

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



**Anotación y análisis transcriptómico de la familia de genes de la Malato
Deshidrogenasa en *Phaseolus vulgaris* en el proceso simbiótico**

Por:

JUAN FELICIANO GONZÁLEZ RAMA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Anotación y análisis transcriptómico de la familia de genes de la Malato
Deshidrogenasa en *Phaseolus vulgaris* en el proceso simbiótico

Por:

JUAN FELICIANO GONZÁLEZ RAMA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA

Aprobada por Comité de Asesoría:



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Asesor principal



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Co-Asesor



Dra. Aida Isabel Leal Robles
Co-Asesor



Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Co-Asesor

Saltillo, Coahuila, México

Junio 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Anotación y análisis transcriptómico de la familia de genes de la Malato
Deshidrogenasa en *Phaseolus vulgaris* en el proceso simbiótico

Por:

JUAN FELICIANO GONZÁLEZ RAMA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Jurado Examinador:

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Presidente

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Vocal

Dra. Aida Isabel Leal Robles
Vocal

Dra. Erika Nohemi Rivas Martínez
Vocal Suplente



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

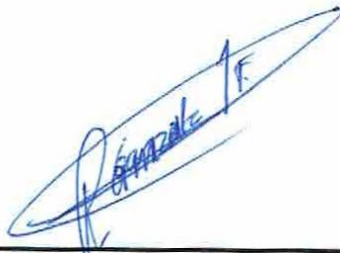
Saltillo, Coahuila, México.

Junio 2024

DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

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

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



Juan Feliciano González Rama
Pasante de Ingeniero en Biotecnología

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi alma mater, por brindarme todo lo necesario para mi formación, sobre todo techo y alimento.

Al **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes** por darme la oportunidad de trabajar con él, compartir sus conocimientos y apoyarme durante mi formación y al **Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo**, por darme la oportunidad de ser parte del **Laboratorio de Bioingeniería Molecular y Bioinformática**.

A todos los **profesores** que formaron parte de mi aprendizaje, por su tiempo y dedicación, sobre todo a aquellos que se tomaron el tiempo para motivarnos y seguir adelante.

A mi **familia, amigos y compañeros**, por brindarme su apoyo durante cada día de esta etapa, en especial a todos aquellos que alguna vez me tendieron la mano.

DEDICATORIAS

*A mis padres, la Sra. **María del Carmen Rama** y el Sr. **Luis González**, por su apoyo incondicional, motivarme a ser mejor cada día, por su amor hacia mí, por darme todo lo que estaba a su alcance y sobre todo por nunca darse por vencidos, aun en los peores momentos.*

*A mis hermanos, **María Teresa, María del Carmen, Andrea, Luis, Estrella Guadalupe y Jesús Melquiades**, por de una u otra manera apoyarme y motivarme a ser mejor cada día.*

*A mis sobrinos, **Francisco, Timoteo, Juan Enrique, Leticia, Luis Mateo, Carmen Teresa, José Zacarías y Lucas Tadeo**.*

*A todos aquellos **familiares** que de alguna manera me brindaron su apoyo durante toda esta etapa, en especial a mis tíos, **Rafael Aguilar y Macedonia Rama**.*

*A **Aline Michelle**, por su compañía, apoyo y motivación durante esta etapa.*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIAS	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
I. RESUMEN.....	X
II. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipótesis.....	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 Descripción general de las malato deshidrogenasas	4
1.1.2 La malato deshidrogenasa en procariotas	5
1.1.3 La malato deshidrogenasa en eucariotas	7
1.2 Descripción general de <i>Phaseolus vulgaris</i> y su importancia productiva en México	10
1.3 Vía de señalización simbiótica común, nodulación y micorrización arbuscular ...	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 Identificación de los genes y localización cromosómica de las MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	15
4.2 Predicción de localización subcelular y parámetros fisicoquímicos.....	16
4.3 Análisis filogenético de las MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	16
4.4 Análisis de sintenia de las MDH de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Glycine max</i>	17
4.5 Determinación de los elementos <i>cis</i> -reguladores y la expresión de las MDHs en el proceso de nodulación y micorrización arbuscular.....	17
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
5.1 Identificación de los genes y localización cromosómica de las MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	19
5.2 Predicción de localización subcelular y parámetros fisicoquímicos.....	21
5.4 Análisis de sintenia de las MDH de <i>Phaseolus vulgaris</i>	28
5.5 Determinación de los elementos <i>cis</i> -reguladores y la expresión de MDH en el proceso simbiótico.	29
VI. CONCLUSIONES	36
VII. LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de malatos deshidrogenasas (MDHs) en microorganismos.....	6
Tabla 2: Cepas de <i>Rhizobium etli</i> y sus características.....	18
Tabla 3: Identificación y renombramiento de los genes MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	20
Tabla 4: Predicción de localización subcelular de las MDH identificadas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	23
Tabla 5: Predicción de los parámetros fisicoquímicos de las MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
Tabla 6: Clasificación de los elementos <i>cis</i> -reguladores encontrados en las regiones promotoras de las MDH identificadas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reacción catalizada por Malato deshidrogenasa RHEA: 21432	4
Figura 2: Estructura cristalizada de malato deshidrogenasa en procariotas	5
Figura 3: Mdh2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el ciclo del glioxilato	7
Figura 4: Modelo del flujo trabajo de malato en <i>Arabidopsis thaliana</i> entre varios compartimentos subcelulares	8
Figura 5: El ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa	9
Figura 6: <i>Phaseolus vulgaris</i>	11
Figura 7: Producción de frijol en el ciclo primavera-verano	12
Figura 8: Producción de frijol en el ciclo otoño-invierno	12
Figura 9: Vía común de SYM para la micorrización y nodulación	14
Figura 10: Determinación de los dominios Ldh_1_N y Ldh_1_C en las MDH de <i>Phaseolus vulgaris</i>	20
Figura 11: Localización cromosómica de las MDH en <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
Figura 12: Alineamiento de las MDHs identificadas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	26
Figura 13: Árbol filogenético de las MDH de <i>Phaseolus vulgaris</i>	27
Figura 14: Análisis de sintenia entre las MDH identificadas en <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Glycine max</i>	28
Figura 15: Distribución de los elementos <i>cis</i>-reguladores en las secuencias MDH identificadas en <i>Phaseolus vulgaris</i>	31
Figura 16: Análisis de expresión de las PvMDH en tejidos aéreos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	33
Figura 17: Análisis de expresión de las PvMDH en tejidos de raíz y nódulos en <i>Phaseolus vulgaris</i>	34
Figura 18: Análisis de expresión de las PvMDH en nodulación y micorrización	35

I. RESUMEN

La malato deshidrogenasa (MDH) es una enzima conservada evolutivamente y presenta diferentes isoformas. Es una enzima importante que tiene un papel en diferentes procesos bioquímicos de la célula, principalmente en la producción de energía durante el ciclo de Krebs y la ubicación subcelular de las isoenzimas puede variar, en eucariotas se sabe que se localiza en la mitocondria, en el citoplasma y en plantas se ha encontrado en el cloroplasto, el glioxisoma y el peroxisoma. Las malato deshidrogenasas catalizan la interconversión de malato a oxalacetato utilizando NAD como cofactor a excepción de la isoforma plastidial, la cual se sabe que utiliza NADP como cofactor. Las leguminosas son relevantes en varios aspectos ya que pueden ser una fuente importante de proteínas y minerales y pueden establecer relaciones simbióticas con bacterias y hongos presentes en el suelo. El cultivo de frijol en México tiene una relevancia cultural y económica, la anotación y función de las MDH en del frijol en el proceso simbiótico permitirá entender su posible función en el proceso de simbiótico. Se identificaron ocho secuencias con los dominios Ldh_1_N y Ldh_1_C, la distribución de los genes fue en cinco cromosomas. El análisis realizado en los transcriptomas relacionados a la simbiosis muestra que las PvMDH presentaron valores similares, independientemente del tratamiento, en donde PvMDH1 y PvMDH7 mostraron un valor bajo de lecturas, en contraste PvMDH6 y PvMDH8 mostraron siempre un valor alto, lo cual puede estar relacionado con su función, tipo de gen o localización subcelular, esto brinda una oportunidad para futuras investigaciones.

Palabras clave: Malato deshidrogenasa, *Phaseolus vulgaris*, familia génica, simbiosis, transcriptoma.

II. INTRODUCCIÓN

La malato deshidrogenasa (MDH) es una enzima conservada evolutivamente y presenta diferentes isoformas. Es una enzima importante que tiene un papel en diferentes procesos bioquímicos de la célula, principalmente en la producción de energía durante el ciclo de Krebs y la ubicación subcelular de las isoenzimas puede variar, en eucariotas se sabe que se localiza en la mitocondria, en el citoplasma y en plantas se ha encontrado en el cloroplasto, el glioxisoma y el peroxisoma. Hasta el momento cada una de estas isoenzimas se han reportado con propiedades bioquímicas diferentes (Gietl, 1992; Yudina, 2012).

Las malato deshidrogenasas catalizan la interconversión de malato a oxalacetato utilizando NAD como cofactor a excepción de la isoforma plastidial, la cual se sabe que utiliza NADP como cofactor, la reacción enzimática es controlada por la proporción disponible de sustrato/producto y de la cantidad de NAD/NADP (Hall *et al.*, 1992; Schreier *et al.*, 2018; Tomaz *et al.*, 2010). La isoenzima de MDH con localización citoplasmática se ha involucrado en el metabolismo ácido en los tejidos vegetales al igual que en la fijación de CO₂. Dentro de sus características fisicoquímicas de las MDHs, encontramos que pueden formar homodímeros o homotetrámeros y cada homodímero tiene un peso molecular que oscila entre los 60 a 70 kDa (Yudina, 2012). Adicionalmente, a su participación en el ciclo de Krebs las MDH tienen un papel en el control del desarrollo y la tolerancia al estrés ambiental. En la planta del algodón cuando es sometido a una deficiencia de fosforo, se encontró la participación de la MDH en el crecimiento de la planta y sus raíces. Por otra parte, en manzana se sugiere que MDH está involucrada en la regulación de la diferenciación de los botones florales (Lin *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2011).

El frijol es una leguminosa con importancia nutricional, económica y agrícola en México (Chatterjee *et al.*, 2023; Imran *et al.*, 2016, 2022; Lin *et al.*, 2023; Ma *et al.*, 2018). Desde el punto de vista de la utilización como alimento es considerado un alimento rico, ya que presenta un contenido importante de proteína, carbohidratos, fibra, macro y micro nutrientes. En México se siembra en diferentes estados, por ejemplo en el 2014 se sembraron 1 773 996 hectáreas y se cosecharon 1 273 957 toneladas (De los Santos Ramos *et al.*, 2017; Ulloa *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la malato deshidrogenasa tiene

participación en el proceso simbiótico ya que presenta una actividad importante en el nódulo y en raíz (Anass et al., 2021; Egli et al., 1989; Fischinger et al., 2010; Schulze et al., 2002). Debido a la importancia del cultivo de frijol en México y a la relevancia como planta modelo en el proceso simbiótico en este trabajo se realizó el análisis de expresión génica de la familia de las MDH presentes en *Phaseolus vulgaris* versión del genoma v2.1 y su papel en condiciones de simbiosis.

1.1 Objetivos

- Identificar y determinar el número de secuencias de las MDH y su localización en el genoma de *P.vulgaris*
- Evaluar *in silico* la localización subcelular y los parámetros fisicoquímicos de las MDH
- Establecer una relación filogenética de las MDH de *P.vulgaris* con *G.max*
- Determinar los elementos *cis*-reguladores presentes en los promotores de las MDH
- Analizar la transcripción de las secuencias de las MDH en el proceso de simbiosis

1.2 Hipótesis

La malato deshidrogenasa ocupa papel central en el metabolismo de las plantas y la familia génica se encuentra conservada evolutivamente en las plantas. Tienen un papel central en rutas metabólicas importantes como en la fijación simbiótica del nitrógeno, la adquisición de fósforo y la tolerancia al aluminio. Por lo tanto, en el genoma de *Phaseolus vulgaris* se tendrán genes pertenecientes a la familia génica malato deshidrogenasas y alguna de las secuencias tendrá expresión en el proceso simbiótico.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Descripción general de las malato deshidrogenasas

La familia de la malato deshidrogenasa presenta dos dominios, los cuales son denotados como: Ldh_1_N (pfam00056) y Ldh_1_C (pfam02866)(Chatterjee et al., 2023). El dominio Ldh_1_N también llamado lactato/malato deshidrogenasa presenta un motivo de unión a NAD que es característico dentro de las enzimas que catalizan la conversión de malato a oxalacetato (figura 1), pero también de aquellas que catalizan la conversión de L-lactato en piruvato. Este motivo pertenece a la superfamilia Rossmann-fold NAD (P) (+)-bindind (NADB-Rossmann Superfamily), la unión de NAD requiere de la secuencia GXXGXXG, y en el cual las dos primeras glicinas se encuentran involucradas en la unión de NAD y la tercera en el empaquetamiento de la hélice a la cadena beta. Por su parte, el dominio Ldh_1_C también llamado lactato/malato deshidrogenasa o dominio alfa/beta terminal también es propio de las L-2-hidroxiisocaproato. A pesar de su gran distribución entre organismos, existen aminoácidos específicos conservados en cada uno de los dos dominios que componen a las MDH, por ejemplo, GAXGXXG, RXDL y NP, estos del dominio Ldh_1_N y del dominio Ldh_1_C algunos como, LDXXR y GXH, en ambos dominios existen algunos aminoácidos individuales conservados como G, V, y L (Lu et al., 2020).

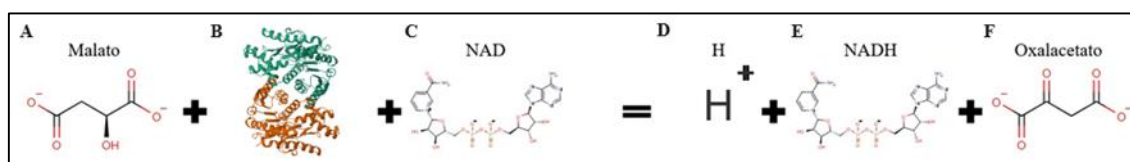


Figura 1: Reacción catalizada por Malato deshidrogenasa RHEA: 21432. En la figura se aprecia el esquema general de la reacción que cataliza la malato deshidrogenasa, A) Malato (sustrato), B) Malato deshidrogenasa (enzima), C) NAD (cofactor) y como resultado D) una molécula de hidrogeno, E) NAD + H y el producto F) Oxalacetato. Tomada y modificada de (Bansal et al., 2022).

1.1.2 La malato deshidrogenasa en procariotas

En los organismos procariotas la MDH puede encontrarse formando un homodímero o homotetrámero con un peso molecular aproximado de entre 30 y 38 kDa por cada monómero ver tabla 1. En las bacterias pertenecientes al grupo de Gram-negativas, generalmente se encuentran como proteínas diméricas y en las Gram-positivas como proteínas tetraméricas (ver figura 2). Existen dos maneras de clasificar a las MDHs, la primera es de acuerdo a su preferencia por el cofactor, el cual puede ser el NAD o NADP y en la segunda clasificación se realiza de acuerdo a la preferencia de oxidación o reducción del malato (Takahashi-Íñiguez et al., 2016).

Dependiendo de cada microorganismo la MDH puede variar su función en relación al ciclo de Krebs, ya sea mediante variantes de este ciclo o interactuando con enzimas del ciclo que de igual manera también pueden transferir de manera directa NADH a la cadena respiratoria. Sin embargo, en todas ellas se conserva la interconversión del malato a oxalacetato. La actividad de MDH esta regula por diversos factores entre ellos, la cantidad de oxalacetato y NADH disponibles, así como de la fuente de carbono disponible (Labrou & Clonis, 1997; Takahashi-Íñiguez et al., 2016).

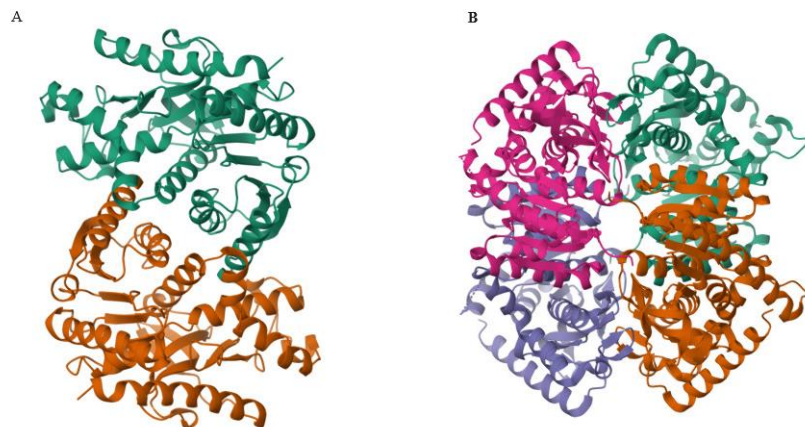


Figura 2: Estructura cristalizada de malato deshidrogenasa en procariotas. A) Malato deshidrogenasa de organismo procariota dimérica *Aquaspirillum arcticum* 1B8P. B) Malato deshidrogenasa de organismo procariota tetramérica *Geobacillus stearothermophilus* 7BY8. Tomadas de (Kim et al., 1999; Shimozawa et al., 2021), <https://doi.org/10.2210/pdb1B8P/pdb>, <https://doi.org/10.2210/pdb7BY8/pdb>

Tabla 1: Distribución de malatos deshidrogenasas (MDHs) en microorganismos. En esta tabla se aprecia el nombre del organismo al cual pertenece la proteína MDH, su estado oligomérico, es decir, si se encuentra en monómero, dímero o tetramero, además del peso molecular en kilo Dalton y su referencia. Tomada y modificada de (Takahashi-Íñiguez et al., 2016).

Microorganismo	Estado oligomérico del MDH (peso molecular (kDa))	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Dimérico, monómero (30)	Vogel y otros, 1987; Hall y otros, 1992
<i>Haemophilus parasuis</i>	Dimérico (68.4), monómero (34.6)	Wise y otros, 1997
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Dimérico (66.5), monómero (34)	Labrou y Clonis, 1997
<i>Streptomyces avermitilis</i>	Dimérico, monómero (35)	Wang et al., 2011
<i>Thermomonospora chromogena</i>	Dimérico	Smith y otros, 1984
<i>Thermus aquaticus</i>	Dimérico	Sundaram y otros, 1980
<i>Thermus thermophilus</i>	Dimérico (61)	Hung et al., 2013
<i>Bacillus subtilis</i>	Tetramérico (140), monómero (33.6)	Sundaram y otros, 1980
<i>Chlorobium tepidum</i>	Tetramérica	Dalhus y otros, 2002
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Tetramérico (35)	Rolstad y otros, 1988; Dalhus y otros, 2002
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Tetramérico (130), monómero (33)	Genda y otros, 2003
<i>Haloarcula marismortui</i>	Tetramérica	Dym y otros, 1995
<i>Methanococcus jannaschii</i>	Tetramérica	Lee y otros, 2001
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tetramérica	Öhman y Ridell, 1996
<i>Beggiatoa leptomitiformis</i>	Tetramérico (172; ciclo de glioxalato), dimérico (ciclo de Krebs), 4→2 dependiendo de la velocidad de oxidación del tiosulfato	Eprintsev y otros, 2004
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Tetramérico (148; vía del citramalato), dimérico (74; Ciclo de Krebs)	Eprintsev y otros, 2009a
<i>Rhodospseudomonas palustris</i> cepa f8pt	Dimérico (ciclo de Krebs), tetramérico (ciclo de glioxalato)	Eprintsev y otros, 2006

1.1.3 La malato deshidrogenasa en eucariotas

Los organismos eucariotas poseen múltiples isoformas de MDH las cuales tienen diferentes ubicaciones subcelulares, además de la mitocondrial y citosólica, también se han encontrado en el cloroplasto, peroxisoma y glioxisoma (célula vegetal). De todas las anteriores solo la MDH del cloroplasto requiere NADP como cofactor, mientras que el resto utiliza NAD como cofactor. A diferencia de los microorganismos la MDH en eucariotas se encuentra generalmente en homodímeros (Musrati et al., 1998).

La MDH glioxisomal participa en el ciclo del glioxilato (figura 3) el cual se lleva a cabo en los glioxisomas y al cual se le conoce como una variación del ciclo de Krebs ya que comparte la mayoría de sus enzimas e intermediarios, cuyo propósito es la generación de succinato a partir de acetil-CoA, aunque este ciclo no es exclusivo de plantas, algunos microorganismos lo usan como una alternativa. La MDH peroxisomal es la enzima más activa en este microcuerpo en plantas, y posee una gran similitud a la MDH glioxisomal (Beever, 1980).

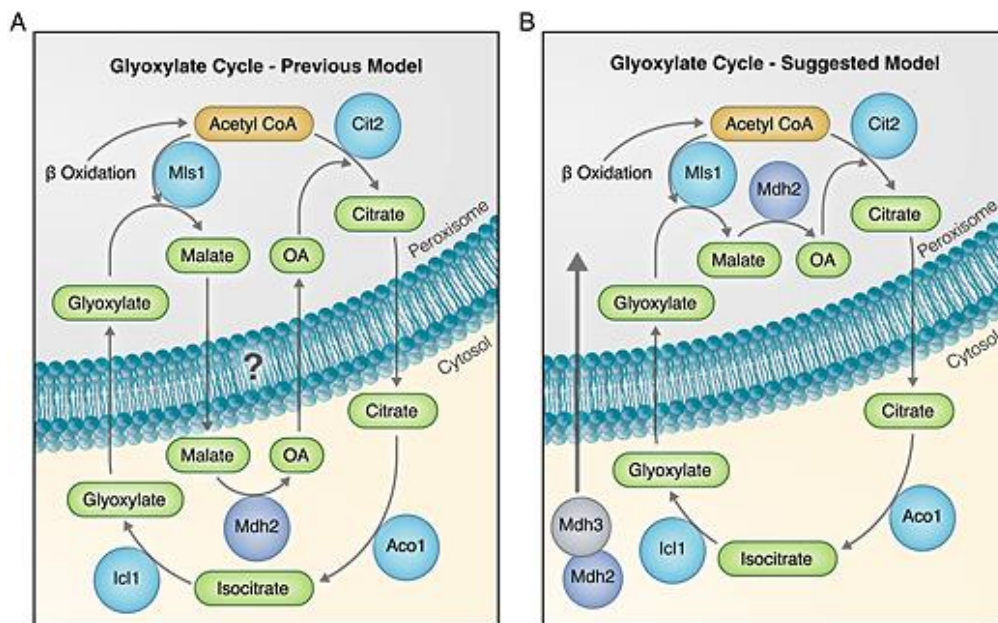


Figura 3: **Mdh2 de *Saccharomyces cerevisiae* en el ciclo del glioxilato.** (A) Un modelo gráfico de la hipótesis anterior sobre la localización de Mdh2. Anteriormente, se proponía que Mdh2 se localizaba exclusivamente en el citosol, donde desempeña un papel en el ciclo del glioxilato. (B) Sugerimos un nuevo modelo de trabajo que tenga en cuenta nuestros nuevos hallazgos de que Mdh2 también se dirige a los peroxisomas al aprovechar Mdh3. Tomada de (Gabay-Maskit et al., 2020).

La MDH citoplasmática es sintetizada en el citoplasma, es más polar y más ácida que MDH mitocondrial y está conservada en plantas, animales y bacterias. Sin embargo, ha sido poca estudiada en plantas, hay trabajos que la colocan con sistemas lanzadera para intercambiar sustratos y equivalentes reductores hacia los orgánulos celulares (ver figura 4).

La MDH cloroplástica es la única de todas las isoformas dependiente de NADP, esta se encuentra en las plantas superiores y su función principal está reportada en la fijación de CO₂ en plantas, esta enzima reduce el oxalacetato a malato utilizando NADP como cofactor, en las células del mesófilo para su transporte a las células de la vaina del haz y su actividad está controlada por la luz. Además se ha reportado con la capacidad de equilibrar los equivalentes reductores entre el cloroplasto y el citoplasma (Ding & Ma, 2004; Musrati et al., 1998), ver figura 4.

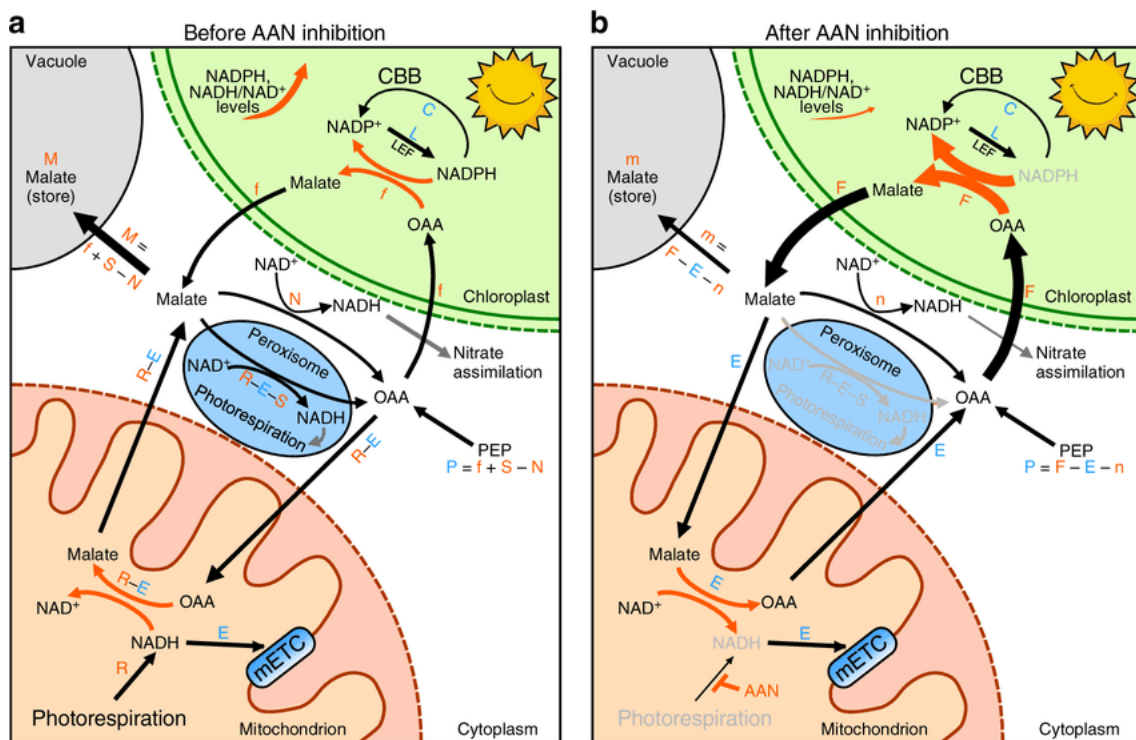
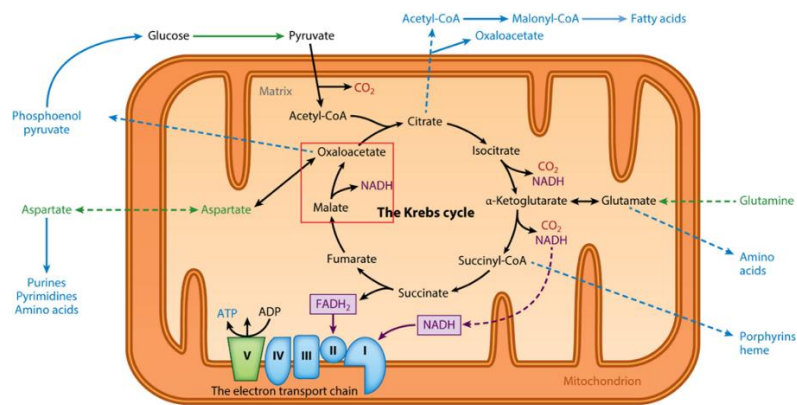


Figura 4: **Modelo del flujo trabajo de malato en *Arabidopsis thaliana* entre varios compartimentos subcelulares.** A) Flujo de malato cuando hay fotorrespiración y B) Flujo de malato cuando la fotorrespiración es inhibida por AAN (aminoacetonitrilo) o NaHCO₃ (Bicarbonato de sodio). mETC: equivalentes reductores a la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Imagen tomada de (Lim et al., 2020).

Por otra parte, la MDH mitocondrial es sintetizada en el citoplasma y después es exportada a la matriz mitocondrial (Musrati et al., 1998; Nielsen et al., 2011). Como se sabe la malato deshidrogenasa es conocida principalmente por su participación en el ciclo de Krebs, interconvirtiendo el malato a oxalacetato y utilizando NAD como cofactor. En eucariotas este ciclo se lleva a cabo dentro de la mitocondria y su principal función es la producción de energía, aunque también sirve como fuentes de precursores para otras biomoléculas como aminoácidos o nucleótidos.

El primer paso del ciclo de Krebs es la condensación de oxalacetato y acetil-CoA y como producto se obtiene citrato y CoA por la enzima citrato sintasa, luego el citrato se convierte en isocitrato, por la enzima aconitasa, seguido de la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato por la enzima isocitrato deshidrogenasa, en el siguiente paso α -cetoglutarato se convierte a succinil-CoA, por consiguiente succinil-CoA sintetasa sintetiza la conversión de succinil-CoA a succinato, para regenerar el oxalacetato, succinato es oxidado a fumarato, que luego será hidratado a L-malato y por último la MDH participa en el último paso de este ciclo, oxidando el malato a oxalacetato reduciendo NAD a NADH el cual sirve como portador de electrones de alta energía y que alimentara a la cadena de transporte de energía para la producción de ATP ver figura 5 (Ryan & O'Neill, 2020).



Ryan DG, O'Neill AJ. 2020. Annu. Rev. Immunol. 38:289-313

Figura 5: **El ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.** En esta figura se aprecia el ciclo de Krebs visto de una manera global, precursores y productos, además de su relación con la cadena de transporte de electrones. En rojo se resalta la participación de la MDH. Tomada y modificada de (Ryan & O'Neill, 2020).

1.2 Descripción general de *Phaseolus vulgaris* y su importancia productiva en México

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una planta que tiene un origen y domesticación en América Latina, específicamente en Mesoamérica y los Andes y que actualmente se encuentra distribuida globalmente, ya que se cuenta con su presencia en los cinco continentes. Taxonómicamente, pertenece a la familia Fabaceae, género *Phaseolus* y especie *vulgaris*, la planta cuenta con las siguientes características: tallos delgados y frágiles, las hojas que presenta son trifoliadas, el fruto se encuentra en una vaina que naturalmente libera a las semillas, estas pueden presentar diferencias en los colores entre los cuales podemos encontrar verdes, cafés, rojas o negras, en la forma de la semilla pueden ser redondeadas u ovals, la planta tiene una talla que alcanza una altura máxima de entre 50 a 70 centímetros, y de manera silvestre se sabe que crece en la Sierra Madre Occidental, entre los 500 y los 1,800 metros sobre el nivel del mar ver figura 6 (Flores, 2015; Miranda Colín, 1967; SAGARPA, 2017; Ulloa et al., 2011).

El clima en el cual presenta un desarrollo óptimo es bajo las siguientes condiciones: para la temperatura presenta una máxima de 27 °C y una mínima de 10 °C, con suelos que presentan un buen drenaje y de textura ligera, pH entre seis y siete. Para cultivar esta planta la siembra debe de ser con una profundidad de entre tres y cinco centímetros con una separación entre cada planta de seis centímetros y de 60 centímetros a 80 centímetros entre cada fila (SAGARPA, 2017).

El frijol es conocido por su alto contenido proteico, ya que es una fuente rica en aminoácidos como lisina, fenilalanina y tirosina. También contiene carbohidratos, lípidos y fibra, en nuestro país es una de las leguminosas más consumidas. Por otra parte, el frijol es capaz de establecer relaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium sp* y realizar la fijación biológica del nitrógeno en la cual la planta recibe de parte del bacteroide una fuente de nitrógeno en forma de NH₄(+) y la bacteria recibe los carbohidratos necesarios (Flores, 2015; Ulloa et al., 2011).

El cultivo de frijol tiene gran importancia en México y es cultivado en diferentes estados como son: Zacatecas, Durango, Chihuahua, Chiapas, Nayarit, Veracruz y Sinaloa (Prieto-Cornejo et al., 2019). Actualmente casi todos los estados del país cultivan frijol a excepción de Baja California, el principal productor de frijol en México es Zacatecas con

618 224 hectáreas cultivadas y 307 495 toneladas cosechadas, seguido de Durango con 191 808 hectáreas y 57 487 toneladas, y en tercer lugar Chiapas con 115 364 hectáreas y 68 621 toneladas. Un análisis de los estados productores en el periodo comprendido entre 1980 y el 2016 muestra que los tres principales estados productores en el periodo de primavera-verano eran Zacatecas, Durango y Chihuahua, mientras que durante el periodo otoño-invierno los tres estados principales eran Nayarit, Veracruz y Sinaloa, tal y como se muestra en las figuras 7 y 8 respectivamente (Prieto-Cornejo et al., 2019; SIAP, 2017)



Figura 6: *Phaseolus vulgaris*. Imagen de planta completa de *P. vulgaris*, su fruto y flores. Imagen tomada de (Futuro Agrónomo (futuroagronomo.blogspot.com)).

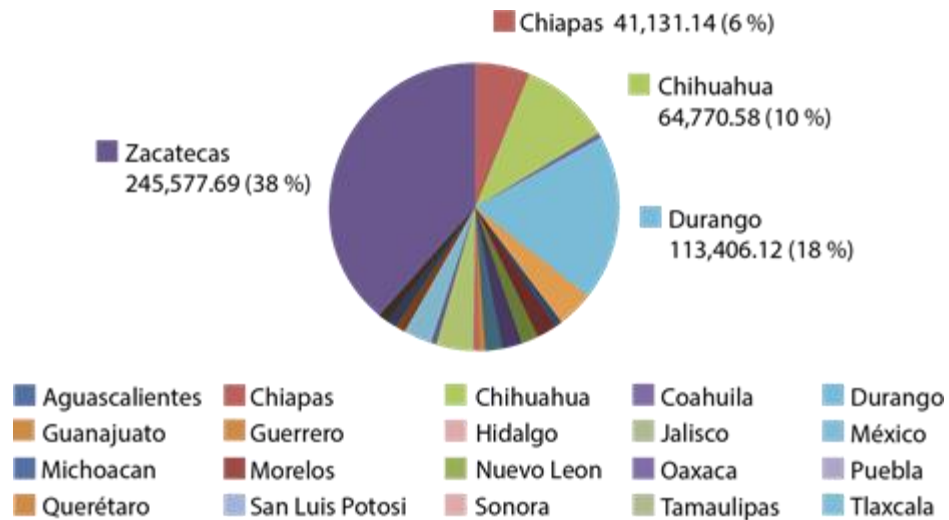


Figura 7: **Producción de frijol en el ciclo primavera-verano.** En esta figura se aprecia la producción promedio en toneladas de los 21 estados productores en el ciclo primavera-verano en un periodo que comprendió de 1980 a 2016, además se puede observar la contribución de los 4 mayores productores durante este periodo de tiempo. Tomada de (Prieto-Cornejo et al., 2019).

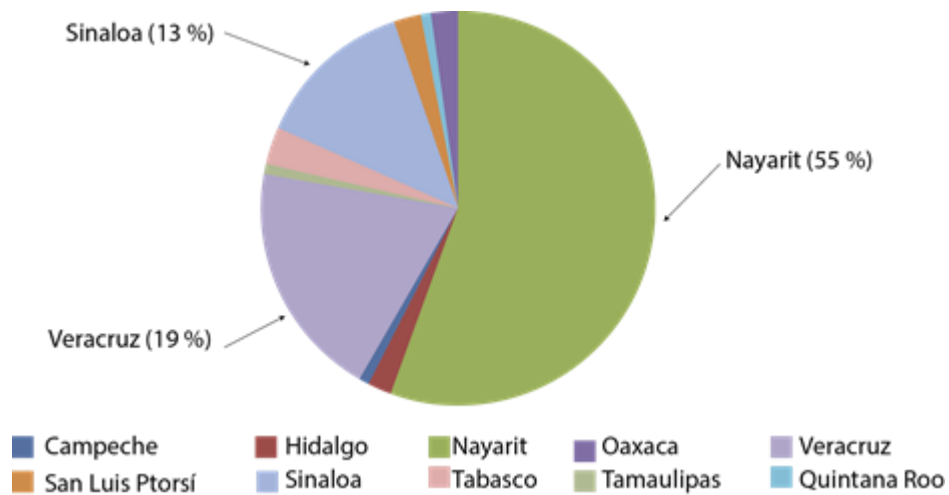


Figura 8: **Producción de frijol en el ciclo otoño-invierno.** En esta figura se aprecia la producción promedio en toneladas de los 10 principales estados productores en el ciclo otoño-invierno en el periodo que comprendió de 1980 a 2016, además se observa la colaboración de los tres estados con mayor producción durante este periodo. Tomada de (Prieto-Cornejo et al., 2019).

1.3 Vía de señalización simbiótica común, nodulación y micorrización arbuscular

La vía de señalización simbiótica común por sus siglas en inglés (CSSP), se desarrolla en la raíz de las plantas que pueden establecer una relación de simbiosis con la bacteria o micorriza compatible y en la planta el modelo de la ruta esta formado por un grupo de genes que se compartidos en ambos procesos (rizobios-planta y de las micorrizas arbusculares-planta). Brevemente, el modelo de la ruta consta de ocho genes entre los que encontramos un receptor-like kinase (RLK), nucleoporinas, canales iónicos, una proteína quinasa nuclear dependiente de calcio y calmodulina y el sustrato de la fosforilación, factores de transcripción específicos para nodulación/micorrización y genes de las nodulinas (Huisman & Geurts, 2020; Skiada et al., 2020). La nodulación es realizada por bacterias del suelo como: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, que se asocian a nivel de la raíz de algunas plantas como las leguminosas y que culmina con la formación del nódulo en donde se realiza la fijación del nitrógeno atmosférico por la bacteria (Nápoles et al., 2008). Para poder llevar a cabo este proceso es necesario que las bacterias en la rizosfera, perciban los exudados de la planta (flavonoides, fenoles, azúcares, entre otros), los que son percibidos por la bacteria y en respuesta la bacteria se inicia la producción de los factores de nodulación (lipochitoooligosacáridos o factores Nod), posteriormente la bacteria se adhiere al pelo radical presente en la raíz, de forma paralela se inicia la división celular en el córtex de la raíz y la bacteria migra por el hilo de infección para alcanzar a las células del córtex, en el cual serán vertidas en un proceso que asemeja a la endocitosis, para después dar paso a la formación del simbiosoma y posteriormente la diferenciación de la bacteria a bacteroide capaz de realizar la fijación simbiótica del nitrógeno (Bianco, 2020; Nápoles et al., 2008). Otras moléculas importantes durante el procesos de nodulación son: el lipopolisacárido (LPS) y el exopolisacárido (EPS), que actúan como supresores de las repuestas de defensa de la planta durante este proceso (Dalla Via et al., 2015). Tal y como lo menciona (Garg & Geetanjali, 2009) el proceso de fijación biológica del nitrógeno es una alternativa económica y ecológica para el aporte externo de nitrógeno en cultivos, a diferencia de la fertilización.

Otro tipo de simbiosis es la interacción de raíces con los hongos micorrízicos arbusculares y es la más común en la naturaleza. Las micorrizas son aquellos hogos que

colonizan intracelularmente la raíz y que forman estructuras especializadas llamadas arbusculos, en donde se intercambian nutrientes entre la célula vegetal y el hongo. La planta se beneficia de la absorción de fósforo por parte del hongo y el recibe fotoasimilados por parte de la planta. Solo cinco familias de hongos, tienen la capacidad de formar micorrizas arbusculares (Folli-Pereira et al., 2012; Gómez et al., 2007).

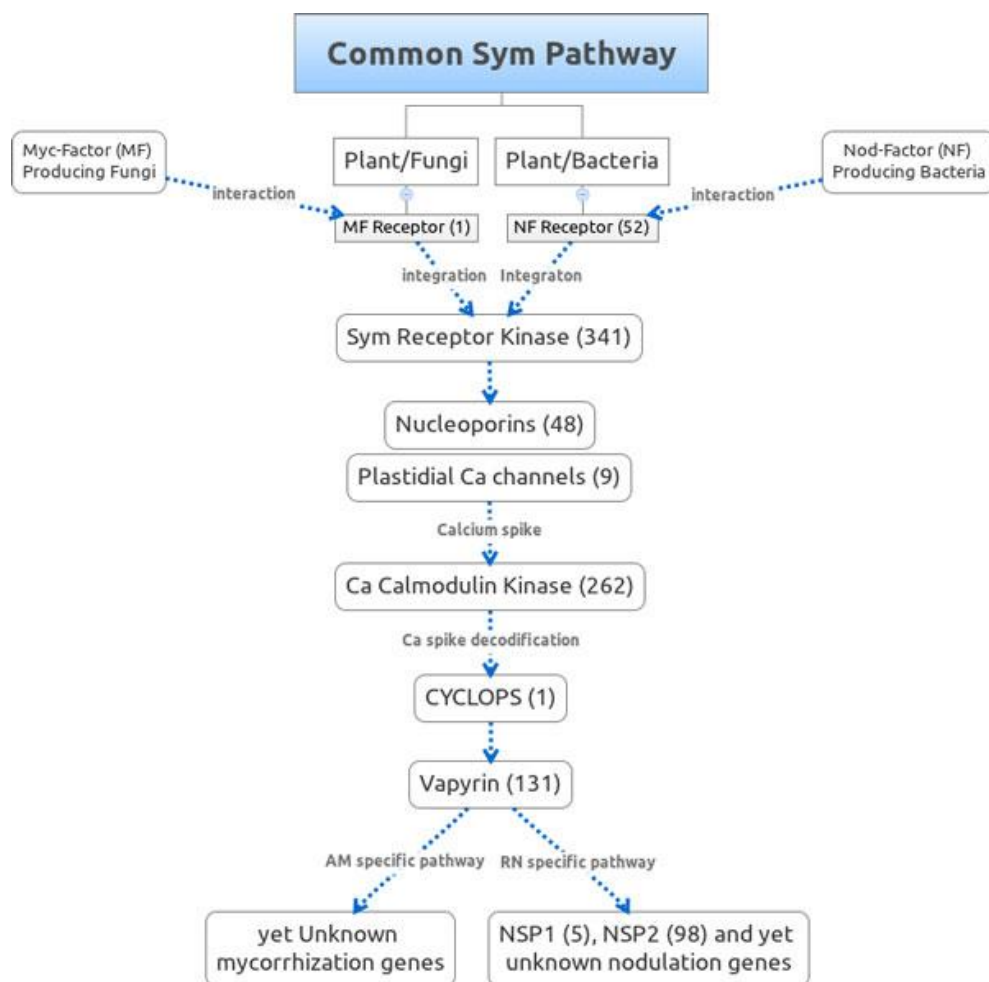


Figura 9: Vía común de SYM para la micorrización y nodulación. La proteína representativa en cada ganglio se recolectó de la literatura. Los números de acceso, los enlaces a las revistas y la información detallada sobre las secuencias de consulta y los candidatos están disponibles en línea en <http://symgrass.dyndns.org>. Imagen tomada de (Belarmino et al., 2013).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Identificación de los genes y localización cromosómica de las MDH en *Phaseolus vulgaris*

Para la identificación de las secuencias pertenecientes a la familia MDH se utilizó la herramienta BLASTP del Plant Comparative Genomics portal of the Department of Energy's Joint Genome Institute, Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), utilizando los valores por defecto (BLOSUM62, (E) -1, (W) por defecto, espacios permitidos (gaps, apertura y extensión configurado por defecto), filtro de la secuencia consulta por defecto. Para realizar la búsqueda en el proteoma de *P.vulgaris* se utilizaron como consulta las secuencias de los proteínas MDH de algodón (*G. raimondii*, *G. hirsutum* y *Gossypium arboreum*) previamente identificadas (Imran et al., 2016). Un análisis semejante fue realizado para el proteoma de soja (*Glycine max* Wm82.a4.v1). De las secuencias resultantes de la búsqueda, se sometieron a un análisis de dominios en los que se determinó la presencia de los dominios característicos de las MDH denominados Ldh_1_N y Ldh_1_C, con los modelos markovianos con números de referencia pfam00056 pfam02866 respectivamente (Chatterjee et al., 2023), para dicha búsqueda se utilizó la herramienta bioinformática presente en el portal del National Center for Biotechnology Information (NCBI) denominado Conserved Domain Search (CD-Search) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Lu et al., 2020).

Para realizar la localización cromosómica de las MDH en el genoma de *P.vulgaris*, se realizó la descarga del portal de Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), de los datos de las anotaciones, el tamaño de cada una de las secuencias del gen, la secuencia codificada y de la secuencia de la proteína cada MDH identificada. Posteriormente, con los datos de las anotaciones del gen en los cromosomas se realizó una representación de su localización empleando el software en línea MGC2 v2.1 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/) (Chao et al., 2021).

4.2 Predicción de localización subcelular y parámetros fisicoquímicos

Para realizar la predicción de localización subcelular de las proteínas Malato Deshidrogenasa de frijol se utilizaron cinco programas de computadora diferentes, todos ellos con una plataforma en línea y que a continuación se enlistan:

1. CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu et al., 2004)
2. Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/>) (Small et al., 2004)
3. TargetP-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>) (Armenteros et al., 2019)
4. DeepLoc-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>) (Thummuluri et al., 2022)
5. WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) (Horton et al., 2007)

Para la obtención de los parámetros fisicoquímicos como son el tamaño de la proteína expresado en kDa, el punto isoeléctrico, el índice de estabilidad y el índice de hidropaticidad (GRAVY) se descargó del portal de Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) las secuencias de las proteínas de cada una de las malato deshidrogenas identificadas y la secuencia se introdujo al portal en línea ProtParam de ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al., 2005).

4.3 Análisis filogenético de las MDH en *Phaseolus vulgaris*

El motivo rico en residuos Gly (Rossmann Fold) se encuentra presente en enzimas y entre ellas la MDH. Para la búsqueda del motivo GAXGXXG en el dominio Ldh_1_N se realizó un alineamiento de las secuencias de las MDH identificadas de *Phaseolus vulgaris* y la secuencia de *Arabidopsis thaliana* reportada por (Balparda et al., 2022), utilizando el software bioinformático Unipro UGENE (<http://ugene.net/>), con el alineamiento de secuencias múltiple ClustalW, configuración, gap opening penalti 10.00, BLOSUM, no end gap separation penalty. Para el estudio de la relación filogenética de las MDH de *P.vulgaris* y otras especies se realizó la construcción del árbol filogenético utilizando las secuencias de las ocho MDH identificadas de *P.vulgaris* y las secuencias de las MDH de las siguientes especies *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Cunninghamia lanceolata*, *Gossypium raimondii*, *Gossypium hirsutum* y *Gossypium arboretum* (Imran

et al., 2016, 2022; Lin et al., 2023). La construcción se realizó utilizando el software en línea PhyloCloud (cgmlab.org) con la configuración predeterminada (Deng et al., 2022).

4.4 Análisis de sintenia de las MDH de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*

Para entender la posible relación de sintenia entre *P. vulgaris* y *G. max* se realizó un análisis de los bloques de sintenia, los cuales son conjuntos de regiones similares entre genomas o dentro de un mismo genoma, esta identificación permite realizar estudios de la evolución genómica (comparativa). Para realizar el análisis se utilizó el software de Tbtools ver 2.010 (C. Chen et al., 2020), entre *P.vulgaris* y *G. max*.

4.5 Determinación de los elementos *cis*-reguladores y la expresión de las MDHs en el proceso de nodulación y micorrización arbuscular.

Para determinar los elementos de respuesta en los promotores de las malato deshidrogenasas se analizaron 2000 pb río arriba del codón de inicio de cada una de las secuencias de las MDH identificadas en el genoma *Phaseolus vulgaris*, las secuencias de los promotores se descargaron de Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) (Goodstein et al., 2012).

Posteriormente, las secuencias se analizaron utilizando el sitio web PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)(Lescot et al., 2002). Al obtener los resultados, se eliminaron los elementos *cis*-reguladores mínimos y los elementos en *cis* resultantes se clasificaron en cuatro diferentes categorías, las cuales son las siguientes: 1) sensibles a la luz, 2) sensibles a fitohormonas, 3) sensibles a estrés y los relacionados al crecimiento y 4) desarrollo de la planta.

Para elucidar la expresión de las secuencias malato deshidrogenasas identificadas se analizaron tres experimentos de RNA-seq. El primero es un atlas de expresión, el cual contiene los datos del proceso de nodulación entre *Phaseolus vulgaris* y, *Rhizobium tropici* 899 (efectivo: capaz de fijar) y *Rhizobium giardini* 6917 (ineficaz: incapaz de fijar), pero también se encuentran los datos de otras muestras analizadas como son: raíz, las hojas, el tallo, el brote, la flor, las vainas y las semillas (O'Rourke et al., 2014). Los valores de expresión en RPKM de las secuencias MDH identificadas en el genoma de *Phaseolus vulgaris* fueron descargados del portal PvGEA: Common Beam Gene

Expression Atlas and Network Analysis (<https://www.zhaolab.org/PvGEA/>), el portal contiene un total de 24 muestras, las cuales fueron divididas en dos secciones parte aérea (hojas, el tallo, el brote, la flor, las vainas y las semillas) y raíz y nódulos, cada valor de las secuencias identificadas se utilizaron para generar un mapa de calor con ayuda del software TBtools versión 2.010 (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools-II/releases>) (C. Chen et al., 2020). Para realizar el análisis los datos fueron divididos en dos secciones. La primera sección se consideró únicamente a la parte aérea el cual incluye: hojas, tallo, brote, flor, vaina y semillas; la segunda sección corresponde a raíz y nódulos.

El segundo y tercer grupo de datos de RNAseq fue realizado en el transcriptoma de (Dalla Via et al., 2015) en donde se evaluó el proceso de nodulación en *Phaseolus vulgaris* (NAG12) inoculado con cinco cepas de *Rhizobium etli* (ver tabla 2), cuyas muestras fueron tomadas 24 horas postinfección (hpi) de un experimento realizado por duplicado. El tercer RNA-seq fue en el transcriptoma realizado por (Fonseca-García et al., 2019) en donde se analizó el efecto del silenciamiento de la NADPH oxidasa de *P. vulgaris* nombrada *PvRbohB*, con un papel importante en el proceso simbiótico (nodulación y micorrización). Brevemente, se generaron raíces transgénicas para la secuencia de la *PvRbohB* nombrada como *PvRboh-RNAi* y no silenciadas (control) utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes* K599. Posteriormente, las plantas se transfirieron en masetas y se inocularon con *Rhizophagus irregularis* o *Rhizobium tropici*, las muestras fueron tomadas 7 días después de la infección. Sin embargo, para el trabajo únicamente se analizaron los datos obtenidos de la comparación entre el control (no silenciadas)-bacteria y control (no silenciadas)-hongo.

Tabla 2: Cepas de *Rhizobium etli* y sus características. NodA⁻, Ops⁻ y Exo⁻, no producen NF, LPS y EPS respectivamente. Ndv⁺ se refiere a que forma de manera normal los nódulos, Ndv⁻ no forma nódulos, Fix⁺ nódulos que fijan nitrógeno y Fix⁻ no fijan nitrógeno.

Cepa	Características	Fenotipo simbiótico
CE3	Tipo salvaje	Ndv ⁺ Fix ⁺
UBP102 (NodA ⁻)	NodA ⁻	Ndv ⁻ Fix ⁻
CE109	Ops ⁻	Ndv ⁻ Fix ⁻
CE338	Exo ⁻	Ndv ⁺ Fix ⁺
CE343	Ops ⁻ Exo ⁻	Ndv ⁻ Fix ⁻

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de los genes y localización cromosómica de las MDH en *Phaseolus vulgaris*

La familia de la malato deshidrogenasa en platas se ha documentado como una familia multigénica con varios miembros dependiendo del género y la especie el valor varia, por ejemplo: *Gossypium arboreum* n=13; *Gossypium raimondii* n= 13 y *Gossypium hirsutum* n= 25 (Imran et al., 2016; Imran & Liu, 2016). Mientras que para otras especies como *Populus trichocarpa* n=16; manzana Golden Delicious n=20; *Oryza sativa* L n=12; *Cunninghamia lanceolata* n=12 y *Solanum lycopersicum* L n=12 (X. Chen et al., 2019; Imran et al., 2022; Lin et al., 2023; Ma et al., 2018; Zhang et al., 2022). La búsqueda combinada entre el análisis BLASP y la determinación de la presencia de los dominios Ldh_1_N (pfam00056) y Ldh_1_C (pfam02866) en el proteoma de *P.vulgaris*, permitió identificar a un total de ocho genes lo cual corresponde con datos obtenidos anteriormente por (Yıldız et al., 2021) en un análisis de respuesta al estrés salino. Estos genes fueron renombrados como: PvMDH1 a PvMDH8, tomando en cuenta la posición del cromosoma (ver tabla 3 y figura 10). Las secuencias de las MDH en *Phaseolus vulgaris* se encontraron distribuidos en cinco de los cromosomas, los cuales son: Chr 2, Chr 3, Chr 7, Chr 10 y Chr 11, la distribución por cromosoma fue la siguiente manera: en los cromosomas Chr 2, Chr 3 y Chr 7, se encontraron dos genes en cada uno, mientras que en el Chr 10 y Chr 11 solo se encontró un gen en ambos cromosomas acorde a (Yıldız et al., 2021) (ver figura 11). En lo referente al tamaño de las secuencias codificantes, las MDH se encuentran distribuidas en el rango desde los 999 pb para la secuencia identificada como PvMDH6 hasta los 1311pb para la secuencia identificada como PvMDH5, cuyas proteínas tienen el tamaño de 333 y 437 aminoácidos respectivamente (ver Tabla 3).

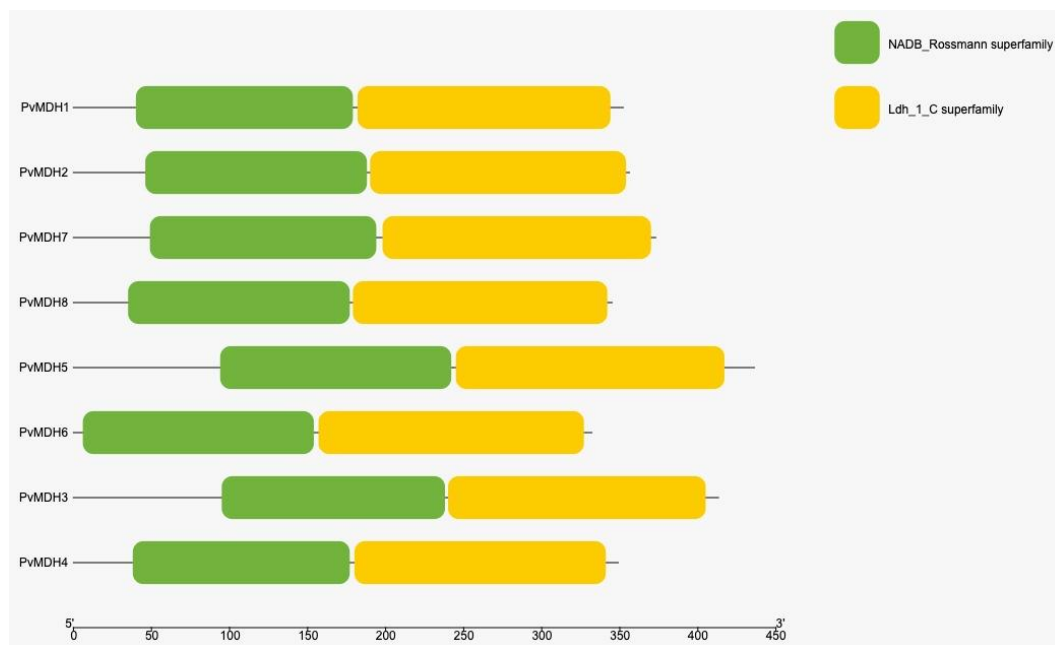


Figura 10: **Determinación de los dominios Ldh_1_N y Ldh_1_C en las MDH de *Phaseolus vulgaris*.** En esta figura se aprecian cada una de las MDH identificadas en *P. vulgaris* con sus dos dominios característicos de esta familia de proteínas, en verde el dominio Ldh_1_N y en amarillo el dominio Ldh_1_C.

Tabla 3: **Identificación y renombramiento de los genes MDH en *Phaseolus vulgaris***

ID	Nombre	Gen (pb)	CDS (pb)	Proteína (aa)
Phvul.002G062000.1	PvMDH1	1334	1059	353
Phvul.002G216800.1	PvMDH2	3674	1071	357
Phvul.003G189700.1	PvMDH3	2346	1242	414
Phvul.003G219400.1	PvMDH4	1869	1050	350
Phvul.007G140600.1	PvMDH5	5748	1311	437
Phvul.007G273500.1	PvMDH6	3558	999	333
Phvul.010G055700.1	PvMDH7	3916	1122	374
Phvul.011G159000.1	PvMDH8	4883	1038	346

CDS= secuencia codificante pb= pares de bases aa: aminoácidos

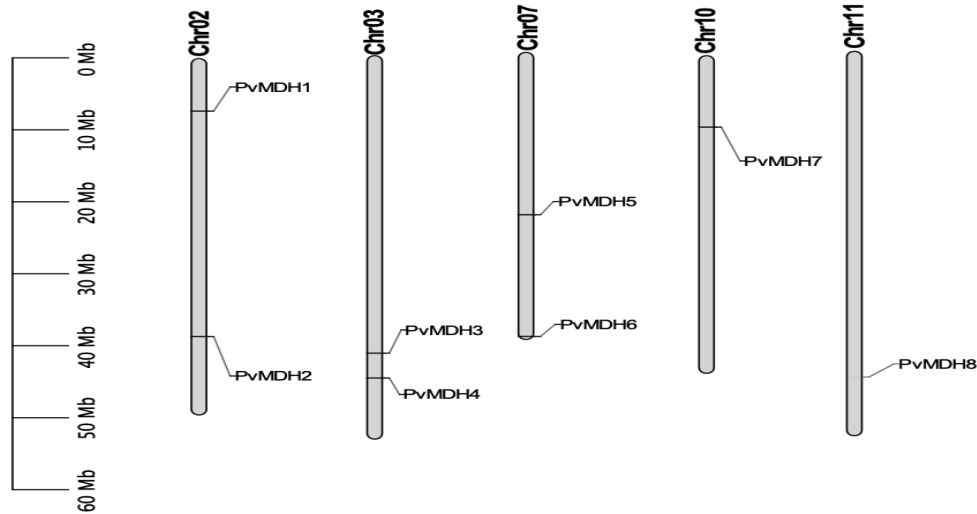


Figura 11: Localización cromosómica de las MDH en *Phaseolus vulgaris*. En esta figura se aprecia la localización a nivel cromosómico de las MDH identificadas dentro del genoma de *P. vulgaris*.

5.2 Predicción de localización subcelular y parámetros fisicoquímicos

Una serie de análisis predictivos realizados en otras especies, muestran que las MDH tiene diferentes localizaciones subcelulares, por ejemplo en tomate, cuatro de las 12 proteínas fueron citoplasmáticas, una glioxisomal, cinco en el cloroplasto y dos mitocondriales (Imran et al., 2022); en abeto chino cinco de las 12 proteínas identificadas fueron localizadas en el cloroplasto, dos mitocondriales, y cinco citoplasmáticas (Lin et al., 2023); en algodón nueve de las 38 proteínas fueron mitocondriales, seis peroxisomales, nueve plastidiales, tres en el cloroplasto y 11 citoplasmáticas (Imran et al., 2016). En maíz se han identificaron cuatro NAD-MDH y una NADP-MDH (Goodman et al., 1981); Por otra parte, la secuencia de maíz denominada como ZmMdh4 cuando se fusiono a GFP en su extremo amino terminal, esta secuencia fue localizada en el citoplasma (Y. Chen et al., 2020). El resultado de nuestro análisis de localización subcelular con diferentes programas permite una comparación al momento de predecir la localización. El análisis empleando el software BaCelLO predice que cuatro de las secuencias presentan una localización citoplasmática, dos en el cloroplasto, una en el retículo endoplasmático y una en la mitocondrial; el análisis realizado por CELLO

determino que una secuencia es localizada en el peroxisoma, dos se encuentran en la membrana plasmática, dos en el cloroplasto, dos son citoplasmáticas y una es mitocondrial; el análisis de Predotar al igual que Target P-2.0 únicamente clasificaron tres de las ocho secuencias, de las cuales dos están en el cloroplasto y una en la mitocondria. Finalmente, WoLF PSORT clasificó tres de las ocho en el cloroplasto, tres citoplasmáticas, una en la membrana plasmática y una en la mitocondria. De manera general las secuencias PvMDH3, PvMDH5 y PvMDH8, fueron las únicas que fueron clasificadas con la misma localización subcelular utilizando los softwares, en contraste las secuencias PvMDH1 y PvMDH7 que no mantuvieron una misma clasificación entre todos los softwares utilizados (ver tabla 4). Al comparar nuestros resultados con los obtenidos anteriormente por (Yıldız et al., 2021), el utilizar varios software para la predicción de la localización subcelular permite corroborar y cuestionar algunos de sus resultados, pues PvMDH1 no mantuvo la misma predicción en ninguno de los software utilizados al igual que PvMDH7, mientras que para PvMDH2 y PvMDH4 al menos uno de los software dio el mismo resultado, en los resultados obtenidos de la predicción para PvMDH6 dos de los software utilizados corroboraron el resultado antes obtenido pues el resto no arrojó ningún resultado, a diferencia del resto PvMDH3, PvMDH5 y PvMDH8, coincidieron con sus resultados, lo cual permite tener un panorama en relación a su localización subcelular.

Por otra parte, en la determinación de los diferentes parámetros fisicoquímicos como el peso molecular expresada en kDa, el punto isoelectrico, el índice de estabilidad y el índice de hidropaticidad (GRAVY). Encontramos que el peso molecular se encuentra en el rango de 35,407 a los 47,695 kDa, lo cual concuerda con lo reportado previamente en otras plantas (Lin et al., 2023), el punto isoelectrico se encuentra en el rango de 5.58 a 8.73, el índice de inestabilidad, (valor que predice la inestabilidad regional de la adición ponderada de la frecuencia entre los dipéptidos presentes en las proteínas inestables vs los presentes en las proteínas estables, se considera que un valor menor a 40 es potencialmente estable y mayor a 40 es potencialmente inestable (Guruprasad et al., 1990)). El rango encontrado en las MDH de *P.vulgaris* fue de 23.24 a 38.66 lo que indica que son proteínas estables (Gasteiger et al., 2005). Todo lo anterior corroborando lo antes obtenido por (Yıldız et al., 2021)

El índice alifático, que es el volumen relativo ocupado por cadenas alifáticas (Alanina, Valina, Isoleucina y Leucina) señala la estabilidad de proteínas globulares a altas temperaturas (Ikai, 1980), nosotros encontramos que las secuencias de las MDH de *P. vulgaris* se encuentra en un rango del 23.24 al 38.19 para las secuencias PvMDH2 y PvMDH8 respectivamente, lo que indica que son proteínas termosensibles. El índice de hidropaticidad (GRAVY) es un análisis que proporciona a partir de la composición de los aminoácidos, la hidrofilia / hidrofobicidad de una proteína, de tal forma que valores negativos de GRAVY pertenecen proteínas hidrofílicas y valores positivos a proteínas hidrofóbicas (Kyte & Doolittle, 1982). El valor de siete de las ocho secuencias de las MDH de *P. vulgaris* son positivos y se encuentran en un rango de 0.051 a 117 las cuales serían proteínas hidrofílicas y la única hidrofóbica sería la secuencia PvMDH5 (-0.138) (ver tabla 5).

Tabla 4: Predicción de localización subcelular de las MDH identificadas en Phaseolus vulgaris

Nombre	BaCelLO	CELLO	Predotar	TargetP-2.0	WoLF PSORT
PvMDH1	Cito	MP	*	*	Clo
PvMDH2	Cito	Perox	*	*	Cito
PvMDH3	Clo	Clo	Clo	Clo	Clo
PvMDH4	Cito	MP	*	*	Cito
PvMDH5	Clo	Clo	Clo	Clo	Clo
PvMDH6	Cito	Cito	*	*	Cito
PvMDH7	RE	Cito	*	*	MP
PvMDH8	Mito	Mito	Mito	Mito	Mito

Cito= Citoplasma Clo=Cloroplasto Mito= Mitocondria Perox= Peroxisoma

*RE= Retículo Endoplasmático. MP= Membrana Plasmática *=Otro*

Tabla 5: Predicción de los parámetros fisicoquímicos de las MDH en *Phaseolus vulgaris*

Nombre	Peso molecular (Da)	pI	Índice de Inestabilidad	Índice Alifático	GRAVY
PvMDH1	38354.97	6.60	35.04	105.77	0.058
PvMDH2	37495.30	7.63	23.24	101.12	0.117
PvMDH3	43466.83	8.60	38.66	95.93	0.064
PvMDH4	37576.89	6.55	33.32	108.94	0.072
PvMDH5	47695.67	6.48	32.09	91.95	-0.138
PvMDH6	35407.60	5.58	30.51	97.23	0.080
PvMDH7	40915.43	5.73	26.74	101.96	0.051
PvMDH8	36023.56	8.73	38.19	96.41	0.074

Da= Dalton pI= punto isoeléctrico GRAVY= Grand average of hydropathicity

5.3 Análisis filogenético de las MDH en *Phaseolus vulgaris*

Las MDH son proteínas que se han conservado evolutivamente, y presentan aminoácidos conservados, por ejemplo: el motivo GXXGXXG, el cual es importante en la unión de NAD (Zhang et al., 2022). Los análisis realizados para determinar la relación evolutiva de las MDHs en plantas las han agrupado normalmente en cinco grupos diferentes (X. Chen et al., 2019; Imran et al., 2016, 2022; Lin et al., 2023).

Para analizar la presencia de los motivos característicos de las malato deshidrogenas se utilizó el software UGENE para realizar el alineamiento las ocho secuencias de aminoácidos de los genes MDH identificados de frijol y una de *Arabidopsis thaliana*, los resultados obtenidos fueron los siguientes, el rango de similitud de todo el conjunto de secuencias se encuentra del 16% al 85%, siendo PvMDH1-PvMDH4 y *A. thaliana* MDH1-PvMDH8 las de mayor similitud con el 86% y 84% respectivamente, contrario a esto PvMDH7-PvMDH1, PvMDH5-*A. thaliana*, PvMDH1-PvMDH6 las más disimilares con solo el 16% de similitud. Las MDH al ser alineadas encontramos al motivo GAXGXXG, en el dominio Ldh_1_N y LDXXR (ver figura 12). Para la reconstrucción filogenética se utilizaron las secuencias de tomate, soja, abeto chino, frijol y tres especies algodón que previamente fueron identificadas. Los análisis realizados con las siete

especies de plantas muestran que la familia génica se organiza en cinco grupos bien definidos a diferencia de los tres grupos propuestos por (Yıldız et al., 2021) para esta misma planta y obteniendo el mismo resultado en abeto chino (Lin et al., 2023), algodón (Imran et al., 2016), sin embargo en manzana se obtuvieron 6 grupos (Ma et al., 2018). De manera particular los resultados muestran que las MDH de *P.vulgaris* se encuentran distribuidas de la siguiente manera: en el grupo I se encuentra PvMDH8, en el grupo II PvMDH2, en el grupo III PvMDH3, siendo estas tres las que fueron divididas en tres grupos diferentes en comparación con los resultados obtenidos por (Yıldız et al., 2021), en el grupo IV PvMDH1 y PvMDH4, y en el grupo V a las secuencias PvMDH5, PvMDH6 y PvMDH7 (ver figura 13).

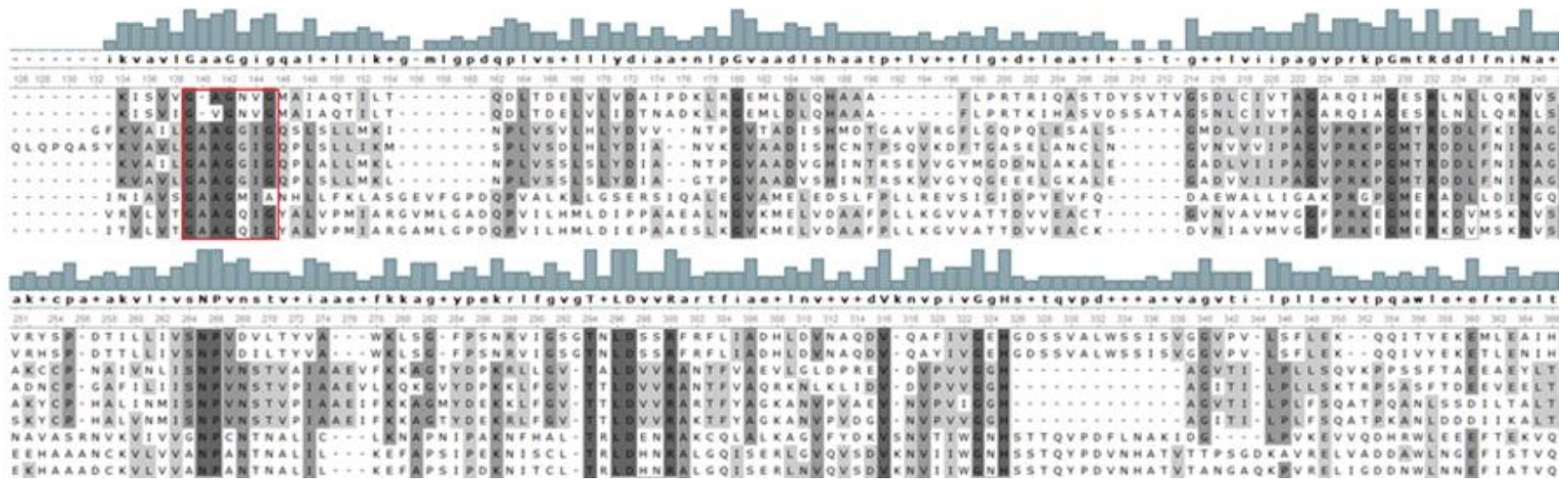


Figura 12: Alineamiento de las MDHs identificadas en *Phaseolus vulgaris*. Como se aprecia en la figura, los aminoácidos resaltados por el recuadro rojo corresponden al motivo GXXGGXXG importante en la unión a NAD, también se observan aminoácidos específicos conservados entre las secuencias MDH de *P. vulgaris* y MDH1 de *Arabidopsis thaliana* (Balparda et al., 2022). El color gris oscuro indica de 90% a 100% de identidad, el color gris medio de 65% a 89% de identidad, y el color gris claro indica menos de 60% de identidad.

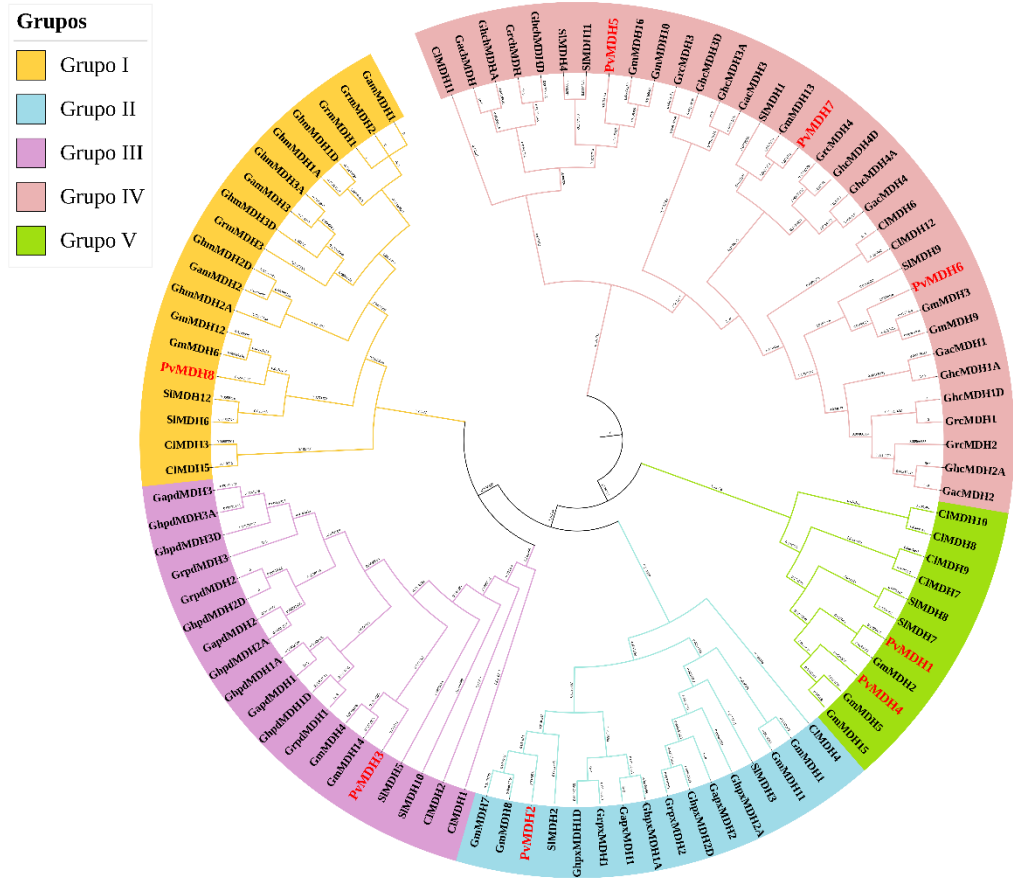


Figura 13: Árbol filogenético de las MDH de *Phaseolus vulgaris*. Realizado con secuencias de *P. vulgaris*, *S. lycopersicum*, *G. max*, *C. lanceolata*, *G. raimondii*, *G. hirsutum* y *G. arboreum*. En esta figura se aprecia la división de las MDH en cinco grupos, en los cuales se encuentra al menos una MDH de *P. vulgaris* las cuales están resaltadas en rojo, además se observa la relación de las MDH de frijol con las MDH de otras especies.

5.4 Análisis de sintenia de las MDH de *Phaseolus vulgaris*

El análisis de sintenia y colinealidad permite identificar los posibles cambios estructurales en el genoma y pueden ser un reflejo de los procesos evolutivos como: la poliploidía entre otros tipos de duplicaciones genómicas a gran escala de los organismos analizados. Además, proporciona información para confirmar la homología génica (Tang et al., 2015). Se realizó un análisis entre *P.vulgaris* y *G.max*, en búsqueda de los posibles bloques sinténicos presentes de la MDH en los dos genomas encontramos que las secuencias PvMDH2, PvMDH3, PvMDH5, PvMDH6 y PvMDH8, tienen al menos un par génico con sintenia en *G. max* (una secuencia PvMHD vs dos secuencias de GmMDH), excepto para PvMHD7 la cual no presenta secuencias asociadas. Sin embargo, las secuencias de PvMDH1 y PvMDH4 presentan tres secuencias de *G. max* asociadas cada una de *P.vulgaris* como se muestra en la figura 14.

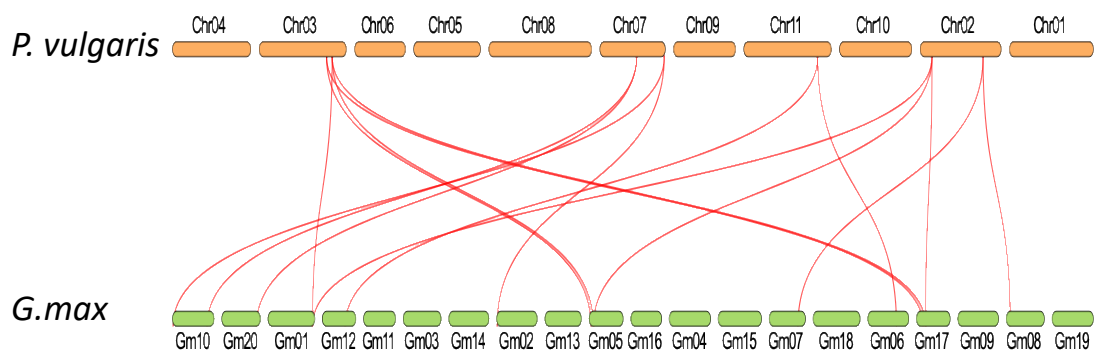


Figura 14: Análisis de sintenia entre las MDH identificadas en *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*. En esta figura se aprecia el resultado del análisis de sintenia entre las MDH de *P. vulgaris* y *G. max*, cada línea representa un evento de duplicación genómica u homología génica entre los genomas de estas dos especies.

5.5 Determinación de los elementos *cis*-reguladores y la expresión de MDH en el proceso simbiótico.

La expresión de una secuencia se encuentra estrechamente relacionada con los elementos *cis*-reguladores presentes en su promotor. El análisis de los promotores de las MDH de *Phaseolus vulgaris* permitió la identificación de 360 elementos *cis*-reguladores en los ocho promotores analizados, dichos elementos *cis*-reguladores se clasificaron en cuatro grupos: sensibles a la luz, sensibles a fitohormonas, sensibles a estrés biótico-abiótico y crecimiento-desarrollo de la planta (ver tabla 6).

La familia génica que comprende a la malato deshidrogenasa se encuentra involucrada varios procesos metabólicos y su expresión puede ser regulada, por ejemplo, la MDH está estrictamente regulada por la luz a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina, durante oscuridad esta inactiva y durante la luz esta activada (Miginiac-Maslow et al., 2000). Los promotores de las PvMDH en *P. vulgaris* presentaron un rango de elementos de respuesta a la luz de 6 para la secuencia PvMDH7 a 23 para la secuencia PvMDH5. De forma similar se ha documentado que las MDH son susceptibles a los estímulos por fitohormonas como se demuestra cuando óvulos de algodón son tratados con ácido indol-acético más ácido giberélico, la expresión de la MDH se encuentra aumentada (Dhindsa, 1978). Interesantemente, la mayoría de las MDH de *P. vulgaris* presentan elementos *cis*-reguladores con relacionados a una respuesta por las fitohormonas y encontramos que las MDH de *P. vulgaris* presentaron un rango de 6 a 12 para las secuencias de PvMDH8 y PvMDH2 respectivamente.

Por otra parte, se ha documentado que en el estrés salino se observan cambios en la actividad de la malato deshidrogenasa mitocondrial, asociada a el proceso de nodulación (Eprintsev et al., 2021; Miller et al., 1998) la cual se expresa más en nódulos de las plantas infectadas. Para el grupo de respuesta al estrés biótico-abiótico encontramos de 8 a 30 elementos para las secuencias PvMDH5 y PvMDH4. Finalmente, para los elementos relacionados con el crecimiento y desarrollo se ha reportado que en *Arabidopsis thaliana* la importancia de una MDH denominada como pdNAD-MDH la cual desempeña un papel vital en el desarrollo de los plástidos (Schreier et al., 2018). En *P. vulgaris* encontramos un rango de 0 para la PvMDH3 a 9 para la secuencia PvMDH7. De manera general, encontramos que los elementos *cis*-reguladores sensibles al estrés fueron los que

presentaron una mayor frecuencia en todos los promotores analizados encontrándose 130 elementos; seguidos de los sensibles a la luz con 118; seguido de 86 elementos para los sensibles a fitohormonas y por último los involucrados en el crecimiento y desarrollo con 26 elementos. De manera general 56 elementos *cis*-reguladores diferentes fueron encontrados en los 4 grupos a diferencia de los 41 reportados por (Yıldız et al., 2021).

Tabla 6: Clasificación de los elementos *cis*-reguladores encontrados en las regiones promotoras de las MDH identificadas en *Phaseolus vulgaris*.

Sensibles a la luz	Sensibles a fitohormonas	Sensibles al estrés biótico/abiótico	Crecimiento y desarrollo de la planta
3-AF3 binding site	ABRE	ARE	CAT-box
A-box	ABRE3a	as-1	AAGAA-motif
ACE	ABRE4	CCAAT-box	AP-1
AE-box	CGTCA-motif	DRE core	CARE
AT1-motif	ERE	GC-motif	CCGTCC motif
Box 4	P-box	LTR	CCGTCC-box
CAG-motif	TATC-box	MBS	circadian
chs-CMA1a	TCA	MYB	F-box
GA-motif	TCA-element	MYB recognition site	HD-Zip 3
GATA-motif	TGA-box	Myb-binding site	O2-site
G-box	TGACG-motif	MYC	RY-element
GT1-motif	TGA-element	STRE	
I-box		TC-rich repeats	
LAMP-element		W-box	
MRE		WRE3	
TCCC-motif		WUN-motif	
TCT-motif			

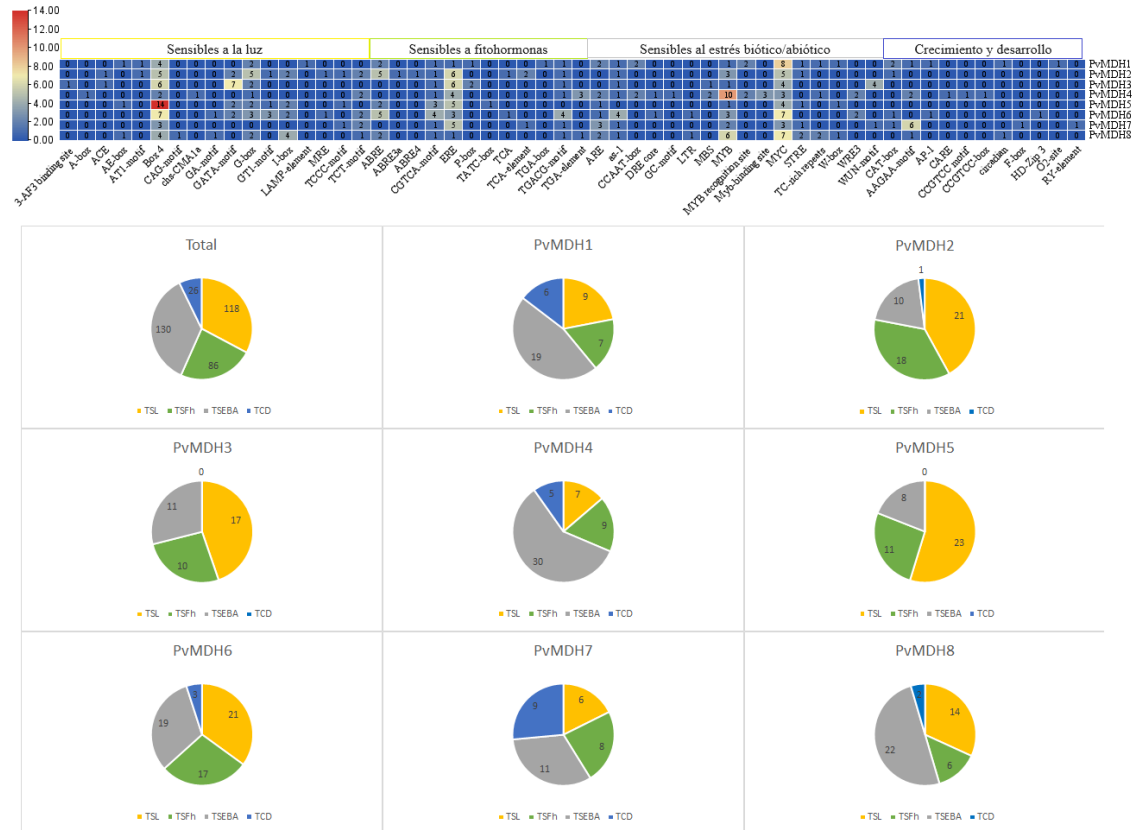


Figura 15: **Distribución de los elementos *cis*-reguladores en las secuencias MDH identificadas en *Phaseolus vulgaris*.** TSL: total de sensibles a la luz; TSFh: total de sensibles a fitohormonas; TSEBA: total de sensibles a estrés biótico y abiótico; TCD: total de involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta.

En la actualidad existen atlas de expresión en *Phaseolus vulgaris* en varios procesos y un atlas que contiene datos relacionados con diferentes partes de la planta el cual se centra en el proceso de nodulación (O'Rourke et al., 2014). Para realizar el análisis utilizando el atlas, los datos fueron divididos en dos secciones. La primera sección se consideró únicamente a la parte aérea el cual incluye: hojas, tallo, brote, flor, vaina y semillas; y una segunda sección corresponde a raíz y nódulos. En esta sección se analizan tres transcriptomas (dos de nodulación en diferentes tiempos, 24 h, 5 y 21 días después de la infección y uno más, de nodulación y micorrización 7 días después de la infección), de los cuales sus datos están disponibles, adicionalmente encontramos un par más (ambos de micorrización). Sin embargo, sus datos no estaban disponibles (Nanjareddy et al., 2017; Recchia et al., 2018).

En la figura 16 se muestran los datos de la primera sección en donde se observa que las PvMDH1 y PvMDH7 tienen valores de expresión de 0 a 17 RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas), en todas las muestras correspondientes parte aérea de la planta, mientras las secuencias PvMDH6 y PvMDH8 son las que presentan los valores más altos entre 73 a 514 RPKM en todas las muestras analizadas.

En la sección dos (raíz y nódulos) encontramos de igual forma que en la sección uno que las secuencias PvMDH1 y PvMDH7 tienen una baja expresión en todas las muestras de tejidos de la raíz de 0 a 6 RPKM, mientras las secuencias PvMDH6 y PvMDH8 son las que presentan los valores más altos en todas las muestras analizadas de 68 a 420 RPKM. Las secuencias PvMDH3 y PvMDH5 muestran un cambio de al menos el doble del valor si comparamos a los 21 días entre los nódulos con la bacteria capaz de fijar nitrógeno y los inoculados con la bacteria incapaz de fijar nitrógeno, como se observa en la figura 17.

En la figura 18 podemos observar el análisis de los otros dos transcriptomas relacionados a la nodulación y micorrización, en el primero (A) se muestra una consistencia en los niveles de expresión para los tres transcriptomas analizados en el cual las secuencias PvMDH1 y PvMDH7 tiene valores bajos respecto a las demás secuencias de las PvMDH analizadas de 0 a 13 RPKM, el análisis del tercer transcriptoma mostrado en la segunda sección (B) de esta figura, es consistente de manera general con los valores para las secuencias PvMDH1 y PvMDH7 que son de 0 a 13 y para las secuencias PvMDH6 y PvMDH8 son las de mayor nivel de expresión en ambas secciones de la figura. De manera particular la sección (B) compara dos procesos simbióticos, la nodulación (R_BAC) y la micorrización (R_MYC), en la cual se aprecia que en la nodulación es donde mayor expresión se alcanza si se toma en cuenta solo aquellas PvMDHs con un nivel de expresión considerable, PvMDH1, 2 y 7 muestran muy poca expresión de 0 a 57 RPKM, en contraste PvMDH6 y 8 son quienes nuevamente alcanzan lecturas de 175 a 3755 RPKM.

De manera general, encontramos que las secuencias PvMDH1 y 7 presentaron una baja expresión en todas las muestras de las tres figuras (16, 17 y 18), contrario a las secuencias de PvMDH6 y 8 que tienen los valores más altos en todas las muestras

analizadas al igual que en las plantas de frijol cuando son tratadas con un estrés salino, (Yıldız et al., 2021).

Finalmente, las secuencias PvMDH3 y PvMDH5 alcanzan su máximo nivel de expresión en nódulos efectivos a los 21 días, de igual manera PvMDH6 y PvMDH8 se expresan casi al máximo en nódulos efectivos y raíz a los 5 días. La participación de las malato deshidrogenasas en la nodulación ya se ha reportado en el chícharo en donde se observó un aumento de la actividad de la malato deshidrogenasa por gramo de material y el aumento esta relaciona con el aumento en la actividad de la nitrogenasa (Appels & Haaker, 1988).

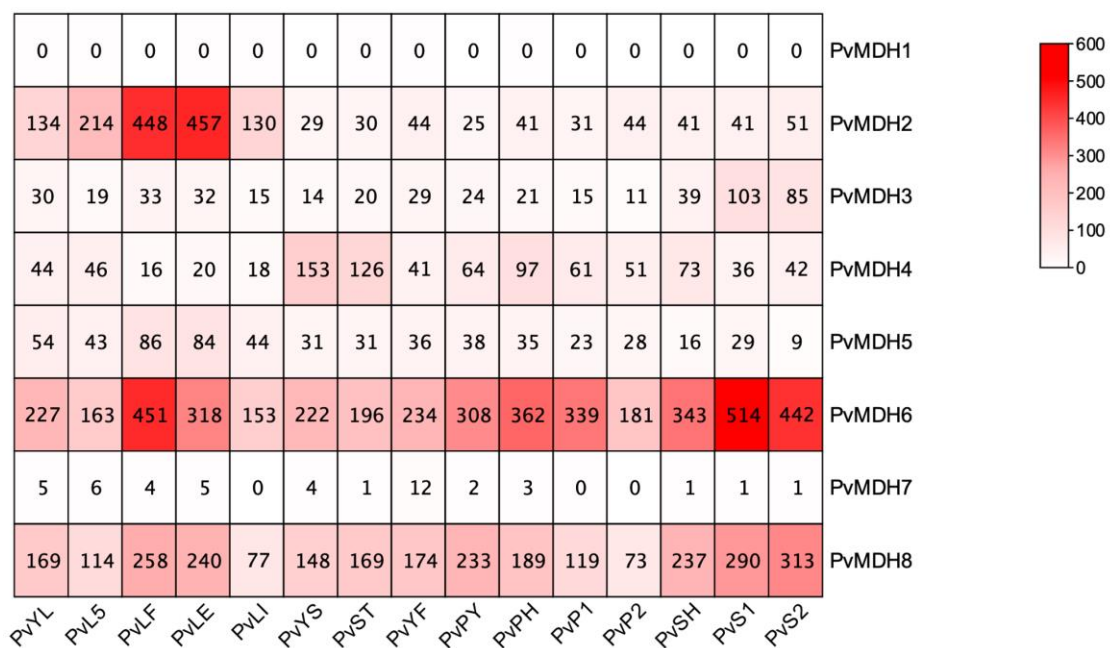


Figura 16: **Análisis de expresión de las PvMDH en tejidos aéreos de *Phaseolus vulgaris*.** PvYL: tejido foliar de plantas provistas de fertilizante; PvL5: tejido foliar recolectado 5 días después de que las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium* efectivo; PvLF: tejido foliar de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo de LE y LI; PvLE: tejido foliar recolectado 21 días después de que las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium* efectivo; PvLI: tejido foliar recolectado 21 días después de que las plantas fueron inoculadas con *Rhizobium* ineficaz; PvYS: tejido del tallo recolectado en la 2ª etapa trifoliada; PvST: punta del brote recolectada en la 2ª etapa trifoliada; PvYF: flores jóvenes, recolectadas antes de la emergencia floral; PvPY: vainas jóvenes, recolectadas de 1 a 4 días después de la senescencia floral; PvPH: vainas de aproximadamente 9 cm de largo; PvP1: vainas entre 10 y 11 cm de largo; PvP2: vainas de entre 12 y 13 cm de largo; PvSH: semillas en etapa de corazón, aproximadamente 7 mg; PvS1: semillas en etapa 1, aproximadamente 50 mg; PvS2: semillas en etapa 2, entre 140 y 150 mg.

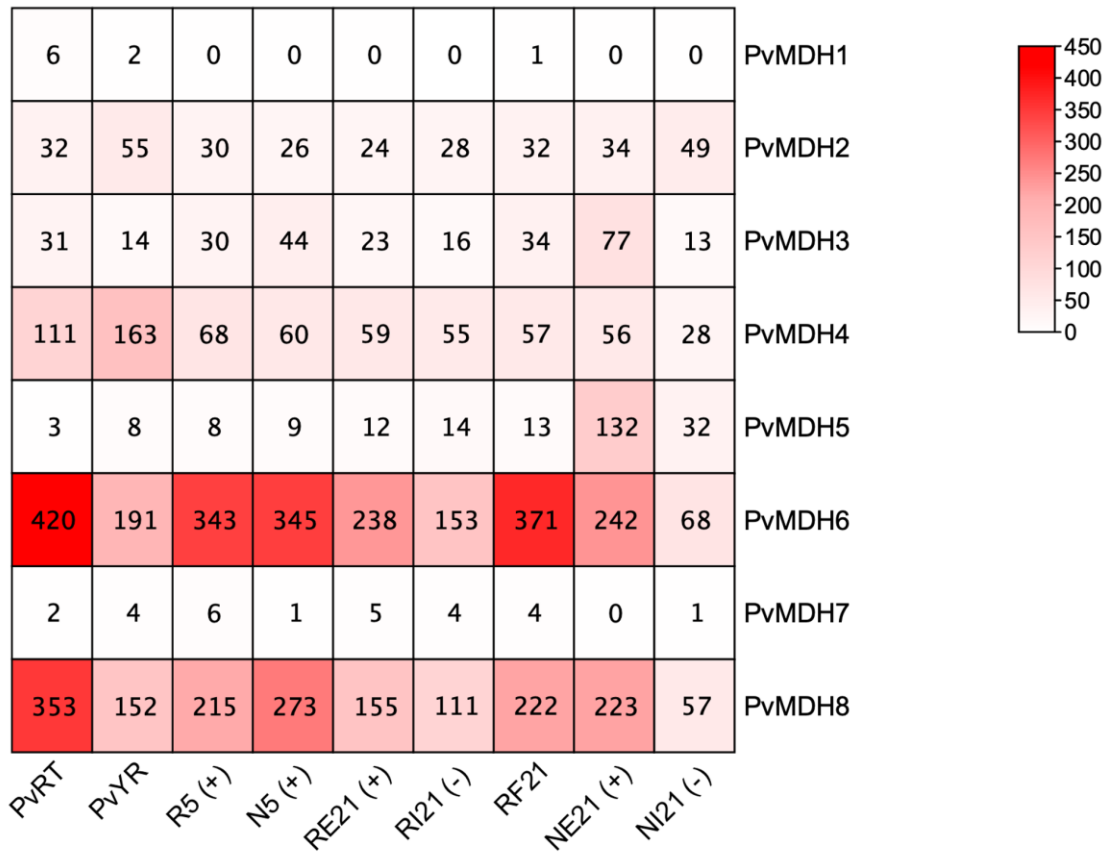


Figura 17: **Análisis de expresión de las PvMDH en tejidos de raíz y nódulos en *Phaseolus vulgaris*.** PvRT: puntas de las raíces, recolectadas de plantas fertilizadas en la 2ª etapa trifoliada de desarrollo; PvYR: raíces enteras, recolectadas en la 2ª etapa trifoliada de desarrollo; R5 (+): raíces enteras separadas de nódulos de prefijación de 5 días de edad; N5 (+): nódulos en fijación recolectados 5 días después de la inoculación; RE21 (+): raíces enteras separadas de nódulos en fijación recolectados 21 días después de la inoculación; RI21 (-): raíces enteras separadas de nódulos sin fijar recolectados 21 días después de la inoculación; RF21: raíces enteras de plantas fertilizadas recolectadas al mismo tiempo que RE21 y RI21; NE21 (+): nódulos en fijación recolectados 21 días después de la inoculación; NI21 (-): fijación ineficaz de nódulos recolectados 21 días después de la inoculación.

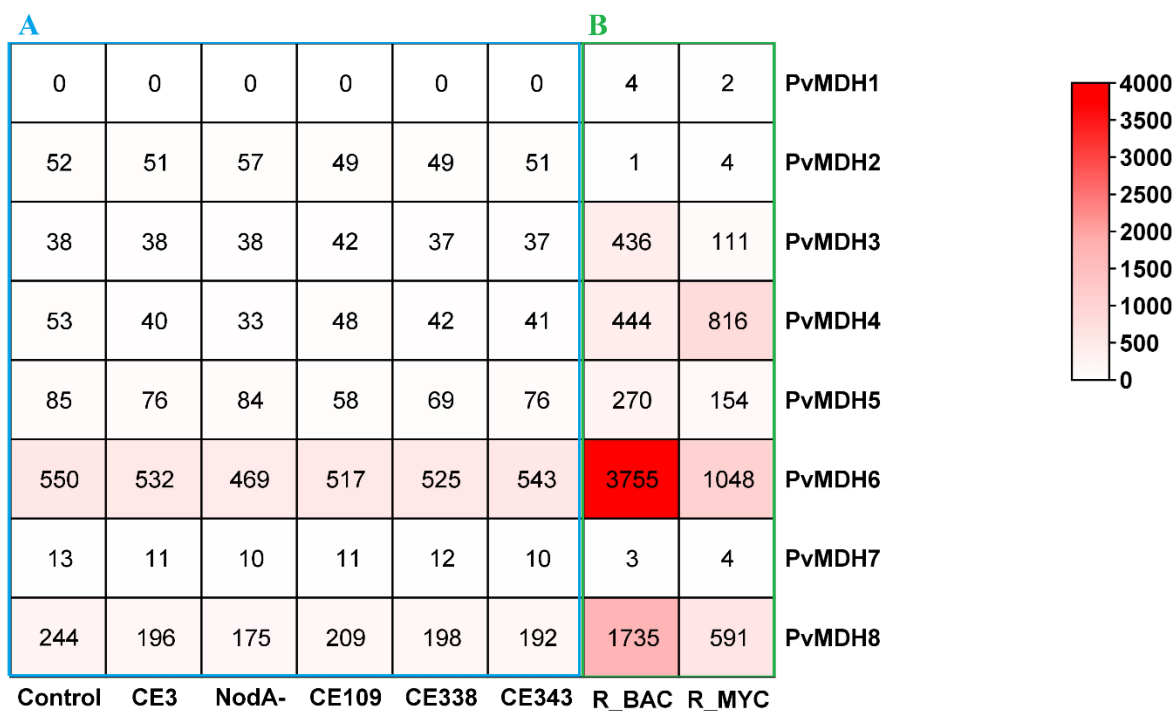


Figura 18: **Análisis de expresión de las PvMDH en nodulación y micorrización.** En (A, recuadro azul) se muestran los valores de expresión normalizados de raíces inoculadas con diferentes cepas de *Rhizobium etli* a las 24 horas después de la infección. En (B, recuadro verde) los valores de expresión normalizados a partir de raíces inoculadas con *Rhizobium tropici* (cepa CIAT899) y *Rhizophagus irregularis* a los siete días después de la infección. Cabe destacar que estos son dos conjuntos de datos provenientes de diferentes análisis de expresión completamente independientes.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron ocho secuencias que presentan los dominios Ldh_1_N y Ldh_1_C presentes en las MDHs y estas secuencias se encuentran distribuidas en cinco de los cromosomas. Adicionalmente, siete de las secuencias de las MDH de *P.vulgaris* presentaron una relación sinténica con el genoma de *G.max*. El análisis del promotor y la búsqueda en un atlas de expresión permitió establecer una posible relación entre los elementos *cis*-reguladores y los datos de expresión presentes en el atlas analizado para las secuencias PvMDH6 y PvMDH8, ya que son las que presentan elementos de respuesta a estrés biótico y abiótico en la secuencia del promotor y en las otras secuencias no fue clara una relación. Estos brindan una oportunidad para futuras investigaciones relacionadas a elucidar el papel de las MDHs en *P.vulgaris*.

VII. LITERATURA CITADA

- Anass, K., Reda, B. M., Imad, K., Redouane, E. O., Youssef, B., Amina, A., & Mohamed, N. (2021). Effect of mycorrhization on growth and enzymes involved in carbon/nitrogen interaction in sorghum plants. *Research Journal of Biotechnology Vol, 16*, 1.
- Appels, M. A., & 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), 515–522.
- Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., & Nielsen, H. (2019). Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life science alliance*, *2*(5).
- Balparada, M., Elsässer, M., Badia, M. B., Giese, J., Bovdilova, A., Hüdig, M., Reinmuth, L., Eirich, J., Schwarzlaender, M., & Finkemeier, I. (2022). Acetylation of conserved lysines fine-tunes mitochondrial malate dehydrogenase activity in land plants. *The Plant Journal*, *109*(1), 92–111.
- Bansal, P., Morgat, A., Axelsen, K. B., Muthukrishnan, V., Coudert, E., Aimò, L., Hyka-Nouspikel, N., Gasteiger, E., Kerhornou, A., Neto, T. B., Pozzato, M., Blatter, M.-C., Ignatchenko, A., Redaschi, N., & Bridge, A. (2022). Rhea, the reaction knowledgebase in 2022. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D693–D700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1016>
- Beevers, H. (1980). The role of the glyoxylate cycle. En *Lipids: Structure and Function* (pp. 117–130). Elsevier.

- Belarmino, L. C., Lane De Oliveira Silva, R., Da Mota Soares Cavalcanti, N., Krezdorn, N., Kido, E. A., Horres, R., Winter, P., Kahl, G., & Benko-Iseppon, A. M. (2013). SymGRASS: A database of sugarcane orthologous genes involved in arbuscular mycorrhiza and root nodule symbiosis. *BMC Bioinformatics*, *14*(S1), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S1-S2>
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, *38*(2), 21–29.
- Chao, J., Li, Z., Sun, Y., Aluko, O. O., Wu, X., Wang, Q., & Liu, G. (2021). MG2C: A user-friendly online tool for drawing genetic maps. *Molecular Horticulture*, *1*(1), 1–4.
- Chatterjee, Y., Bhowal, B., Gupta, K. J., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2023). Lactate Dehydrogenase Superfamily in Rice and Arabidopsis: Understanding the Molecular Evolution and Structural Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5900.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, *13*(8), 1194–1202.
- Chen, X., Zhang, J., Zhang, C., Wang, S., & Yang, M. (2019). *Genome-wide investigation of malate dehydrogenase gene family in poplar (Populus trichocarpa) and their expression analysis under salt stress (2167–9843)*. PeerJ Preprints.
- Chen, Y., Fu, Z., Zhang, H., Tian, R., Yang, H., Sun, C., Wang, L., Zhang, W., Guo, Z., & Zhang, X. (2020). Cytosolic malate dehydrogenase 4 modulates cellular

- energetics and storage reserve accumulation in maize endosperm. *Plant Biotechnology Journal*, 18(12), 2420–2435.
- Dalla Via, V., Narduzzi, C., Aguilar, O. M., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2015). Changes in the common bean transcriptome in response to secreted and surface signal molecules of *Rhizobium etli*. *Plant physiology*, 169(2), 1356–1370.
- De los Santos Ramos, M., Rosales, T. R., & Soto, E. E. B. (2017). Dinámica de la producción de maíz y frijol en México de 1980 a 2014. *Agronomía Mesoamericana*, 439–453.
- Deng, Z., Botas, J., Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Burguet-Castell, J., & Huerta-Cepas, J. (2022). PhyloCloud: An online platform for making sense of phylogenomic data. *Nucleic acids research*, 50(W1), W577–W582.
- Dhindsa, R. S. (1978). Hormonal regulation of enzymes of nonautotrophic CO₂ fixation in unfertilized cotton ovules. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 89(4), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(78\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(78)80008-7)
- Ding, Y., & Ma, Q.-H. (2004). Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie*, 86(8), 509–518.
- Egli, M. A., Griffith, S. M., Miller, S. S., Anderson, M. P., & Vance, C. P. (1989). Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controlled ineffective alfalfa nodules. *Plant Physiology*, 91(3), 898–904.
- Eprintsev, A., Fedorin, D., & Fedorina, O. (2021). Features of the functioning of succinate dehydrogenase and malate dehydrogenase in leaves of spinach

- (*Chenopodium foliosum* L.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) under salt stress conditions. *Biology Bulletin*, 48, 57–64.
- Fischinger, S. A., Hristozkova, M., Mainassara, Z.-A., & Schulze, J. (2010). Elevated CO₂ concentration around alfalfa nodules increases N₂ fixation. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 121–130.
- Flores, M. L. (2015). *El cultivo del frijol en México*.
- Folli-Pereira, M. da S., Meira-Haddad, L. S., Bazzolli, D. M. S., & Kasuya, M. C. M. (2012). Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36, 1663–1679.
- Fonseca-García, C., Zayas, A. E., Montiel, J., Nava, N., Sánchez, F., & Quinto, C. (2019). Transcriptome analysis of the differential effect of the NADPH oxidase gene RbohB in *Phaseolus vulgaris* roots following *Rhizobium tropici* and *Rhizophagus irregularis* inoculation. *BMC genomics*, 20, 1–18.
- Gabay-Maskit, S., Cruz-Zaragoza, L. D., Shai, N., Eisenstein, M., Bibi, C., Cohen, N., Hansen, T., Yifrach, E., Harpaz, N., & Belostotsky, R. (2020). A piggybacking mechanism enables peroxisomal localization of the glyoxylate cycle enzyme Mdh2 in yeast. *Journal of cell science*, 133(24), jcs244376.
- Garg, N. & Geetanjali. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: Process and signaling: A review. *Sustainable agriculture*, 519–531.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.

- Gietl, C. (1992). Malate dehydrogenase isoenzymes: Cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1100(3), 217–234.
- Gómez, L. I. A., Portugal, V. O., Arriaga, M. R., & Alonso, R. C. (2007). Micorrizas arbusculares. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 14(3), 300–306.
- Goodman, M. M., Newton, K. J., & Stuber, C. W. (1981). Malate dehydrogenase: Viability of cytosolic nulls and lethality of mitochondrial nulls in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3), 1783–1785.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., & Putnam, N. (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1178–D1186.
- Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155–161.
- Hall, M. D., Levitt, D. G., & Banaszak, L. J. (1992). Crystal structure of Escherichia coli malate dehydrogenase: A complex of the apoenzyme and citrate at 1.87 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 226(3), 867–882.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585–W587.

- Huisman, R., & Geurts, R. (2020). A Roadmap toward Engineered Nitrogen-Fixing Nodule Symbiosis. *Plant Communications*, *1*(1), 100019.
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100019>
- Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *The Journal of Biochemistry*, *88*(6), 1895–1898.
- Imran, M., & Liu, J.-Y. (2016). Genome-wide identification and expression analysis of the malate dehydrogenase gene family in *Gossypium arboreum*. *Pak. J. Bot.*, *48*(3), 1081–1090.
- Imran, M., Munir, M. Z., Ialhi, S., Abbas, F., Younus, M., Ahmad, S., Naeem, M. K., Waseem, M., Iqbal, A., & Gul, S. (2022). Identification and Characterization of Malate Dehydrogenases in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17), 10028.
- Imran, M., Tang, K., & Liu, J.-Y. (2016). Comparative genome-wide analysis of the malate dehydrogenase gene families in cotton. *PLoS One*, *11*(11), e0166341.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, *157*(1), 105–132.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Labrou, N. E., & Clonis, Y. D. (1997). L-Malate dehydrogenase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification and characterization. *Archives of biochemistry and biophysics*, *337*(1), 103–114.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, *30*(1), 325–327.

- Lim, S.-L., Voon, C. P., Guan, X., Yang, Y., Gardeström, P., & Lim, B. L. (2020). In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors. *Nature communications*, *11*(1), 3238.
- Lin, Y., Chen, W., Yang, Q., Zhang, Y., Ma, X., & Li, M. (2023). Genome-Wide Characterization and Gene Expression Analyses of Malate Dehydrogenase (MDH) Genes in Low-Phosphorus Stress Tolerance of Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*). *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(5), 4414. <https://doi.org/10.3390/ijms24054414>
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., & Song, J. S. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic acids research*, *48*(D1), D265–D268.
- Ma, B., Yuan, Y., Gao, M., Xing, L., Li, C., Li, M., & Ma, F. (2018). Genome-wide identification, classification, molecular evolution and expression analysis of malate dehydrogenases in apple. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3312.
- Miginiac-Maslow, M., Johansson, K., Ruelland, E., Issakidis-Bourguet, E., Schepens, I., Goyer, A., Lemaire-Chamley, M., Jacquot, J., Le Maréchal, P., & Decottignies, P. (2000). Light-activation of NADP-malate dehydrogenase: A highly controlled process for an optimized function. *Physiologia Plantarum*, *110*(3), 322–329.
- Miller, S. S., Driscoll, B. T., Gregerson, R. G., Gantt, J. S., & Vance, C. P. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): Molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *The Plant Journal*, *15*(2), 173–184.

- Miranda Colín, S. (1967). *Origen de Phaseolus vulgaris L (Frijol Común)*.
- Musrati, R., Kollarova, M., Mernik, N., & Mikulasova, D. (1998). Malate dehydrogenase: Distribution, function and properties. *General physiology and biophysics*, 17, 193–210.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M.-K., Gómez, B.-M., Blanco, L., & Lara, M. (2017). Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PLoS One*, 12(8), e0182328.
- Nápoles, M. C., Gómez, G., & Costales, D. (2008). Factores de nodulación. Experiencia en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 29(2), 71–80.
- Nielsen, T. T., Støttrup, N. B., Løfgren, B., & Bøtker, H. E. (2011). Metabolic fingerprint of ischaemic cardioprotection: Importance of the malate–aspartate shuttle. *Cardiovascular research*, 91(3), 382–391.
- 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. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. *BMC genomics*, 15(1), 1–17.
- Prieto-Cornejo, M. R., Matus-Gardea, J. A., Gavi-Reyes, F., Omaña-Silvestre, J. M., Brambila-Paz, J. J., Sánchez-Escudero, J., & Martínez-Damián, M. Á. (2019). Evolución de la superficie cultivada de frijol e impacto económico de la sequía sobre su rendimiento bajo condiciones de temporal en México. *Revista fitotecnia mexicana*, 42(2), 173–182.
- Recchia, G. H., Konzen, E. R., Cassieri, F., Caldas, D. G., & Tsai, S. M. (2018). Arbuscular mycorrhizal symbiosis leads to differential regulation of drought-

- responsive genes in tissue-specific root cells of common bean. *Frontiers in Microbiology*, 9, 385808.
- Ryan, D. G., & O'Neill, L. A. (2020). Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism. *Annual review of immunology*, 38, 289–313.
- SAGARPA. (2017). Planeación agrícola nacional 2017-2030. *Frijol mexicano*.
- Schreier, T. B., Cléry, A., Schläfli, M., Galbier, F., Stadler, M., Demarsy, E., Albertini, D., Maier, B. A., Kessler, F., & Hörtensteiner, S. (2018). Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase: A moonlighting protein involved in early chloroplast development through its interaction with an FtsH12-FtsHi protease complex. *The Plant Cell*, 30(8), 1745–1769.
- Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Samac, D., Allan, D., & Vance, C. (2002). Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant and Soil*, 247, 133–139.
- SIAP, S. (2017). Anuario estadístico de la producción agrícola. *Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Skiada, V., Avramidou, M., Bonfante, P., Genre, A., & Papadopoulou, K. K. (2020). An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytologist*, 226(5), 1429–1444.
<https://doi.org/10.1111/nph.16457>
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., & Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4(6), 1581–1590.
- Takahashi-Íñiguez, T., Aburto-Rodríguez, N., Vilchis-González, A. L., & Flores, M. E. (2016). Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial

malate dehydrogenase. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(4), 247–261.

Tang, H., Bomhoff, M. D., Briones, E., Zhang, L., Schnable, J. C., & Lyons, E. (2015). SynFind: Compiling Syntenic Regions across Any Set of Genomes on Demand. *Genome Biology and Evolution*, 7(12), 3286–3298.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evv219>

Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Nielsen, H., & Winther, O. (2022). DeepLoc 2.0: Multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W228–W234.

Tomaz, T., Bagard, M., Pracharoenwattana, I., Lindén, P., Lee, C. P., Carroll, A. J., Ströher, E., Smith, S. M., Gardeström, P., & Millar, A. H. (2010). Mitochondrial Malate Dehydrogenase Lowers Leaf Respiration and Alters Photorespiration and Plant Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(3), 1143–1157.

<https://doi.org/10.1104/pp.110.161612>

Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C., & Ulloa Rangel, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): Su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *CONACYT*.

Wang, Z.-A., Li, Q., Ge, X.-Y., Yang, C.-L., Luo, X.-L., Zhang, A.-H., Xiao, J.-L., Tian, Y.-C., Xia, G.-X., Chen, X.-Y., Li, F.-G., & Wu, J.-H. (2015). The mitochondrial malate dehydrogenase 1 gene GhmMDH1 is involved in plant and root growth under phosphorus deficiency conditions in cotton. *Scientific Reports*, 5(1),

10343. <https://doi.org/10.1038/srep10343>

Yao, Y.-X., Dong, Q.-L., Zhai, H., You, C.-X., & Hao, Y.-J. (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), 257–264.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.009>

Yıldız, S., Okay, A., & Büyük, İ. (2021). Defining the roles of PvMDH genes in response to salt stress and detailed characterization of the gene family. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1–14.

Yu, C., Lin, C., & Hwang, J. (2004). Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein science*, 13(5), 1402–1406.

Yudina, R. S. (2012). Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(04), 370–377. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34053>

Zhang, Y., Wang, Y., Sun, X., Yuan, J., Zhao, Z., Gao, J., Wen, X., Tang, F., Kang, M., & Abliz, B. (2022). Genome-Wide Identification of MDH Family Genes and Their Association with Salt Tolerance in Rice. *Plants*, 11(11), 1498.