

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



**Obtención de una clona de *Agrobacterium rhizogenes* que porte la
construcción pH7WG2tdT-Snakina 25**

Por:

DULCE CARMINA SÁNCHEZ RANGEL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Obtención de una clona de *Agrobacterium rhizogenes* que porte la construcción pH7WG2tdT-Snakina 25

Por:

Dulce Carmina Sánchez Rangel

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador:



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Presidente



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Vocal



Dra. Aida Isabel Leal Robles

Vocal



Dra. Erika Nohemi Martínez Rivas

Vocal



M.C Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

**Obtención de una clona de *Agrobacterium rhizogenes* que porte la
construcción pH7WG2tdT-Snakina 25**

Por:

Dulce Carmina Sánchez Rangel

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



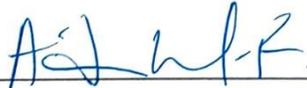
Dr. Marco Adán Juárez Verdayes

Asesor Principal



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Co-Asesor



Dra. Aida Isabel Leal Robles

Co-Asesor

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2023

DECLARATORIA DE NO PLAGIO

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

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la

tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

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

Pasante

Sánchez R.

Dulce Carmina Sánchez Rangel

AGRADECIMIENTOS:

El presente trabajo agradezco a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, que siempre fue noble, y dispuso para mí las herramientas necesarias para mi formación profesional. ¡Alma Terra Mater!

A mis mamás por ser mi pilar fundamental, por creer siempre en mí y haberme apoyado incondicionalmente.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Marco Adán Juárez Verdayes quien con su experiencia, conocimiento y motivación formo mi interés por la investigación, y que sin su dedicación y apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Así mismo, agradezco a mi compañera de Laboratorio Lidia Alejandra González Aldaco por su gran apoyo emocional e intelectual, por compartido proyectos e ilusiones durante estos casi 5 años.

A la Dra. Yolanda Ortega Ortega del departamento de Biociencias y Agrotecnología del Centro de investigación de Química Aplicada por su apoyo técnico en el proceso de conservación y manipulación de los *Agrobacterium rhizogenes* requeridos para la realización de la parte experimental de la tesis.

DEDICATORIA

A mi familia que, aunque pequeña y un poco rota es mi fortaleza.

A José Carlos, mi compañero por su amor y apoyo incondicional.

A Sabina, que siempre me dio su compañía y me enseñó de lealtad.

Finalmente, a todas las niñas y mujeres que quieren hacer ciencia.

INDICE	
AGRADECIMIENTOS:	1
DEDICATORIA	3
INDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
1.2 Hipótesis	10
1.3 Objetivo general	10
1.4 Objetivo específicos	10
II. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1 Péptidos antimicrobianos	11
2.2 Snakinas	14
2.3 Participación de las snakinas en procesos fisiológicos.	15
2.4 Actividad antimicrobiana de las snakinas.	16
2.5 Clasificación y estructura de las snakinas	18
2.6 Snakinas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	19
2.7 <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
III. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 Localización del sitio experimental	22
3.2 Extracción del plásmido (pENTRD-Snakina25)	22
3.3 Protocolo para transformación de <i>E. coli</i> Top 10	23
3.4 Recombinación entre el vector PENTRD-Snakina25 y el pH7WG2tdT 24	
3.5 Transformación de <i>A. rhizogenes</i>	24

3.6 Selección de colonias de clonas que portan el PH7WG2tdT-Snakina25 por PCR	25
3.7 Transformación de <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
IV. RESULTADOS	30
4.1 Extracción del plásmido (pENTRD-Snakina25)	30
4.2 Transformación y selección de <i>A. rhizogenes</i> con el producto de la recombinación	30
4.3 Transformación de <i>P. vulgaris</i> con <i>A. rhizogenes</i> que porta la construcción pH7WG2tdT-Snakina25	31
V. CONCLUSIONES	33
VI. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los pams por su estructura secundaria.....	12
Figura 2: Estructuras 3d de pams de plantas.....	13
Figura 3: Puentes disulfuro en la snakin-1 de <i>Solanum tuberosum</i>.....	14
Figura 4: Alineamiento de de snakina-1 y la gasa1.....	15
Figura 5: Participación de las snakinas en procesos fisiológicos.....	16
Figura 6: Mecanismos de acción de snakinas con las membranas plasmáticas. 17	17
Figura 7: Estructura 3d de snakin-1 de <i>Solanum tuberosum</i>.....	18
Figura 8: Estructura 3d de la familia de las snakinas.	19
Figura 9: Alineación de la secuencia de aminoácidos del péptido proveniente del frijol con la de snakin-2 de la papa.	19
Figura 10: Mapa de la construcción del plásmido pENTRD-Snakina25.....	20
Figura 11: Mapa del plásmido pH7WG2tdT.....	23
Figura 12. Método de germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i>.	27
Figura 13. Método de infección de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>A. rhizogenes</i>	29
Figura 14: Corrimiento electroforético en gel de agarosa de la pcr a partir del plásmido pENTRD-Snakina25;	30
Figura 15: Corrimiento electroforético de los productos de pcr en colonia.	31
Figura 16: Callo visto con estereoscopio	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración mínima inhibitoria de snakina-z.....	16
Tabla 2: Familia de las snakinas en <i>Phaseolus vulgaris</i> recuperado de: vergara garcía (2023).	20
Tabla 3: Mezcla de reactivos para PCR.....	25
Tabla 4: Características de los primers diseñados por vergara garcía (2023)	25
Tabla 5: Sales del medio fahraeus para 1L de solución madre	28
Tabla 6: Resultados de los experimentos realizados.....	32

RESUMEN

Los PAM's son conocidos principalmente por ser parte del sistema inmune innato de los organismos vivos, algunos de ellos también forman parte de procesos fisiológicos, tal es el caso de la familia GASA/Snakina, en las plantas las snakinas interfieren en el tamaño de hojas, floración, producción de raíces, entre otros.

En el siguiente trabajo se realizó una recombinación del vector pENTRD-Snakina25 que porta una snakina proveniente de *Phaseolus vulgaris* con el vector binario pH7WG2tdT para transformar *Agrobacterium rhizogenes* (K599). Los resultados obtenidos nos sugieren que la construcción generada puede estar afectando el desarrollo de las "hairy roots" ya que se han probado varias clonas de *A.rhizogenes* que portan la construcción y hasta el momento no se ha logrado la obtención de raíces transgénicas, pero el callo formado presenta una fluorescencia que corresponde la presencia del gen reportero tdT.

Palabras clave: Péptidos antimicrobianos, GASA, snakina, *Phaseolus vulgaris*, Vector binario.

INTRODUCCIÓN

La preocupación por el uso de agroquímicos como: plaguicidas, herbicidas y fármacos ha ido en aumento en los últimos años, esto debido a la aparición de organismos resistentes y con ello la necesidad de un aumento de dosis aplicada, además del impacto que esto puede tener en la salud y el medio ambiente, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas alternativas que sean más amigables y con menor impacto; Un ejemplo de estas nuevas alternativas son los péptidos antimicrobianos (PAMs).

Los PAMs son péptidos de defensa de los organismos que su principal función es combatir diversos agentes infecciosos como: bacterias, hongos, parásitos o virus. Las plantas son una fuente prometedora de estos péptidos que se han documentado en diferentes partes de la planta como: hojas, raíces, semillas, flores y tallos.

La familia de las GASA/Snakina son péptidos solamente encontrados en plantas, se componen de 70 a 90 aminoácidos y son ricos en cisteína, además de tener un amplio espectro contra microorganismos también se han reportado con importantes funciones para el desarrollo de las plantas.

1.2 Hipótesis

La obtención de una clona de *A.rhizogenes* (K599) que porte el vector pH7WG2tdT-Snakina 25 y que presente una eficiencia de transformación permitirá clarificar el posible papel de una snakina en el proceso de nodulación.

1.3 Objetivo general

- Seleccionar una clona *Agrobacterium rhizogenes* (K599) que porte la construcción Snakina 25 (pH7WG2tdT-Snakina 25)

1.4 Objetivo específicos

- Recombinación del vector pENTRD-Snakina25 con el vector binario pH7WG2tdT.
- Transformación de *Agrobacterium rhizogenes* (K599) con el vector pH7WG2tdT-Snakina 25
- Selección de las clonas transformadas de *A. rhizogenes* mediante PCR en colonia.
- Determinación de las clonas con mayor eficiencia de transformación de *A. rhizogenes* (K599) en plantas de *P.vulgaris*
- Visualización de raíces transgénicas que contengan la construcción de la Snakina 25 (pH7WG2tdT-Snakina 25).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son pequeñas biomoléculas de naturaleza proteica, que forman parte del sistema inmune innato en varios organismos como: animales, plantas, bacterias y hongos (Lei et al., 2019). Los PAMs también son conocidos como péptidos de defensa del huésped (PDH), se consideran una de las principales barreras para combatir diversos agentes infecciosos (Su et al., 2020) y son efectivos en contra de un amplio espectro de organismos Gram positivos, Gram negativos, hongos, parásitos o virus (Erdem Büyükkiraz & Kesmen, 2022). Los PAMs tienen su actividad antimicrobiana a través de varios mecanismos diferentes, pero principalmente es el dañando a la integridad de la membrana celular o inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, enzimas esenciales, además del daño mitocondrial (Téllez & Castaño, 2010).

Los PAMs pueden ser clasificados tomando como base varios criterios y a continuación se mencionan dos ejemplos: la fuente de aislamiento (plantas, insectos, células animales, etc.)(Huan et al., 2020). Otra clasificación toma en cuenta la estructura secundaria y los clasifica en cuatro categorías: péptidos lineales α -hélice, los péptidos de hoja β con la presencia de dos o más enlaces disulfuro, los péptidos de horquilla con la presencia de un solo enlace disulfuro y/o la ciclación del péptido cadena y, finalmente estructuras mixtas ver figura 1 (Boparai & Sharma, 2020).

A pesar de la gran diversidad de PAM's por sus características fisicoquímicas, estructurales y de acción estos comparten características comunes como: el tamaño, la carga, ser anfipáticos, tener aminoácidos hidrófobos, catiónicos y son relativamente pequeños aminoácidos <100 (Manniello et al., 2021; Pasupuleti et al., 2012).

Manniello et al., (2021), menciona que se puede encontrar un cierto grado de identidad en algunas regiones o en los patrones de aminoácidos, pero rara vez los PAMs son similares entre especies u organismos y (Pasupuleti et al., 2012) lo atribuye a la adaptación de las especies al nicho ocupado. Téllez & Castaño (2010), menciona que la mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios.

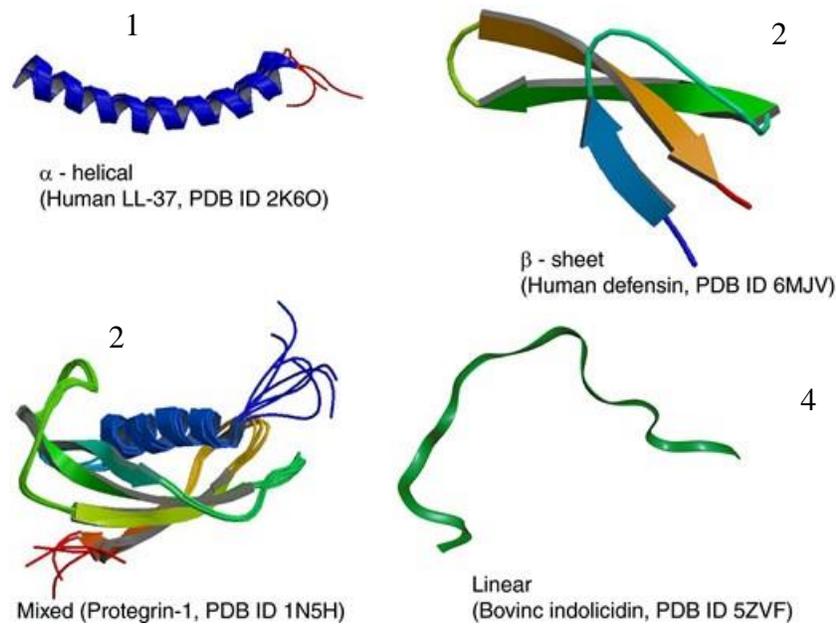


Figura 1: Clasificación de los PAMS por su estructura secundaria. Los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar en cuatro distintas (1) α -hélice, (2) hoja β , (3) mixta y (4) lineal. (tomada de: Büyükkiraz, et al., 2022)

Las plantas son una fuente prometedora de PAMs, ya que constantemente se encuentran expuestas a diferentes tipos de estrés biótico-abiótico, como ejemplos del estrés biótico tenemos que constantemente son expuestas a los microorganismos (bacterias, hongos, virus, protozoos e insectos) y tienen una importante participación en la eliminación de estas amenazas, la expresión de los PAMs se ha documentado en diferentes partes de la planta como: hojas, raíces, semillas, flores y tallos (Berrocal-Lobo et al., 2002; Wang et al., 2016).

En las plantas, la mayoría de los PAMs se han descrito como péptidos ricos en cisteínas, lo que puede permitir la formación de varios puentes disulfuro en los péptidos, los

enlaces pueden variar de dos a seis lo que los hace estables y es la razón por la cual a estos péptidos antimicrobianos también se les conoce por las siglas CRPs del inglés “cysteine-rich peptides” (Wijaya et al., 2000).

En 1972 se reportó el primer péptido antimicrobiano de origen vegetal y fue una purotionina, con una actividad antimicrobiana en contra de *Corynebacterium fascians*, *Pseudomonas solanacearum*, *Corynebacterium poinsettia* (De Caley et al., 1972). La distribución de los péptidos antimicrobianos en las plantas muestra una amplia distribución de estas familias y cada de ellas presentan varias funciones, estructuras y patrones de expresión, lo que dificulta su clasificación (Noonan et al. 2017 & Prabhu et al. 2014). Para la clasificación de los PAMs en las plantas generalmente son agrupados en familias de acuerdo con una disposición y residuos de cisteína conservados y son nombrados como: tioninas, defensinas, heveína, knotinas, α -harpininas, proteínas de transferencia de lípidos, snakinas como se muestran en la figura 2.

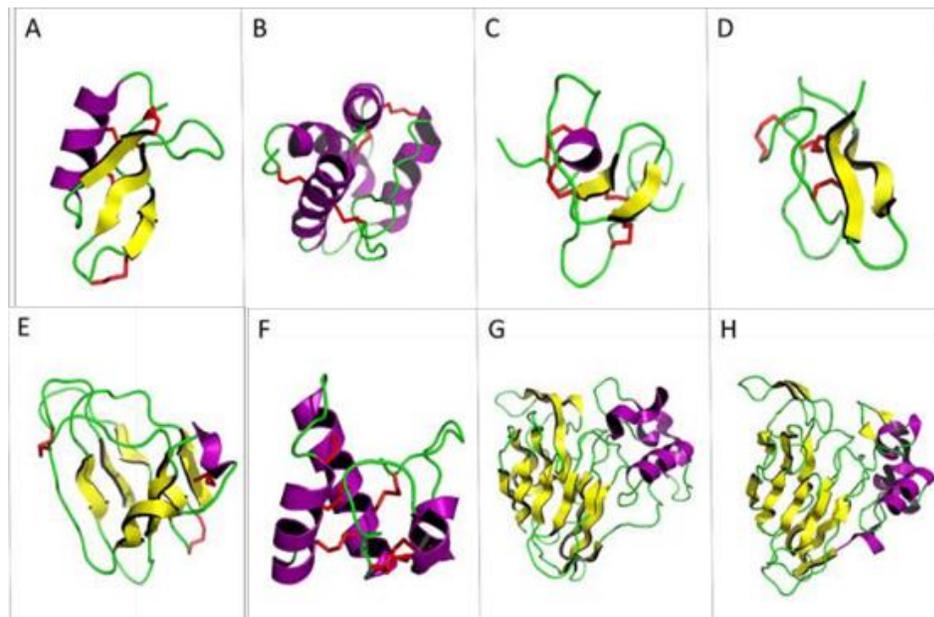


Figura 2: Estructuras 3D de PAMS de plantas. En las figuras A-H se representan las hojas β con flechas amarillas, las hélices α están representadas en púrpura y los enlaces disulfuro en rojo. En (A) se muestra la defensina de *Nicotiana glauca* (PDB ID: 1MR4). (B) Proteína de transferencia de lípidos proveniente del trigo (PDB ID: 1GH1). (C) Heveína de *Hevea brasiliensis* (PDB ID: 1HEV). (D) Knotina de *Echinopsis pachanoi* (PDB ID: 2MFS). (E) Péptido MiAMP1 de *Macadamia integrifolia* (PDB ID: 1C01). (F) Snakina-1 de *Solanum tuberosum* (ID PDB: 5E5Q). (G) Taumatococina *Thaumatooccus daniellii* (PDB ID: 1RQW). (H) Zeamatina de *Zea mays* (PDB ID: 1DU5). Tomado y modificada de: (dos Santos-Silva et al., 2020).

2.2 Snakinas

Las snakinas son un grupo de péptidos antimicrobianos, que se han reportado únicamente en plantas y se ha registrado que presentan un amplio espectro cuando son utilizados como agentes antimicrobianos (Oliveira-Lima et al., 2017).

La primera snakina, se documentó en la papa (*Solanum tuberosum*), y al realizar un análisis bioinformático se observó que tenía conservados los motivos de una secuencia en común con los venenos de serpiente (snake en inglés) y es por eso que se nombró “Snakin-I” (Segura et al., 1999); mientras que su agrupación con el dominio GASA es basado en la alta homología de secuencia de aminoácidos en la región C-terminal con péptidos de la familia GASA (Gibberellic Acid-Stimulated in Arabidopsis) (Berrocal-Lobo et al., 2002; Zhang & Wang, 2016). Cardillo, et al., (2020) menciona que las snakinas se componen de 70 a 90 aminoácidos y presentan 12 cisteínas y se unen formando puentes disulfuro de la forma ver figura 3 Cys1-Cys9, Cys2-Cys7, Cys3-Cys4, Cys5-Cys11, Cys6-Cys12 y Cys8-Cys10 (Berrocal-Lobo et al., 2002).

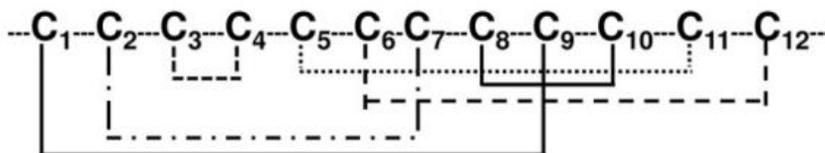


Figura 3: Puentes disulfuro en la Snakin-1 de *Solanum tuberosum*. Se puede apreciar los posibles puentes disulfuro entre las presentes en el péptido. Tomado de Berrocal-Lobo et al., 2002)

Los genes de la familia GASA/ Snakin codifican proteínas pequeñas en las que se pueden definir tres dominios distintos: (1) un péptido señal putativo de 18 a 29 residuos, (2) una región variable en la composición de aminoácidos como en la longitud de la secuencia y (3) una región C-terminal de aproximadamente 60 aminoácidos que contiene 12 residuos de cisteína en posiciones conservadas denominado dominio GASA ver figura 4 (Mao et al., 2011).

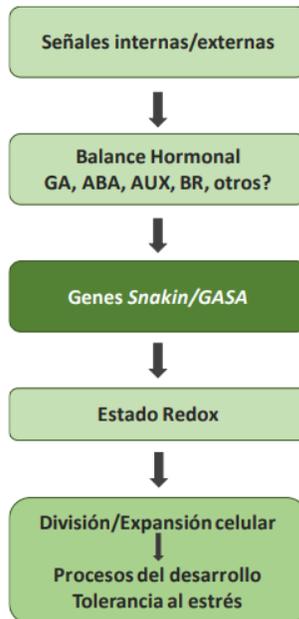


Figura 5: Participación de las snakinas en procesos fisiológicos. Se puede observar que la expresión de los péptidos GASA/SNAKINA puede ser regulada en respuesta a diversas señales que tienen como finalidad la tolerancia a un tipo de estrés. Recuperado de Rodríguez-Decuadro, 2018).

2.4 Actividad antimicrobiana de las snakinas.

Al igual que el resto de las PAMs, las snakinas tienen un amplio espectro en contra de patógenos bacterianos y fúngicos, como lo reporta (Daneshmand et al., 2013) en su investigación de una Snakina-Z proveniente de los frutos de *Zizyphus jujuba* que demostró tener una actividad contra bacterias y hongos a concentraciones en un rango de 8 a 25 mg/mL a ver tabla 1.

Microorganismo	MIC (mg/mL)
<i>E. coli</i>	13.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14.1
<i>B. subtilis</i>	24.2
<i>S. aureus</i>	28.8
<i>A niger</i>	9.3
<i>C. albicans</i>	8.23
<i>P. azadirachtae</i>	7.65
<i>P. ultimum</i>	8.36

Tabla 1: Concentración mínima inhibitoria de Snakina-Z. Se puede apreciar que las bacterias Gram negativas son más sensibles que las bacterias Gram positivas.

Poco se sabe aún sobre de su mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos (Rodríguez-Decuadro, 2018), se cree que al igual que los demás péptidos antimicrobianos las snakinas generan daño de membrana, debido a que su carga positiva y tamaño les permite insertarse en los lípidos de las membranas de los microorganismos y por interacciones electrostáticas genera poros y se explica en tres modelos ver figura 6: Modelo barril, modelo toroidal y modelo carpeta (Luo & Song, 2021).

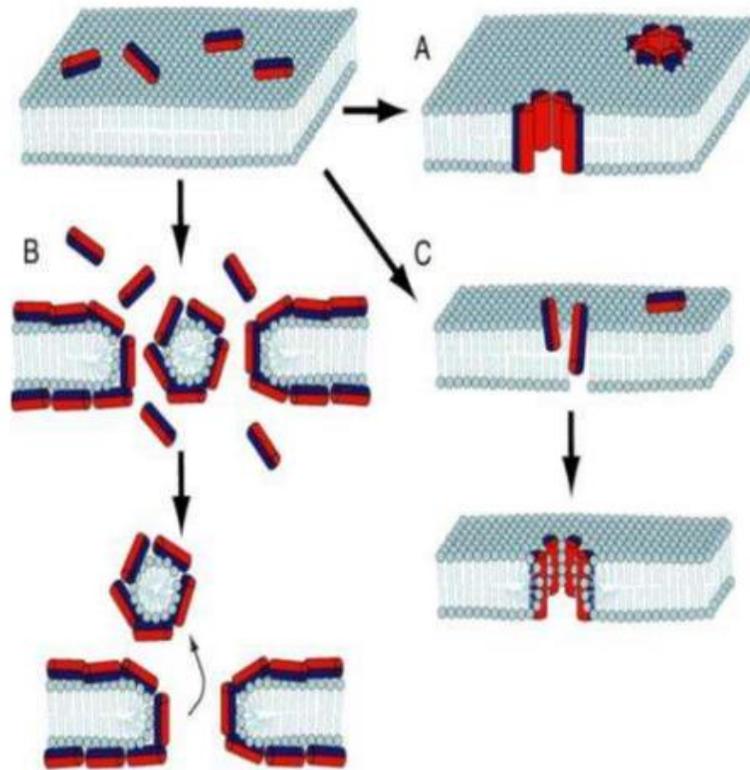


Figura 6: Mecanismos de acción de Snakinas con las membranas plasmáticas. A) Modelo de barril: la snakina se orienta perpendicularmente en la membrana formando canales hidrofílicos; B) Modelo carpeta: el péptido se orienta hacia el núcleo hidrofóbico causando micelas y colapsando la membrana; c) Modelo toroidal: el PAMs hace complejo con los fosfolípidos causando una ruptura de membrana.

2.5 Clasificación y estructura de las Snakinas

Las snakinas se pueden clasificar en tres subfamilias, numeradas del I al III, esto de acuerdo con la alineación de los aminoácidos de su secuencia (Porto & Franco, 2013). Los nombres de la clasificación fueron asignados a partir del descubrimiento de estos PAMS y la primera snakina aislada fue nombrada Snakin-I y por consiguiente el segundo péptido con las mismas características aislada en la papa (*Solanum tuberosum*) fue Snakin-II (Kuddus et al., 2016).

La Snakina I y la Snakina II son los únicos miembros purificados, mientras que la subfamilia III no ha sido aislada de *Solanum tuberosum*. Hasta 2016 no había un modelo de la familia de las snakinas por lo que se utiliza de referencia un modelado computacional que muestra la estructura tridimensional del péptido SN-I (figura 7), hasta que Yeung et al., (2016) determinó la primera estructura de la superfamilia GASA/snakina, mediante síntesis química total y cristalografía de rayos X de la proteína (figura 8).

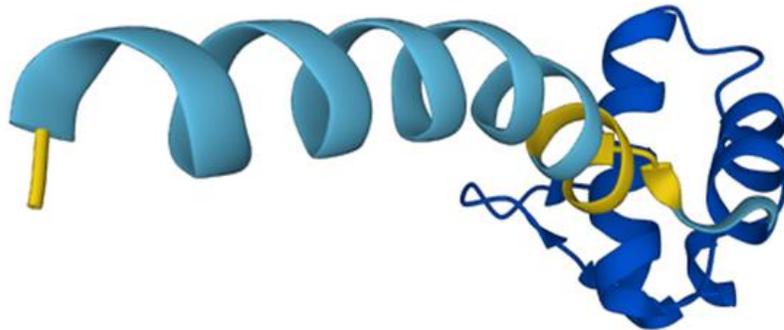


Figura 7: Estructura 3D de Snakin-1 de *Solanum tuberosum*. Estructura de la primera Snakina reportada en 1999 por Segura et al., Tomado de UniProt (Q948Z4).

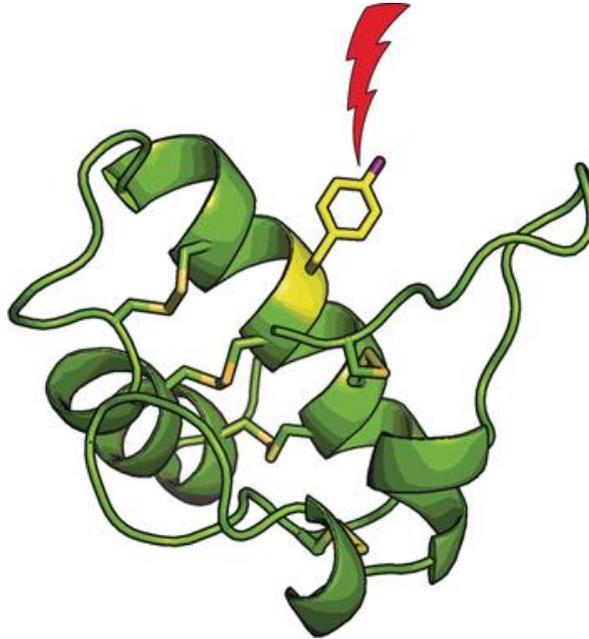


Figura 8: Estructura 3D de la familia de las Snakinas. Primer reporte de la estructura obtenida por Yeung et al. en el 2016

2.6 Snakinas en *Phaseolus vulgaris*

Bindschedler et al., (2006) reporta un péptido proveniente de *P. vulgaris* de 6.8 kDa formado por 64 aminoácidos y que contenía 12 cisteínas; una característica compartida y conservada dentro de las este snakinas, posteriormente realizo un blatsP ver figura 9, donde se comprobó la similitud que tiene con snakin-2 de *Solanum tuberosum*.

1	LQQIDCNGACGARCLSSRPNLCKRACGTCCQRCNCVPPGTSNGQEMPCYASLTTRGGKRKCP	64
2	YKKIDCGGACAARCLSSRPRLCNRACGTCCARCNCVPPGTSNGTETPCYASLTTHGNKRKCP	104

Figura 9: Alineación de la secuencia de aminoácidos del péptido proveniente del frijol con la de Snakin-2 de la papa. Se puede apreciar que el péptido proveniente del frijol tiene una identidad del 85 % con la snakina-2, Tomada y modificada (Bindschedler et al., 2006).

Vergara García (2023) realizó una búsqueda de las secuencias putativas de las snakinas en el genoma de *Phaseolus vulgaris*, donde localizó 25 secuencias ver tabla 2, similares a Snakina-1 de *Solanum tuberosum*; además un análisis del transcriptoma del frijol reportado por O'Rourke et al. (2014), se buscaron estas secuencias para determinar si presentaban una expresión diferencial en el proceso de nodulación y se encontró una

secuencia la cual se nombró “Snakina 25” y fue clonada en un vector pENTRD ver figura 10.

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

Tabla 2: Familia de las snakinas en *Phaseolus vulgaris* Recuperado de: Vergara García (2023).

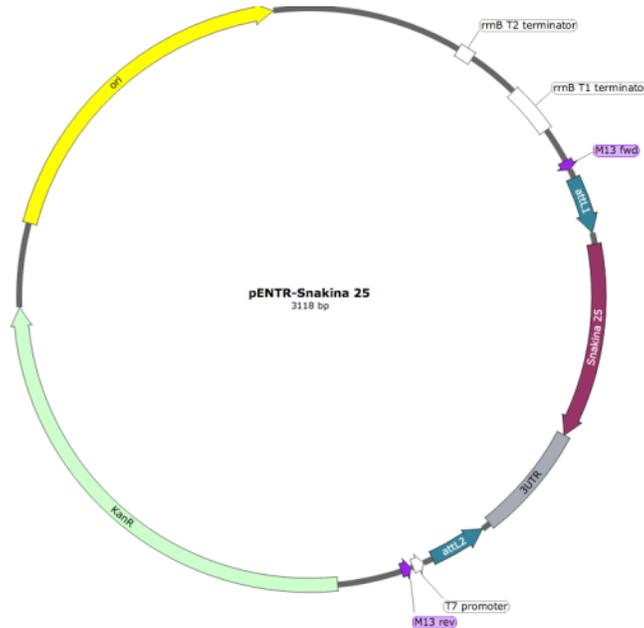


Figura 10: Mapa de la construcción del plásmido pENTRD-SNAKINA25. Se puede apreciar la secuencia codificante de la snakina en color guinda y el 3UTR en gris.

2.7 *Phaseolus vulgaris*

El frijol común pertenece a la familia Fabacea, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae, y especie *Phaseolus vulgaris* (Lara-Flores, 2015) es la leguminosa más importante para el consumo humano a nivel mundial y una importante fuente de proteína vegetal, minerales, antioxidantes y compuestos bioactivos.

Lara-Flores (2015) menciona que en México se cultivan cerca de 70 variedades de frijol que se distribuyen en siete grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. Las variedades de mayor consumo son: azufrado, mayocoba, negro jamapa, peruano, flor de mayo y junio.

El 74% de la siembra total de frijol en México se realiza en los siguientes estados: Zacatecas, Durango, Chiapas, Chihuahua, Sinaloa y San Luis Potosí. (Lara-Flores, 2015).

El frijol tiene la capacidad de asociarse con *Rhizobium*, donde las bacterias provocan la formación de nódulos en la raíz, o en ocasiones en el tallo, órganos de la planta dedicados a la fijación y asimilación de nitrógeno, el cual constituye la fuente de nitrógeno que permite el crecimiento de la planta. (Masson-Boivin et al., 2009).

Los estreses bióticos que afectan al frijol común incluyen numerosas enfermedades bacterianas, fúngicas y virales y varias plagas de insectos y nematodos, y los estreses abióticos incluyen sequía, calor, frío y deficiencias o toxicidades de nutrientes del suelo (Assefa et al., 2019).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioingeniería y Biología Computacional perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Localizado en la ciudad de Saltillo, Coahuila de Zaragoza. Con una latitud de 25° 35' 19.95'' N, longitud de 101° 1' 53.06'' O.

3.2 Extracción del plásmido (pENTRD-Snakina25)

El plásmido se purificó mediante el kit de extracción de plásmidos FavorPrep™ de Favor Gen™ utilizando el protocolo que otorgó la empresa. Se transfirieron 5 mL del cultivo (*E.coli* que porta el vector pENTRD snakina25) y se centrifugó por 1 minuto a 10,000 xg, desechó el sobrenadante para obtener el pellet de las células y se agregó 200 µL de FAPD1 Buffer para resuspender con ayuda de una pipeta, posteriormente se añadió 200 µL de FAPD2 Buffer y hacer de 5 ~10 inversiones del tubo Eppendorf® y se incubó de 2 a 5 minutos en temperatura ambiente, se agregaron 300 µL de FAPD3 Buffer e invertir el tubo de 5 ~ 10 veces para neutralizar y centrifugar a máxima velocidad (~ 10,000 xg), el sobrenadante fue transferido a una columna FAPD, se centrifugó a 10,000 xg durante 30 s, Se añadieron 400 µL del Buffer WP a la columna FAPD y se centrifugó a 10,000 xg por 30 s. Consecutivamente, se añadieron 500 µL de Buffer de lavado a la columna FAPD, y se centrifugó a 10,000 xg, por 30 s. se rescató el sobrenadante y luego se centrifugó a 10,000 xg, durante 3 min. Se recolectó el contenido en un tubo nuevo agregando 500 µL del WF Buffer al centro de la membrana de la columna FAPD. Se dejó reposar la columna durante 1 min con 100µL. Por último, se centrifugó a máxima velocidad, durante 1 min para la elución del ADN plasmídico, y se almacenó a -20 ° C.

3.4 Recombinación entre el vector PENTRD-Snakina25 y el pH7WG2tdT

La recombinación del vector pENTRD-SNAKINA25 con el vector binario de sobreexpresión pH7WG2tdT (figura 11) se realizó con la enzima LR Clonase (Invitrogen™), utilizando el protocolo que otorgó la empresa. En un tubo de 1.5 mL se colocaron 100ng/μL del vector pENTRD-SNAKINA25 y 100ng/μL del vector pH7WG2tdT, con 6 μL del tampón TE que tiene un pH 8; Posteriormente se adicionan 2 μL de la LR clonasa que previamente fue descongelada en hielo y agitado en vortex. La mezcla de reacción se dejó incubar por 1 hora a 25°C, terminada la incubación se le agregaron 1 μL de proteinasa K por 10min a 37°C.

3.5 Transformación de *A. rhizogenes*

1. A partir de la reacción de LR entre el vector pENTRD-Snakina25 y el pH7WG2tdT se tomaron 8 μL de la reacción y se colocaron en un tubo Eppendorf 1.5mL, posteriormente se puso a incubar por 5 minutos en hielo.
2. Pasando el tiempo indicado se agregaron los 8 μL a las de células quimio-competentes de *A. rhizogenes* (K599) y se incubaron en hielo por 30 minutos.
3. Después del tiempo de incubación se sumerge el tubo Eppendorf en agua a 42°C por 1 minuto para generar un choque térmico, y transcurrido el minuto en el agua se regresa al hielo.
4. Seguido se le agregan 600μL de medio LB y se incuba por 1 hora en a 30°C a en una agitación 80rpm.
5. Al término de la incubación se toman 100 de las células y se asperjan utilizando perlas de vidrio estéril en una placa Petri con medio solido LB con kanamicina a100ng/μL y se dejan incubar a 30°C por 24hr .

3.6 Selección de colonias de clonas que portan el PH7WG2tdT-Snakina25 por PCR

Las posibles colonias positivas se analizaron por PCR en colonia. Las colonias a analizar se resuspendieron en 100µL de agua destilada estéril en un tubo eppendorf y se lisaron por choque térmico 10 min a 98°C y posteriormente 1 min a 24°C; el lisado celular se centrifugó a 10,000 xg durante 5 min y se tomaron 8µL del sobrenadante para utilizarlo como molde en la mezcla de la reacción de PCR (tabla 3) en un volumen de 20µL. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: un ciclo de inicial de 95°C durante 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, de alineamiento a 60°C 20 segundos, de extensión a 72°C 2 min y de extensión final a 72°C por 30 segundos. Como molde del control positivo se utilizó el fragmento purificado o el DNA plasmídico según fuera el caso y como control negativo no se colocó molde al tubo de la reacción correspondiente. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.2% con GelRed en buffer TAE (Tris-acetato- EDTA) a 80 volts durante 30 min y la imagen se adquirió en un transiluminador con luz UV y la imagen se digitalizó con el programa ImagenJ ver 1.53.

Reactivo	Volumen (µL)
Master Mix	10
Forward (Fw)	1
Reverse (Rv)	1
cDNA	1
H ₂ O	7

Tabla 3: Mezcla de reactivos para PCR

Primer	Nombre	Secuencia	TM (°C)	GC (%)
Fw	RNAi	CACCGAGGACCCAAATGCCCTTGAA	56	56
Rv	4810	GAGAGGACTCCGGTATTTTACAACAAT	58	39

Tabla 4: Características de los primers diseñados por Vergara García (2023)

3.7 Transformación de *Phaseolus vulgaris*

Para la transformación de *Phaseolus vulgaris* se utilizó el protocolo planteado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Estrada et al.,2007) realizándole algunas modificaciones de acuerdo con las observaciones que se vieron durante la experimentación.

Lavado de las semillas

1. Se colocaron entre 100 y 150 semillas en un matraz y se enjuagan dos veces con 100 mL de agua estéril.
2. Posteriormente se agregan 100 mL de hipoclorito de sodio a 20% y se dejó en reposo por 5 minutos
3. Pasados los 5 minutos se descarta el hipoclorito de sodio y se enjuagar cuatro veces con agua estéril.

Germinación de las semillas

1. La germinación se lleva a cabo en una charola de acero inoxidable, a la que se le coloca previamente coloca papel secante al interior y se cubre con aluminio, para posteriormente esterilizarla en autoclave.
2. Ya teniendo la charola estéril esta se lleva a la campana de flujo laminar donde se le retira el aluminio y se agrega agua estéril al papel, para que sirva de cama a las semillas.
3. Consecutivamente se colocan los frijoles con las pinzas estériles intercalándolos entre filas como se muestra en la figura 9.
4. Finalmente se cubren con el mismo aluminio estéril y se incuban de 2-3 días en oscuridad con una temperatura de entre 25 y 28°C.



Figura 12. Método de germinación de semillas de *P. vulgaris*. a) charola estéril donde se germinarán las semillas; b) Semillas después de 3 días incubación ya germinadas

Infección del frijol con *A. rhizogenes* que porta la construcción pH7WG2tdT-Snakina25

1. Previamente a la germinación de los frijoles (*P. vulgaris*), las clonas de *A. rhizogenes* K599 son sembradas en cajas Petri con medio LB y agar, adicionado con espectinomicina a 50 ug/mL.
2. Primero se hace una solución nutritiva de Fahraeus médium (Fahraeus, 1957) con agua estéril y sales (Tabla5).
3. Posteriormente, se toman tubos falcón de 15 mL y se les hace una tapa de aluminio con dos orificios; estos tubos a su vez se colocan dentro de los tubos de ensayo de 100 mL y se esterilizan en autoclave.
4. Después se llena hasta la mitad el tubo de ensaye con el medio, que servirá para que proporcione la humedad necesaria y permita crear un microambiente; el tubo Falcon se llenará por completo a través de los orificios pequeños y servirá como fuente de agua y sales a la semilla.

5. Con la semilla ya germinada, con una raíz de 1 cm se realizarán heridas pequeñas en la raíz lo más cercano posible a los cotiledones como se ejemplifica en la figura 10.
6. Después con ayuda de una punta estéril se agrega una capa del inóculo en la zona en la que se realizó la herida.
7. Una vez teniendo el frijol infectado con la bacteria se coloca en la tapa de aluminio del tubo Falcon pasando la raíz en uno de los orificios asegurándose que tenga contacto con el medio.
8. Finalmente se coloca la tapa del tubo grande y se llevan a incubar hasta que se observe a formación de callo en la zona de la herida (el cual debe de desarrollarse en los 7 días posteriores a la infección).

Componente	Concentración mg/ml
CaCl₂.2H₂O	114
MgSO₄.7H₂O	120
Citrato Férrico	5
KH₂PO₄	100
Na₂HPO₄	150
KCl	3,73
H₃BO₃	1,55
MnSO₄.H₂O	0,85
CuSO₄.5H₂O	0,13
ZnSO₄.7H₂O	0,58
Na₂MoO₄.2H₂O	0.018

Tabla 5: Sales del medio Fahraeus para 1L de solución madre



Figura 13. Método de infección de *Phaseolus vulgaris* con *A. rhizogenes*. a) Selección de la semilla con tres días de germinación y con raíz mayor a 1cm; b) realización de herida cerca del cotiledón; c) infección en la herida con *A. rhizogenes*; d) acomodo del frijol en los tubos para incubación

IV. RESULTADOS

4.1 Extracción del plásmido (pENTRD-Snakina25)

Para la realización de la reacción de recombinación fue necesario partir de un DNA plasmídico fresco, el cual se extrajo a partir de la clona que fue secuenciada y se le realizó una PCR como se describe en el trabajo de Vergara García (2023) obteniendo en la electroforesis fragmentos de DNA con el tamaño reportado (Figura 13)

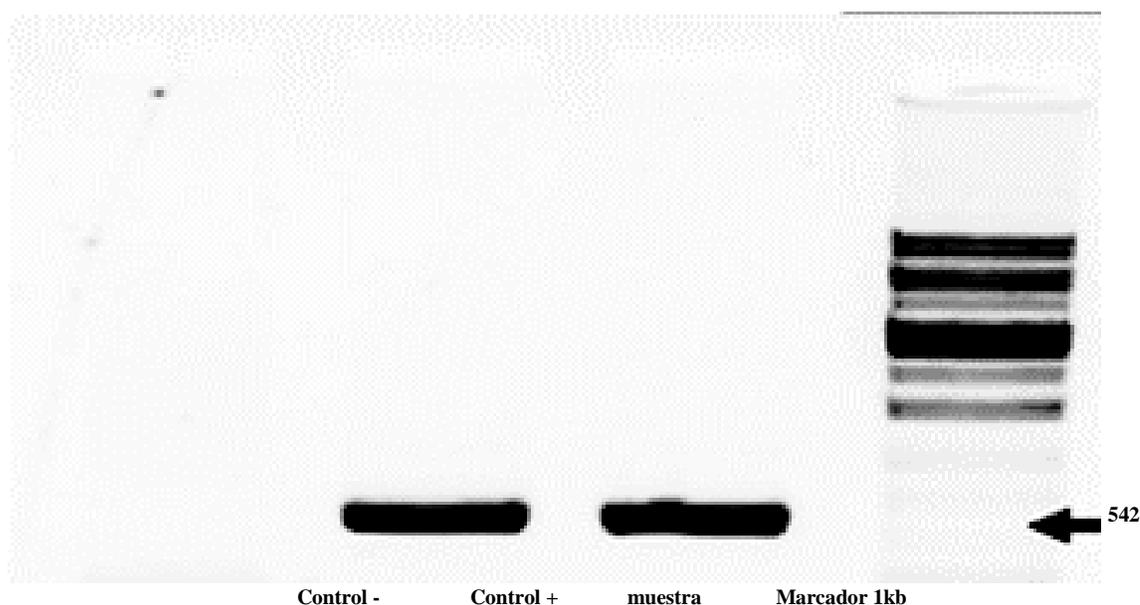


Figura 14: Corrimiento Electroforético en gel de agarosa de la PCR a partir del plásmido pENTRD-Snakina25; en el carril uno encontramos el Control(-), en el carril 2 se usó de Control(+) una secuencia conocida de aprox. el mismo tamaño que el plásmido, en el carril tres y cuatro los productos muestras del ADN plasmídico extraído y en el carril cinco un marcador molecular.

4.2 Transformación y selección de *A. rhizogenes* con el producto de la recombinación

Del producto de la recombinación entre el vector pENTRD-snakina25 y el binario pH7WG2tdT se obtuvieron varias clonas de *A. rhizogenes* (K599), las clonas fueron nombradas y numeradas con la nomenclatura C#, de estas clonas se les realizó una PCR en colonia como método de selección, siguiendo el protocolo ya descrito anteriormente

y se realizó una electroforesis para comprobar que las clonas portadoras del plásmido (figura 15).

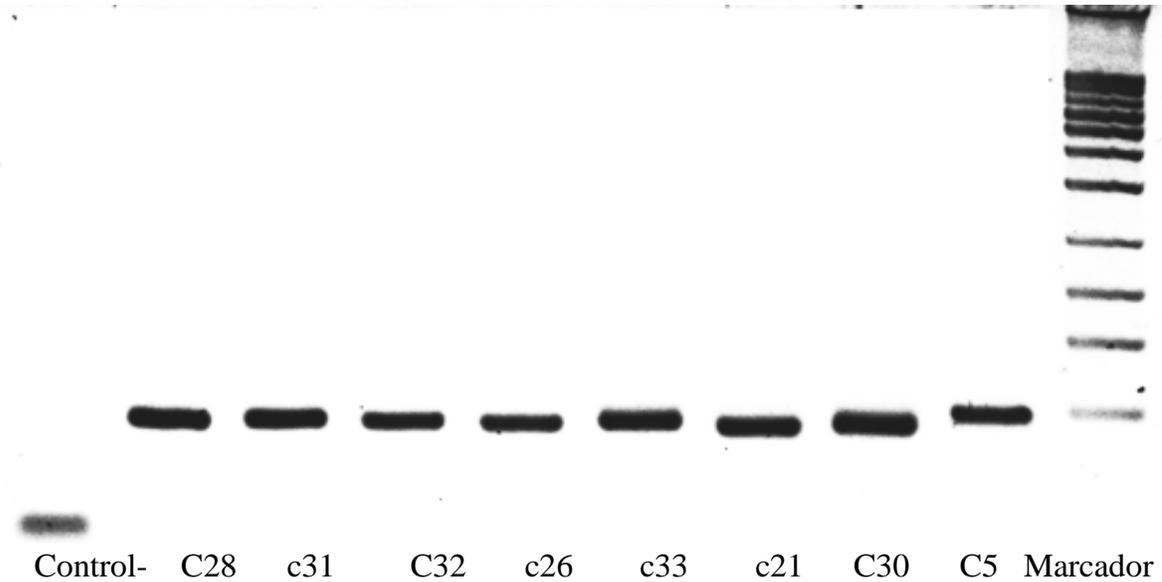


Figura 15: Corrimiento electroforético de los productos de PCR en colonia. Comprobación de portación del plásmido PH7WG2TDT-Snakina25 en las colonias obtenidas; en el carril uno encontramos el control-, en los carriles del dos al diez encontramos la clonas seleccionadas y en el último carril un marcador molecular de 1Kb.

4.3 Transformación de *P. vulgaris* con *A. rhizogenes* que porta la construcción pH7WG2tdT-Snakina25

La desinfección, germinación y transformación de *P. vulgaris* se siguió la metodología del Instituto de Biotecnología de la UNAM publicado por Estrada et al. (2007). Se realizaron 3 experimentos buscando la clona que presentara una buena eficiencia de transformación, de las clonas probadas hasta el momento no se han podido obtener “hairy roots”, solo la formación de callos sin aparecimiento de raíces en ellos (Tabla 6), por lo que se decidió utilizar el sistema de fluorescencia en los callos que generaron las clonas C25 y C8 para determinar la presencia del T-DNA. Lo que se observó fue que los callos de las plantas sí presentaban la fluorescencia (figura 16 y figura 17), lo que indica que la planta sí está transformada y sigue que la secuencia de la *snakina25*

al estar bajo el control de un promotor constitutivo puede intervenir con la generación de las raíces transgénicas.

Clonas	# de plantas	Formación de callo	Hairy roots
Experimento 1			
C22	8	3	0
C25	8	5	0
C8	8	6	0
Experimento 2			
C21	8	4	0
C24	8	4	0
C9	8	3	0
Experimento 3			
C4	8	4	0
C3	8	4	0
C1	8	5	0
C2	8	3	0

Tabla 6: Resultados de los experimentos realizados.

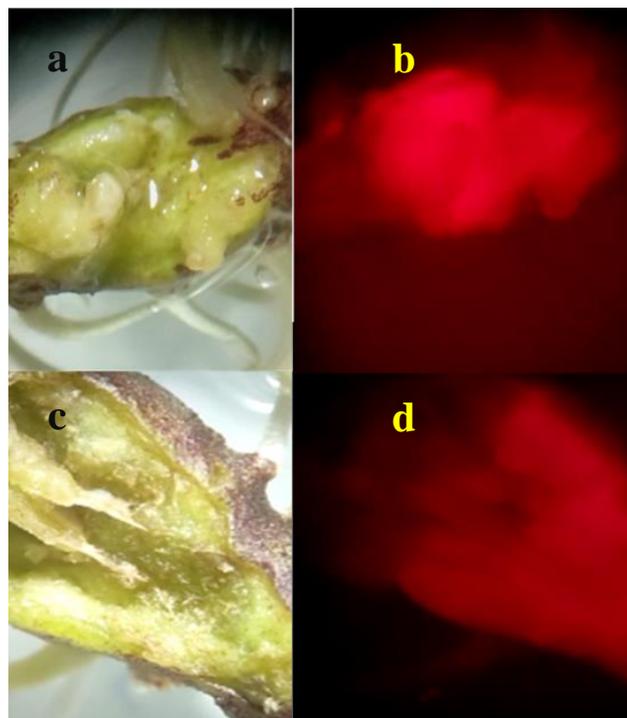


Figura 16: Callo visto por estereoscopio. Se utilizó con luz blanca y con el sistema de fluorescencia, se puede observar que la plana si esta transformada debido a que la fluorescencia indica la existencia del transgén reportero tdT en el callo. a) C8 bajo luz blanca, b) C8 con sistema de fluorescencia c)C25 con luz blanca d) C25 con fluorescencia.

V. CONCLUSIONES

Se logro realizar la recombinación entre el vector de entrada y el vector binario de plantas. Además, obtener la construcción final pH7WG2tdT-Snakina25 en los *A. rhizogenes*. Hasta el momento se han probado diez clonas de las cuales no se ha logrado la generación de las rices transgénicas y aunque los callos generados indican por fluorescencia la presencia del T-DNA no se ha logrado encontrar una clona con los requerimientos necesarios, debido a esto se siguiere aumentar el número clonas probadas y un cambio a transformación en alguna otra planta como puede ser *Nicotiana benthamiana*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Almasia, N. I., Nahirñak, V., Hopp, H. E., & Vazquez-Rovere, C. (2020). Potato Snakin-1: An antimicrobial player of the trade-off between host defense and development. *Plant Cell Reports*, 39(7), 839-849. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02557-5>
2. Ando, K., & Grumet, R. (2010). Transcriptional Profiling of Rapidly Growing Cucumber Fruit by 454-Pyrosequencing Analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(4), 291-302. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.4.291>
3. Assefa, T., Assibi Mahama, A., Brown, A. V., Cannon, E. K. S., Rubyogo, J. C., Rao, I. M., Blair, M. W., & Cannon, S. B. (2019). A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 39(2), 20. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0920-0>
4. Aubert, D., Chevillard, M., Dorne, A.-M., Arlaud, G., & Herzog, M. (1998). Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: The GASA4 gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Molecular Biology*, 36(6), 871-883. <https://doi.org/10.1023/A:1005938624418>
5. Ben-Nissan, G., Lee, J.-Y., Borohov, A., & Weiss, D. (2004). GIP, a *Petunia* hybrida GA-induced cysteine-rich protein: A possible role in shoot elongation and transition to flowering. *The Plant Journal*, 37(2), 229-238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01950.x>
6. Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F., & Molina, A. (2002). Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiology*, 128(3), 951-961. <https://doi.org/10.1104/pp.010685>
7. Bindschedler, L. V., Whitelegge, J. P., Millar, D. J., & Bolwell, G. P. (2006). A two component chitin-binding protein from French bean – association of a

- proline-rich protein with a cysteine-rich polypeptide. *FEBS Letters*, 580(6), 1541-1546. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.079>
8. Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein and Peptide Letters*, 27(1), 4-16. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190822165812>
 9. Daneshmand, F., Zare-Zardini, H., & Ebrahimi, L. (2013). Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits. *Natural Product Research*, 27(24), 2292-2296. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.827192>
 10. De Caleyra, R. F., Gonzalez-Pascual, B., García-Olmedo, F., & Carbonero, P. (1972). Susceptibility of Phytopathogenic Bacteria to Wheat Purothionins In Vitro. *Applied Microbiology*, 23(5), 998-1000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380489/>
 11. dos Santos-Silva, C. A., Zupin, L., Oliveira-Lima, M., Vilela, L. M. B., Bezerra-Neto, J. P., Ferreira-Neto, J. R., Ferreira, J. D. C., de Oliveira-Silva, R. L., Pires, C. de J., Aburjaile, F. F., de Oliveira, M. F., Kido, E. A., Crovella, S., & Benko-Iseppon, A. M. (2020). Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. *Bioinformatics and Biology Insights*, 14, 1177932220952739. <https://doi.org/10.1177/1177932220952739>
 12. Erdem Büyükkiraz, M., & Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1573-1596. <https://doi.org/10.1111/jam.15314>
 13. Fang, Y., Mei, H., Zhou, B., Xiao, X., Yang, M., Huang, Y., Long, X., Hu, S., & Tang, C. (2016). De novo Transcriptome Analysis Reveals Distinct Defense Mechanisms by Young and Mature Leaves of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep33151>
 14. Favor Gen. (s. f.). *Favor Gen.* Favor Gen. Recuperado 12 de abril de 2023, de http://www.favorgen.com/port_pro1.php?type_1=pro_v_p11&id_1=dis15b99c2ef8c06b

15. *Gibberellic Acid-Stimulated Arabidopsis6 Serves as an Integrator of Gibberellin, Abscisic Acid, and Glucose Signaling during Seed Germination in Arabidopsis* / *Plant Physiology* / *Oxford Academic*. (s. f.). Recuperado 11 de abril de 2023, de <https://academic.oup.com/plphys/article/169/3/2288/6114366?login=false>
16. Hammami, R., Ben Hamida, J., Vergoten, G., & Fliss, I. (2009). PhytAMP: A database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_1), D963-D968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn655>
17. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.582779>
18. Karavidas, I., Ntatsi, G., Vougeleka, V., Karkanis, A., Ntanasi, T., Saitanis, C., Agathokleous, E., Ropokis, A., Sabatino, L., Tran, F., Iannetta, P. P. M., & Savvas, D. (2022). Agronomic Practices to Increase the Yield and Quality of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Systematic Review. *Agronomy*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020271>
19. Kuddus, Md. R., Rumi, F., Tsutsumi, M., Takahashi, R., Yamano, M., Kamiya, M., Kikukawa, T., Demura, M., & Aizawa, T. (2016). Expression, purification and characterization of the recombinant cysteine-rich antimicrobial peptide snak1-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 122, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.02.002>
20. Lara-Flores, M. (2015). *El cultivo del frijol en México*. 16(2). <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art09/>
21. Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. (2019). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 3919-3931. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6684887/>
22. Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: Structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>

23. Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
24. Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(9), 4259-4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
25. Mao, Z., Zheng, J., Wang, Y., Chen, G., Yang, Y., Feng, D., & Xie, B. (2011). The new CaSn gene belonging to the snakins family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. *Phytoparasitica*, 39, 151-164. <https://doi.org/10.1007/s12600-011-0149-5>
26. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: How many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10), 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004>
27. Moyano-Cañete, E., Bellido, M. L., García-Caparrós, N., Medina-Puche, L., Amil-Ruiz, F., González-Reyes, J. A., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., & Blanco-Portales, R. (2013). FaGAST2, a Strawberry Ripening-Related Gene, Acts Together with FaGAST1 to Determine Cell Size of the Fruit Receptacle. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), 218-236. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs167>
28. Nahirñak, V., Almasia, N. I., Fernandez, P. V., Hopp, H. E., Estevez, J. M., Carrari, F., & Vazquez-Rovere, C. (2012). Potato Snakin-1 Gene Silencing Affects Cell Division, Primary Metabolism, and Cell Wall Composition. *Plant Physiology*, 158(1), 252-263. <https://www.jstor.org/stable/41435458>
29. Nahirñak, V., Almasia, N. I., Hopp, H. E., & Vazquez-Rovere, C. (2012). Snakin/GASA proteins: Involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis. *Plant Signaling & Behavior*, 7(8), 1004-1008. <https://doi.org/10.4161/psb.20813>
30. Oliveira-Lima, M., Benko-Iseppon, A. M., Neto, J. R. C. F., Rodriguez-Decuadro, S., Kido, E. A., Crovella, S., & Pandolfi, V. (2017). Snakin:

Structure, Roles and Applications of a Plant Antimicrobial Peptide. *Current Protein & Peptide Science*, 18(4), 368-374. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160619183140>

31. O'Rourke, J. A., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., Jackson, S. A., McClean, P. E., Li, J., Dai, X., Zhao, P. X., Hernandez, G., & Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC Genomics*, 15(1), 866. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866>
32. Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 143-171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
33. Porto, W. F., & Franco, O. L. (2013). Theoretical structural insights into the snakins/GASA family. *Peptides*, 44, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.014>
34. Rodríguez-Decuadro, S. B. (2018). *Prospección de defensinas y esnaquinas de plantas nativas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos* [Tesis de doctorado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/23266>
35. Roxrud, I., Lid, S. E., Fletcher, J. C., Schmidt, E. D. L., & Opsahl-Sorteberg, H.-G. (2007). GASA4, One of the 14-Member Arabidopsis GASA Family of Small Polypeptides, Regulates Flowering and Seed Development. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 471-483. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm016>
36. Rubinovich, L., Ruthstein, S., & Weiss, D. (2014). The Arabidopsis Cysteine-Rich GASA5 Is a Redox-Active Metalloprotein that Suppresses Gibberellin Responses. *Molecular Plant*, 7(1), 244-247. <https://doi.org/10.1093/mp/sst141>
37. Salas, C. E., Badillo-Corona, J. A., Ramírez-Sotelo, G., & Oliver-Salvador, C. (2015). Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *BioMed Research International*, 2015, e102129. <https://doi.org/10.1155/2015/102129>
38. Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., & García-Olmedo, F. (1999). *Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens*. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.1.16>

39. Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, *14*(1), 55-67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)
40. Vergara García, B. J. (2023). *Identificación y clonación de una Snakina de Phaseolus vulgaris expresada diferencialmente en el proceso de nodulación* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/49033/K%2068301%20Vergara%20Garc%c3%ada%2c%20B%c3%a1rbara%20Judith.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
41. Wang, S., Zeng, X., Yang, Q., & Qiao, S. (2016). Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijms17050603>
42. Wijaya, R., Neumann, G. M., Condron, R., Hughes, A. B., & Polya, G. M. (2000). Defense proteins from seed of Cassia fistula include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science*, *159*(2), 243-255. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00348-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00348-4)
43. Yeung, H., Squire, C. J., Yosaatmadja, Y., Panjekar, S., López, G., Molina, A., Baker, E. N., Harris, P. W. R., & Brimble, M. A. (2016). Radiation Damage and Racemic Protein Crystallography Reveal the Unique Structure of the GASA/Snakin Protein Superfamily. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *55*(28), 7930-7933. <https://doi.org/10.1002/anie.201602719>
44. Zhang, S., & Wang, X. (2016). One new kind of phytohormonal signaling integrator: Up-and-coming GASA family genes. *Plant Signaling & Behavior*, *12*(2), e1226453. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1226453>