origins of crop genomes and their implications: A case study in legumes*. Editado por Donald L. Sparks. Vol. 159. *Advances in Agronomy*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.08.006>.

- Ng, Tzi-Bun, Jack H. Wong, Randy C.F. Cheung, et al. 2011. "Chapter 127 - Antifungal and Antiproliferative Activity of Spotted Bean (*Phaseolus vulgaris* cv.)". En *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, editado por Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, y Vinood B. Patel. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10127-6>.
- O'Rourke, Jamie A, Luis P Iniguez, Fengli Fu, et al. 2014. "An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean". *BMC genomics* 15 (1): 1–17.
- Parker, Travis A., y Paul Gepts. 2024. "Population Genomics of *Phaseolus* spp.: A Domestication Hotspot". En *Population Genomics: Crop Plants*, editado por Om P. Rajora. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/13836\\_2021\\_89](https://doi.org/10.1007/13836_2021_89).
- Pracharoenwattana, Itsara, Johanna E. Cornah, y Steven M. Smith. 2007. "Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in  $\beta$ -oxidation but not in the glyoxylate cycle". *The Plant Journal* 50 (3): 381–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03055.x>.
- Raghavendra, Agepati S., y Kollipara Padmasree. 2003. "Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation". *Trends in Plant Science* 8 (11): 546–53. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.09.015>.
- Reddy, M.N., y M.A. Stahmann. 1975. "Malate dehydrogenase in the Fusarial wilt disease of peas". *Physiological Plant Pathology* 7 (2): 99–111. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(75\)90001-6](https://doi.org/10.1016/0048-4059(75)90001-6).
- Salinas, Alfonso Delgado. 1988. "Variation, Taxonomy, Domestication, and Germplasm Potentialities in *Phaseolus coccineus*". En *Genetic Resources of Phaseolus Beans: Their maintenance, domestication, evolution and utilization*, editado por Paul Gepts. Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2786-5_18).
- Sánchez Gómez, Julia, Yair Romero-Romero, Marisol Vázquez Alfaro, y Ever Sánchez Osorio. 2025. "Avances y retos en la producción de cultivos en México: caso del agave, café, mango y frijol". Sociedad y Sistemas Agroalimentarios. *Enfoques Transdisciplinarios: Ciencia y Sociedad* 1 (1): 209–20.
- Schmutz, Jeremy, Phillip E McClean, Sujan Mamidi, et al. 2014. "A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications". *Nature Genetics* 46 (7): 707–13. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>.
- Schulze, J., M. Tesfaye, R. H. M. G. Litjens, et al. 2002. "Malate plays a central role in plant nutrition". *Plant and Soil* 247 (1): 133–39. <https://doi.org/10.1023/A:1021171417525>.
- Schwember, Andrés R., Joachim Schulze, Alejandro del Pozo, y Ricardo A. Cabeza. 2019. "Regulation of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules". *Plants* 8 (9). <https://doi.org/10.3390/plants8090333>.
- Schwember, A.R., B. Carrasco, y P. Gepts. 2017. "Unraveling agronomic and genetic aspects of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.)". *Field Crops Research* 206 (mayo): 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.02.020>.

- Selinski, J., y R. Scheibe. 2019. "Malate valves: old shuttles with new perspectives". *Plant Biology* 21 (S1): 21–30. <https://doi.org/10.1111/plb.12869>.
- Selinski, Jennifer, Nicolas König, Benedikt Wellmeyer, et al. 2014. "The Plastid-Localized NAD-Dependent Malate Dehydrogenase Is Crucial for Energy Homeostasis in Developing Arabidopsis thaliana Seeds". *Molecular Plant* 7 (1): 170–86. <https://doi.org/10.1093/mp/sst151>.
- Sharma, Vinay, Samrat Bhattacharyya, Rakesh Kumar, et al. 2020. "Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between Bradyrhizobium and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (Arachis hypogaea L.)". *Plants* 9 (2). <https://doi.org/10.3390/plants9020276>.
- Sica, Pietro, Aline Galvao, Francesco Scariolo, et al. 2021. "Effects of Drought on Yield and Nutraceutical Properties of Beans (Phaseolus spp.) Traditionally Cultivated in Veneto, Italy". *Horticulturae* 7 (2). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020017>.
- Stojanovski, Diana, Amelia J. Johnston, Illo Streimann, Nicholas J. Hoogenraad, y Michael T. Ryan. 2003. "Import of Nuclear-Encoded Proteins into Mitochondria". *Experimental Physiology* 88 (1): 57–64. <https://doi.org/10.1113/eph8802501>.
- Suárez, Juan Carlos, Amara Tatiana Contreras, José Alexander Anzola, José Iván Vanegas, y Idupulapati M. Rao. 2022. "Physiological Characteristics of Cultivated Tepary Bean (Phaseolus acutifolius A. Gray) and Its Wild Relatives Grown at High Temperature and Acid Soil Stress Conditions in the Amazon Region of Colombia". *Plants* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/plants11010116>.
- Tang, Hui, y Hongliang Zhu. 2023. "Specific Changes in Morphology and Dynamics of Plant Mitochondria under Abiotic Stress". *Horticulturae* 9 (1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010011>.
- Tesfaye, Mesfin, Stephen J. Temple, Deborah L. Allan, Carroll P. Vance, y Deborah A. Samac. 2001. "Overexpression of Malate Dehydrogenase in Transgenic Alfalfa Enhances Organic Acid Synthesis and Confers Tolerance to Aluminum". *Plant Physiology* 127 (4): 1836–44. <https://doi.org/10.1104/pp.010376>.
- Tomaz, Tiago, Matthieu Bagard, Itsara Pracharoenwattana, et al. 2010. "Mitochondrial Malate Dehydrogenase Lowers Leaf Respiration and Alters Photorespiration and Plant Growth in Arabidopsis". *Plant Physiology* 154 (3): 1143–57. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161612>.
- Uebersax, Mark A., Karen A. Cichy, Francisco E. Gomez, et al. 2023. "Dry beans (Phaseolus vulgaris L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security—A review". *Legume Science* 5 (1): e155. <https://doi.org/10.1002/leg3.155>.
- Van Aken, Olivier. 2021. "Mitochondrial redox systems as central hubs in plant metabolism and signaling". *Plant Physiology* 186 (1): 36–52. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab101>.
- Vargas Vázquez, Ma. Luisa Patricia, José Socorro Muruaga Martínez, Netzahualcóyotl Mayek Pérez, Alfredo Pérez Guerrero, y Susana E. Ramírez-Sánchez. 2018. "Caracterización de frijol ayocote (Phaseolus coccineus L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental". *Artículos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (2): 191–200. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i2.959>.

- Vargas-Vázquez, María Luisa Patricia, José Socorro Muruaga-Martínez, Ivon Montserrat Cerda-Hurtado, et al. 2024. *Diversidad de las especies silvestres de Phaseolus (Fabaceae)*.
- Vázquez, Vargas, Ma Luisa Patricia, José Socorro Muruaga Martínez, Netzahualcóyotl Mayek Pérez, Alfredo Pérez Guerrero, y Susana E. Ramírez-Sánchez. 2014. "Caracterización de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental". *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 5 (2): 191–200.
- White, Rhiannon R., Congping Lin, Ian Leaves, et al. 2020. "Miro2 tethers the ER to mitochondria to promote mitochondrial fusion in tobacco leaf epidermal cells". *Communications Biology* 3 (1): 161. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0872-x>.
- Wilkinson, Helen, Alice Coppock, Bethany L. Richmond, Beatriz Lagunas, y Miriam L. Gifford. 2023. "Plant–Environment Response Pathway Regulation Uncovered by Investigating Non-Typical Legume Symbiosis and Nodulation". *Plants* 12 (10). <https://doi.org/10.3390/plants12101964>.
- Wolyniak, Michael J., Robert H. Frazier, Peter K. Gemborys, y Henry E. Loehr. 2024. "Malate dehydrogenase: a story of diverse evolutionary radiation". *Essays in Biochemistry* 68 (2): 213–20. <https://doi.org/10.1042/EBC20230076>.
- Yao, Yu-Xin, Qing-Long Dong, Heng Zhai, Chun-Xiang You, y Yu-Jin Hao. 2011. "The Functions of an Apple Cytosolic Malate Dehydrogenase Gene in Growth and Tolerance to Cold and Salt Stresses". *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (3): 257–64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.009>.
- Yıldız, Serenay, Aybüke Okay, y İlker Büyük. 2022. "Defining the roles of PvMDH genes in response to salt stress and detailed characterization of the gene family". *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 31 (2): 380–93. <https://doi.org/10.1007/s13562-021-00690-0>.
- Zhang, Yilei, Panpan Li, Bin Yi, y Dongli He. 2025. "Current Advances in Plant Mitochondria: Application Revolution of Cytoplasmic Male Sterility". *New Crops*, mayo 19, 100081. <https://doi.org/10.1016/j.ncrops.2025.100081>.
- Zhou, Mengmeng, Guanqi Wang, Ruoyu Bai, Huiping Zhao, Zhongyuan Ge, y Haitao Shi. 2023. "The self-association of cytoplasmic malate dehydrogenase 1 promotes malate biosynthesis and confers disease resistance in cassava". *Plant Physiology and Biochemistry* 201 (agosto): 107814. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107814>.
- Zhou, Runnan, Sihui Wang, Peiyan Liu, et al. 2024. "Genome-wide characterization of soybean malate dehydrogenase genes reveals a positive role of GmMDH2 in salt stress response". *Journal of Integrative Agriculture*, advance online publication, enero 3. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.12.036>.
- Zhu, Shengnan, Zhijian Chen, Baoxing Xie, et al. 2021. "A phosphate starvation responsive malate dehydrogenase, GmMDH12 mediates malate synthesis and nodule size in soybean (*Glycine max*)". *Environmental and Experimental Botany* 189 (septiembre): 104560. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104560>.