

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



Escuela Superior de Apan Hidalgo

Tesis de licenciatura

Actividad del promotor de la Planta Cisteína Oxidasa 1 de *Phaseolus vulgaris* durante la interacción con *Rhizobium tropici* y bajo condiciones de estrés por anegamiento

Para obtener el título de:

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

Presenta

Belen Olvera Vicente

Director:

Dr. Luis Cárdenas Torres

Instituto de Biotecnología, UNAM

Codirector:

Dr. Martín Peralta Gil

Escuela superior de Apan, UAEH

Agosto de 2026, Apan, Hgo.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAP-Bio-038-2026
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Belen Olvera Vicente P.D.L.I.B.C.

PRESENTE

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias, **Belen Olvera Vicente (445789)**, a quien le presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Actividad del promotor de la Planta Cisteína Oxidasa 1 de *Phaseolus vulgaris* durante la interacción con *Rhizobium tropici* y bajo condiciones de estrés por anegamiento”**, después de la revisión, ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. Luis Cardenas Torres

PRIMER VOCAL: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SEGUNDO VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

TERCER VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

SUPLENTE 1: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SUPLENTE 2: Dra. Gisela Ortiz Yescas

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Chimalpa, Apan, Hgo., México a 02 de julio de 2026.


Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinador de Ingeniería en Biociencias



“Amor, Orden y Progreso”



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43000
Teléfono: 7717172000 Ext. 50900
esap@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Luis Cárdenas Torres por su orientación, apoyo y conocimientos compartidos a lo largo de esta etapa. Su experiencia y compromiso con la investigación fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto.

Asimismo, agradezco sinceramente a los integrantes de mi comité de tesis por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo. En especial, quiero reconocer al Dr. Martín Peralta por su disposición y su acompañamiento académico durante este proceso.

Extiendo también mi agradecimiento al Consorcio de Interacciones Planta-Microorganismo por brindarme un espacio de aprendizaje, crecimiento y formación científica. En especial, agradezco a la Dra. Ana Isabel Chávez Martínez por su apoyo, paciencia y confianza, así como por todas las enseñanzas compartidas durante mi formación.

A mis padres, Raymundo Olvera Romero y Abigail Vicente Morelos, quiero agradecerles por sostenerme en los momentos más difíciles, por creer en mí y por enseñarme, con su ejemplo, el valor del esfuerzo, la humildad y la perseverancia. Cada sacrificio, cada desvelo y cada palabra de aliento fueron fundamentales para llegar hasta aquí. Este logro no es solamente mío, también pertenece a ustedes, todo lo que soy y todo lo que he logrado ha sido gracias al amor incondicional que me han brindado durante toda mi vida. Igualmente, agradezco a mis hermanos, Monserrat Olvera y Raymundo Olvera, por acompañarme a lo largo de este camino y por ser una parte tan importante de mi vida. Gracias por estar presentes incluso en los días más difíciles. Crecer junto a ustedes me enseñó el valor de la unión, del apoyo y de la familia.

Finalmente, agradezco a mis amigos, especialmente a Schere, por todos los momentos compartidos y por acompañarme durante esta etapa llena de retos y aprendizajes. Gracias por hacer más ligero el camino y por formar parte de este logro.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el consorcio de Interacciones Planta-Microorganismo adscrito al Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se agradece el apoyo técnico del M. C. Juan Elías Olivares Grajales y a la Biol. Olivia Santana Estrada en la realización de este trabajo. Igualmente se agradece a la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación del Instituto de Biotecnología.

La investigación se realizó gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) mediante los apoyos No. 253247, No. 319643, No. 58323 y No. 132155 a LC y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM, mediante el donativo DGAPA IN-221224.

RESUMEN

El oxígeno es un elemento fundamental para el metabolismo vegetal y participa en procesos esenciales como la respiración celular y la fotosíntesis. Sin embargo, la disponibilidad de oxígeno puede fluctuar, generando condiciones de hipoxia tanto por factores ambientales, como el anegamiento o la compactación del suelo, así como por procesos de desarrollo que ocurren en meristemas, endospermo y nódulos de leguminosas. En estos últimos, las leguminosas como *Phaseolus vulgaris* mantienen un microambiente hipóxico que favorece la actividad de la nitrogenasa bacteriana y regulan el suministro de oxígeno mediante la leghemoglobina. A nivel molecular, la respuesta a los cambios en la disponibilidad de oxígeno es regulada por los factores ERF-VII, cuya estabilidad depende de la vía N-terminal y de la acción de las Planta Cisteína Oxidasas (PCOs), enzimas dependientes de oxígeno.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad del promotor *pPvPCO1* de *P. vulgaris* en condiciones de anegamiento y durante la nodulación. Se realizó un análisis *in silico* de 2408 pb río arriba del codón de inicio, en el que se identificaron elementos cis-regulatorios asociados a la hipoxia y la nodulación. Además, mediante la construcción *pPvPCO1::GFP-GUS*, se analizó su actividad en raíces transgénicas. Los resultados muestran que el promotor *pPvPCO1* se induce bajo anegamiento de manera dependiente del tiempo, con actividad localizada preferentemente en regiones meristemáticas y vasculares, y también se encuentra activo durante la organogénesis del nódulo, lo que sugiere que *pPvPCO1* puede participar en la regulación de las respuestas relacionadas con el oxígeno tanto durante el estrés por anegamiento como durante el desarrollo de los nódulos simbióticos.

ABSTRACT

Oxygen is essential for plant metabolism and plays a central role in essential processes such as cellular respiration and photosynthesis. However, oxygen availability may fluctuate, leading to hypoxic conditions caused by environmental factors, such as flooding or soil compaction, as well as by developmental processes occurring in meristems, the endosperm, and legume nodules. In the nodules, legumes such as *Phaseolus vulgaris* maintain a hypoxic microenvironment that supports bacterial nitrogenase activity while regulating oxygen supply through leghemoglobin. At the molecular level, the response to changes in oxygen availability is controlled by ERF-VII transcription factors, whose stability depends on the N-degron pathway and the activity of Plant Cysteine Oxidases (PCOs), which are oxygen-dependent enzymes.

The aim of this study was to evaluate the activity of the *P. vulgaris* *pPvPCO1* promoter under flooding conditions and during nodulation. An *in silico* analysis of a 2,408 bp region upstream of the start codon identified *cis*-regulatory elements associated with hypoxia and nodulation. In addition, the activity of the promoter was analyzed in transgenic roots carrying the *pPvPCO1::GFP-GUS* construct. The results showed that the *pPvPCO1* is induced in response to flooding in a time-dependent manner, with activity localized primarily in meristematic and vascular regions. In addition, promoter activity was detected during nodule organogenesis, suggesting that *pPvPCO1* may participate in the regulation of oxygen-related responses during both flooding stress and symbiotic nodule development.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Evolución del oxígeno atmosférico.	6
1.2. Oxígeno en el metabolismo de las plantas.	7
1.3. Disponibilidad de oxígeno en plantas.	7
1.3.1. Hipoxia exógena inducida por factores ambientales.	8
1.3.2. Hipoxia endógena en los tejidos vegetales.	12
1.4. Interacción mutualista planta-microorganismos.....	14
1.5. Generalidades de <i>Phaseolus vulgaris</i>	17
1.6. Vía de respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno.....	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo General	27
5.2. Objetivos específicos.....	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. Análisis <i>in silico</i> de los elementos <i>cis</i> -reguladores del gen <i>pPvPCO1</i>	28
6.2. Generación de la construcción molecular	30
6.2.1. Reacción de amplificación y purificación.....	31
6.2.2. Reacción de clonación en el vector pENTR/D-TOPO	31
6.2.3. Reacción de recombinación	32
6.2.4. Transformación en <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599	32
6.2.5. PCR en colonia	33
6.3. Desinfección y germinación de semillas de <i>P. vulgaris</i>	33
6.4. Generación de plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i>	34
6.5. Cinética de anegamiento en plantas compuestas de <i>P. vulgaris</i>	34
6.6. Cinética de nodulación con <i>Rhizobium tropici</i> DsRed	35
6.7. Tinción histoquímica de β -glucuronidasa.....	36
6.8. Visualización por microscopía	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1. Análisis <i>in silico</i> de los elementos <i>cis</i> -regulatorios en la región promotora <i>pPvPCO1</i>	37
7.2. Generación de la construcción molecular del promotor de <i>pPvPCO1</i>	37
7.3. Caracterización de la actividad de <i>pPvPCO1</i> bajo condiciones de estrés por anegamiento.	39
7.4. Caracterización de la actividad del promotor <i>pPvPCO1</i> durante el proceso de nodulación.....	43
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	53
11. REFERENCIAS.....	54
LISTA DE FIGURAS	63
LISTA DE TABLAS	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución del oxígeno atmosférico.

El oxígeno molecular (O_2) es un elemento fundamental para la vida aerobia debido a su participación en diversos procesos metabólicos relacionados con la obtención de energía. En los organismos aerobios, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones durante la respiración celular, que ocurre en la membrana interna de las mitocondrias, lo que permite una producción eficiente de energía en forma de ATP. Además, participa en procesos fisiológicos esenciales, como la fotosíntesis, el metabolismo celular y la señalización mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*). Debido a su elevada capacidad oxidante, la disponibilidad de oxígeno ha influido de manera importante en la evolución y la adaptación de los organismos a lo largo de la historia de la Tierra.

Actualmente, la concentración de oxígeno en la atmósfera terrestre es del 21%. Sin embargo, esta concentración ha fluctuado a lo largo de la evolución de la Tierra. En sus inicios, la atmósfera de la Tierra estaba compuesta por gases y carecía de oxígeno libre. A pesar de ello, hace aproximadamente 3700 millones de años, aparecieron los primeros organismos capaces de sobrevivir en un ambiente anóxico, es decir, sin oxígeno. Esto lo lograron mediante la fotosíntesis anoxigénica, un proceso en el que se obtiene energía a partir del sulfuro de hidrógeno (H_2S) como sustrato y se libera azufre como subproducto (Stamati *et al.*, 2011). Posteriormente, hace 2400 millones de años, al inicio del periodo Proterozoico, ocurrió el Gran Evento de Oxidación, en el que la concentración de oxígeno aumentó drásticamente hasta alcanzar el 2%, debido a la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias. Este incremento de oxígeno provocó bajas temperaturas, lo que desencadenó una glaciación y redujo el efecto invernadero al interactuar con el metano. Durante el periodo Cámbrico, se produjo un aumento crítico de la disponibilidad de oxígeno disuelto en los océanos, lo que permitió la explosión cámbrica, con la aparición de los primeros filos de los animales actuales, hace unos 541 millones de años. (Lenton, 2003; Stamati *et al.*, 2011).

Por su parte, las primeras plantas terrestres, similares a los musgos, comenzaron a colonizar la Tierra hace unos 470 millones de años, durante el periodo Ordovícico, lo que incrementó los niveles de oxígeno hasta un 15% (Harper, 2024). Posteriormente, en el periodo Pérmico-Carbonífero, la proliferación de los bosques permitió que la concentración de oxígeno alcanzara un 35%, propiciando el crecimiento de grandes insectos y plantas; no obstante, con la participación de comunidades microbianas más eficientes y el recambio en la tasa de deposición del carbono, se frenó la acumulación excesiva de oxígeno y, durante el periodo Mesozoico, se sugiere que la disponibilidad de oxígeno disminuyó aproximadamente del 15% al 27% (Hancock, 2022).

1.2. Oxígeno en el metabolismo de las plantas.

En las plantas, durante la fotosíntesis que ocurre en los cloroplastos, las moléculas de clorofila de los fotosistemas I y II absorben luz y desencadenan una serie de reacciones redox que tienen lugar en la membrana del tilacoide. En este proceso, el oxígeno se produce a partir de la fotólisis del agua catalizada por el fotosistema II (Khorobrykh *et al.*, 2020)

Además, el oxígeno participa en la fotorrespiración, que también ocurre en los cloroplastos. En ese proceso, el oxígeno actúa como inhibidor competitivo de la fotosíntesis; los productos de esta reacción entran en una ruta metabólica liberando dióxido de carbono (CO₂) (Petsch, 2003). A diferencia de la respiración celular, la fotorrespiración no produce ATP.

Estos diversos procesos metabólicos, que se llevan a cabo en distintos orgánulos celulares, permiten la generación de especies ROS. Durante la cadena transportadora de electrones, generan una fuga de electrones por la acción del oxígeno, dando lugar a la formación del superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (OH) y el oxígeno singlete (¹O₂) (Mansoor *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2019). Las ROS se producen en diferentes orgánulos, como los cloroplastos (Dietz *et al.*, 2016), los peroxisomas (Sandalio & Romero-Puertas, 2015) y las mitocondrias (Huang *et al.*, 2016).

1.3. Disponibilidad de oxígeno en plantas.

Las plantas son organismos aeróbicos que dependen del oxígeno para llevar a cabo procesos de crecimiento y desarrollo, como el metabolismo energético y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la disponibilidad de oxígeno depende del tipo de tejido y del contexto fisiológico de la planta, y dicha disponibilidad puede fluctuar desde condiciones en las que la concentración de oxígeno suele ser de aproximadamente el 21% (normoxia) hasta condiciones en las que la concentración de oxígeno disminuye por debajo de ese nivel y se establece una condición de hipoxia o bien de ausencia total de oxígeno (anoxia) (Björkman, 1966; Sasidharan *et al.*, 2017). Durante esta última se produce una crisis energética, y su prolongación puede provocar la muerte de la planta.

Por su parte, en lo que respecta a la hipoxia, se distinguen dos tipos: la exógena y la endógena, también conocidos como hipoxia aguda y crónica, respectivamente (Weits & van Dongen, 2021).

1.3.1. Hipoxia exógena inducida por factores ambientales.

En las plantas, la hipoxia exógena suele ser causada por condiciones ambientales específicas que limitan la disponibilidad de oxígeno, a menudo se origina durante la compactación del suelo, así como durante las inundaciones, lo que provoca el anegamiento o sumersión (Loreti *et al.*, 2016; Sasidharan *et al.*, 2017).

Las inundaciones y el anegamiento son fenómenos naturales y se han posicionado como los segundos desastres naturales más riesgosos, afectando a cultivos y plantas y generando un riesgo para la productividad agrícola. Además, esto ha generado pérdidas de alrededor de 21 millones de dólares (Renziehausen *et al.*, 2025).

Cuando las plantas son sometidas a condiciones de anegamiento, una de las primeras respuestas es el cierre estomático en las hojas, lo que ocasiona una reducción de la actividad fotosintética y de la senescencia de estas (Yan *et al.*, 2018; Manghwar *et al.*, 2024). Además, la capacidad de crecimiento de las raíces se ve afectada por la baja disponibilidad de oxígeno, esto genera una disminución en la capacidad de absorción y transporte de nutrientes, afectando de manera negativa el crecimiento y desarrollo de la planta (Manghwar *et al.*,

2024; Herzong *et al.*, 2015). Por su parte, las inundaciones conllevan efectos más severos, afectando la respiración mitocondrial y provocando la sobreproducción de ROS, que ocasiona, entre otros daños oxidativos, daño a los ácidos nucleicos y a las proteínas, así como lipoperoxidación, que compromete las membranas celulares (Pais *et al.*, 2023; Figura 1).

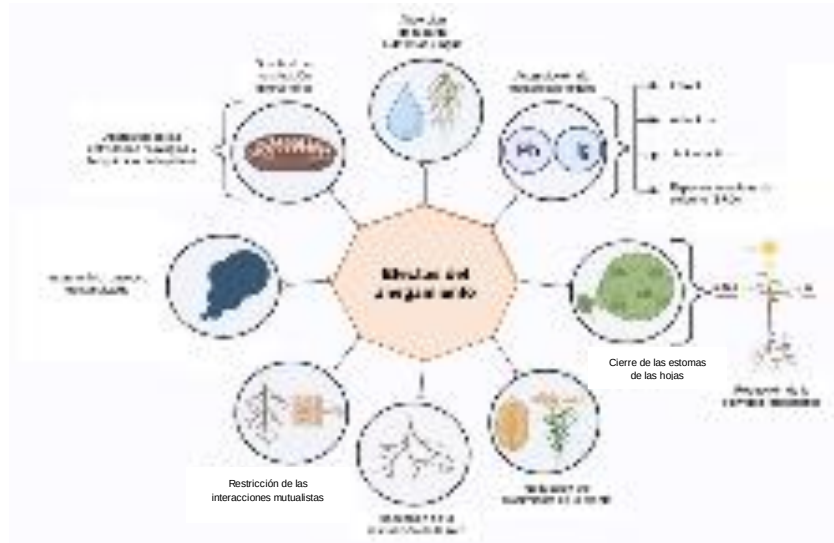


Figura 1. Efectos en la planta ante condiciones de estrés por anegamiento. Modificado de Manghwar *et al.*, 2024.

Sin embargo, ante estas condiciones, las plantas han desarrollado estrategias bioquímicas, fisiológicas y morfológicas que varían según la naturaleza y la duración de la hipoxia (Loreti & Perata, 2020). En estas condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, se reduce la respiración aeróbica y se desencadena una reprogramación transcripcional del metabolismo energético. Esto estimula el metabolismo glucolítico y fermentativo del etanol; la energía generada a través de este proceso es de solo 2 moles de ATP, en comparación con los 36 moles de ATP producidos durante la respiración aerobia (Baxter-Burrell *et al.*, 2024).

Una de las principales respuestas morfológicas específicas de algunas especies de plantas es la formación de arénquima, una estructura que facilita la difusión de gases entre la atmósfera y la raíz (Bailey-Serres y Voesenek, 2008; Armstrong *et al.*, 1991; Parolin, 2009). Asimismo, la formación de la barrera que impide la pérdida radical del oxígeno (ROL, por sus siglas en inglés, *Radial*

Oxygen Loss), lo que permite mejorar la difusión del oxígeno, impide la entrada de fitotoxinas a la raíz e inhibe la metanogénesis disminuyendo el flujo del metano a través de su oxidación (Li *et al.*, 2006).

Otra adaptación es la formación de raíces adventicias, que permiten absorber y transportar oxígeno debido a su mayor cantidad de arénquima en comparación con las raíces primarias (Steffens & Rasmussen, 2016). También se presenta el desarrollo de lenticelas hipertrofiadas, que permiten a la planta el intercambio gaseoso y constituyen una respuesta característica de las especies leñosas (Kawase, 1979). Además, el transporte de agua a través del xilema puede verse comprometido, debido a la disminución de la actividad de las acuaporinas, proteínas encargadas del transporte controlado de agua a través de las membranas celulares (Sauter, 2013; Chavez Suarez *et al.*, 2014, Figura 2).

El cierre estomático limita la difusión de CO₂, lo que afecta la fotosíntesis de las plantas. Si la inundación continúa, provoca la degradación de la clorofila y la senescencia de las hojas (Aslam *et al.*, 2023; Martínez-Arias *et al.*, 2022). Las plantas, de igual manera, se encargan de equilibrar la síntesis y el transporte de fitohormonas para regular la respuesta al estrés mediante procesos de señalización. Por ejemplo, el etileno es considerado uno de los principales reguladores de la adaptación a estas condiciones, mediante la inducción de la formación de raíces adventicias y del aerénquima, así como de la elongación del tallo (Pan *et al.*, 2022; Aslam *et al.*, 2023).

Mientras que el ácido abscísico se encarga de regular el inicio de la división de las células del aerénquima de la raíz. Sin embargo, también en condiciones de inundación la acumulación de ácido abscísico causa el cierre estomático, afectando significativamente la transpiración de agua (Gonzales-Guzman *et al.*, 2021). Como se sabe, las auxinas son hormonas clave para el crecimiento de la planta, y su síntesis y acumulación promueven la biosíntesis del etileno y, a la inversa, la producción de etileno promueve la síntesis de auxinas, por lo que se encargan de regular la división celular y el desarrollo de las raíces adventicias (Gomen & Scortecci, 2021; Martínez-Arias *et al.*, 2022; Figura 2).

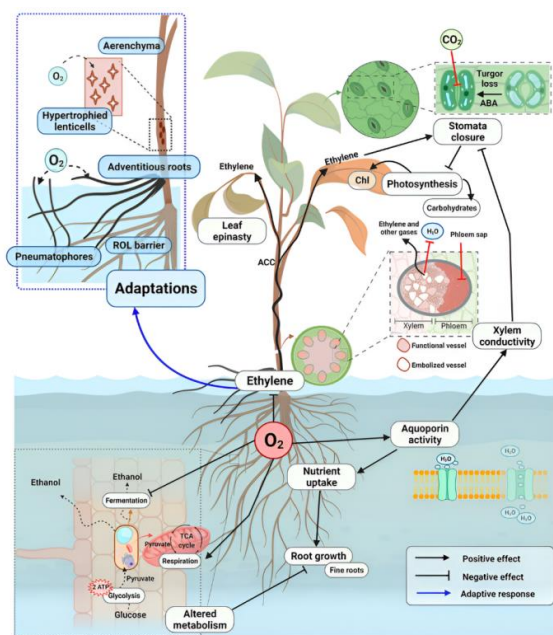


Figura 2. Estrategias adaptativas de la planta ante condiciones de anegamiento. Tomado de Martínez-Arias *et al.*, 2022.

Además, las plantas han desarrollado dos tipos de estrategias para resistir la adversidad causada por las inundaciones: el síndrome de escape bajo oxígeno (LOES, por sus siglas en inglés, Low Oxygen Escape Syndrome) y el síndrome de quiescencia bajo oxígeno (LOQS, por sus siglas en inglés, *Low Oxygen Quiescence Syndrome*) (Loreti & Perata, 2020; Jia *et al.*, 2021).

La estrategia de escape es energéticamente costosa para la planta y las plantas utilizan dicha estrategia para lograr mantener la parte aérea de la planta en un entorno fuera del agua por lo que desarrollan la elongación del tallo y de las hojas, permitiendo la difusión del oxígeno a través del aerénquima hacia la zona aérea de la planta, esto ocurre en condiciones de inundación parcial o anegamiento (Ashikari *et al.*, 2025; Voeselek & Bailey-Serres, 2015; Figura 3a). La quiescencia, por su parte, es una estrategia que emplean las plantas cuando son sometidas a inundaciones prolongadas o profundas y se basa en la restricción casi completa del crecimiento del tallo, las hojas y las raíces, manteniendo el consumo de energía y de carbono para prolongar la supervivencia de la planta bajo el agua (Loreti *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2021; Figura 3b).

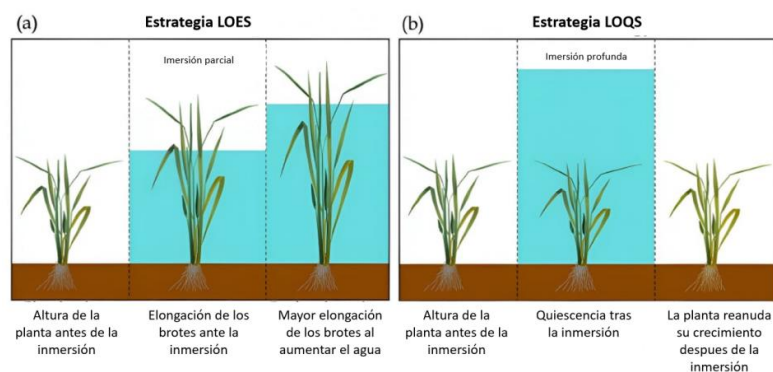


Figura 3. Estrategias utilizadas por las plantas ante la inundación. a) síndrome de escape por bajo oxígeno (LOES), b) síndrome de quiescencia por bajo oxígeno (LOQS). Modificado de Delantero, 2012.

1.3.2. Hipoxia endógena en los tejidos vegetales.

La hipoxia endógena es un estado fisiológico que la planta experimenta durante su desarrollo. La difusión del oxígeno ocurre desde la atmósfera hasta el interior de la planta, sin embargo, al carecer de un sistema de transporte activo para distribuir el oxígeno, la planta está expuesta a gradientes de oxígeno en ciertos tejidos vegetales (Armstrong *et al.*, 2006). Formando lo que se conoce como nichos hipóxicos naturales. Estos pueden encontrarse incluso en zonas aéreas de la planta, algunos ejemplos de estos son las semillas y las anteras. En particular, las semillas poseen capas epidérmicas que limitan el intercambio gaseoso y reducen la disponibilidad de oxígeno. Además, se ha demostrado que las semillas mantienen condiciones hipóxicas activas; por ejemplo, en las semillas de *P. vulgaris* se ha reportado que la alcohol deshidrogenasa, enzima característica del metabolismo fermentativo, se encuentra activa (Boyle & Yeung, 1983). Mientras que en las anteras, particularmente durante la maduración del polen, se ha reportado la inducción de genes clave asociados a la fermentación alcohólica (Tadege & Kuhlemeier, 1997; Loreti & Perata, 2020). Estudios adicionales han reportado que la concentración de estos tejidos aéreos se encuentra por debajo del 5% (van Dongen *et al.*, 2003; Weits *et al.*, 2020).

En el caso de tejidos vegetativos como el meristemo apical del brote (SAM, del inglés *Shoot Apical Meristem*) y el meristemo apical de la raíz (RAM, del inglés *Root Apical Meristem*) se ha reportado que la concentración de

oxígeno en el SAM es de alrededor del 3-6%, mientras que el RAM tiene una concentración de oxígeno menor al 5% (Weits *et al.*, 2020).

Particularmente, la baja disponibilidad de oxígeno en el SAM es de hecho un requisito fundamental para el mantenimiento de la actividad meristemática y la formación de nuevos órganos. Pucciariello y Perata (2021) reportaron que se requieren condiciones hipóxicas para la producción de nuevas hojas. Este fenómeno está relacionado con la estabilización de la proteína *LITTLE ZIPPER 2* (ZPR2), que regula la actividad del meristemo y el inicio de la organogénesis foliar. La estabilización de ZPR2 depende directamente de la concentración de oxígeno (Ariel *et al.*, 2007; Weits *et al.*, 2021)

En órganos radiculares, como en las raíces laterales, también se establecen nichos hipóxicos; esto se debe a las altas tasas metabólicas necesarias para sostener las divisiones celulares en los meristemas (Bidel *et al.*, 2000). Además, en las leguminosas existe un nicho hipóxico denominado nódulo simbiótico, resultado de la interacción leguminosa-microorganismo; en estas estructuras especializadas se realiza la fijación biológica de nitrógeno mediante la enzima nitrogenasa, altamente sensible al oxígeno y que requiere un ambiente hipóxico (Loreti & Perata, 2020; Figura 4).

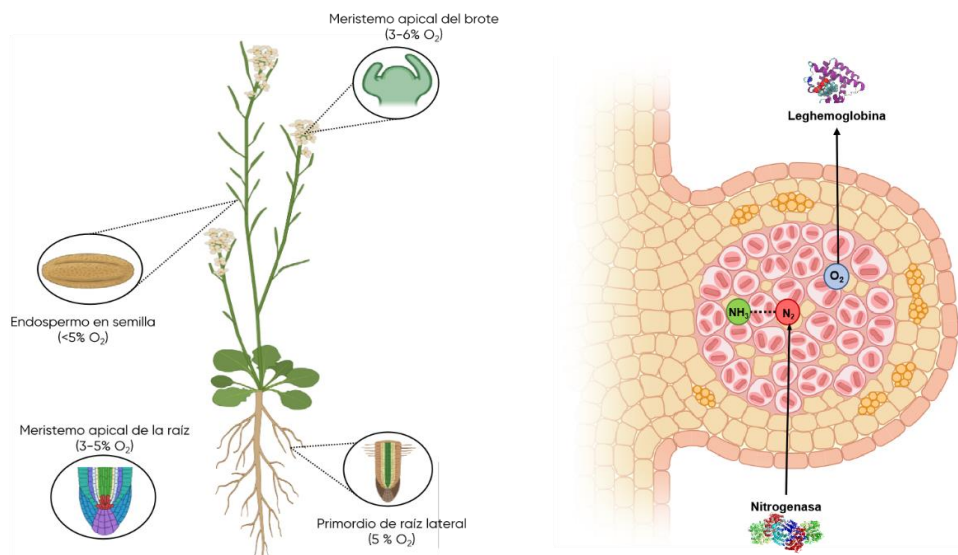


Figura 4. Nichos hipóxicos naturales en plantas. Figura creada con BioRender.

1.4. Interacción mutualista planta-microorganismos

El nitrógeno molecular es uno de los nutrientes primarios de los organismos vivos y si bien es cierto que es el más abundante en la atmósfera terrestre (80%), son pocos los organismos que son capaces de asimilarlo de forma directa, tal es el caso de las bacterias del suelo de la familia Rhizobiaceae, que poseen un complejo enzimático llamado nitrogenasa que cataliza la reducción del nitrógeno diatómico (N_2) en ion amonio (NH_4^+), que es un compuesto asimilable (Quinto y Cárdenas, 2007; Bernhard, 2010). Las bacterias de la familia Rhizobiaceae son aeróbicas, gramnegativas y mejor conocidas como rizobios. Esta familia está constituida por los géneros *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, que establecen asociaciones simbióticas con las plantas, especialmente con las leguminosas. En esta asociación, las plantas proporcionan a las bacterias compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis, mientras que estas convierten el nitrógeno en compuestos asimilables por las leguminosas, lo que permite que estas crezcan en suelos pobres en nitrógeno. Durante esta asociación, las bacterias inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa, denominado nódulo, donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Quinto y Cárdenas, 2007; White *et al.*, 2007; Bustos-Segura *et al.*, 2024).

El inicio del establecimiento de esta asociación comienza con un diálogo molecular donde la raíz libera a la rizosfera exudados de compuestos de naturaleza flavonoide como la genisteína, la naringenina y la daidzeína que son reconocidos de manera específica por los rizobios induciendo la expresión de genes *nod* que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de factores de nodulación (Nod), los cuales son compuestos de naturaleza lipo-quito-oligosacáridos que son reconocidos por la planta (Oldroyd, 2013; Lerouge *et al.*, 1990; Figura 5).

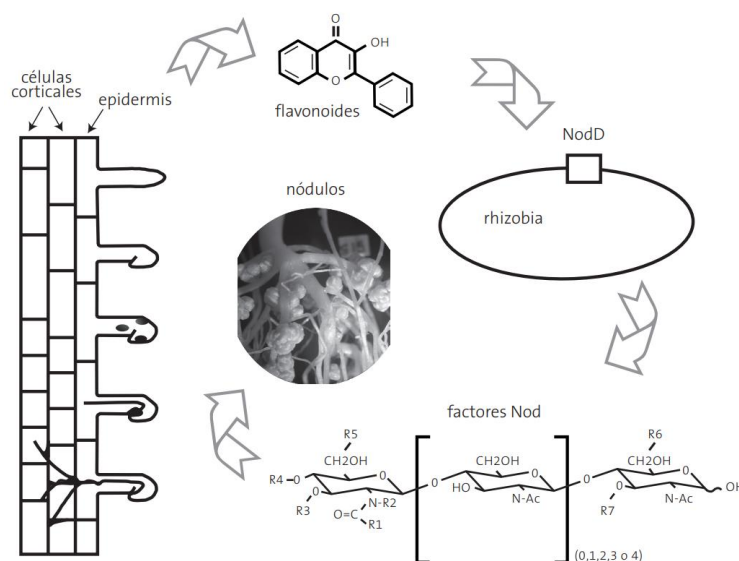


Figura 5. Diálogo molecular establecido durante la asociación leguminosa-rizobio. La raíz de la planta secreta flavonoides, los cuales son reconocidos por la proteína NodD, lo que induce la síntesis y secreción de los factores Nod por la bacteria. A su vez, la percepción específica de los factores Nod promueve el enroscamiento del pelo, la formación del hilo de infección y la penetración bacteriana, lo que favorece la formación del nódulo. Tomado de Quinto y Cárdenas, 2007.

Los factores Nod consisten en un esqueleto básico de residuos de N-acetil-d-glucosamina unidos por enlaces β -1,4, que además pueden presentar modificaciones adicionales en su estructura (decoraciones), tales como la adición de grupos metilo, acetilo, sulfatos y azúcares modificados. Dependiendo de la especie de rizobio, dichas modificaciones confieren una alta especificidad entre las especies de leguminosas y los rizobios (Jones *et al.*, 2007).

Cuando los factores Nod son secretados, estos son reconocidos por receptores de tipo cinasa con motivos de LysM presentes en la membrana plasmática de los pelos radicales (Jones *et al.*, 2007; Fliegmann y Bono, 2015), este reconocimiento inducirá cambios fisiológicos y morfológicos en el pelo radical como cambios en el pH intracelular, influjo y eflujo de calcio, oscilaciones de ROS, rearrreglos de los microfilamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto de los pelos radicales (Quinto y Cárdenas, 2007). Además se generará un hinchamiento en la zona apical del pelo que dará lugar a la deformación y enroscamiento de ápice del pelo radical que permite atrapar las rizobios y formar microcolonias que provocara la invaginación de la pared celular

y la membrana plasmática del pelo radical, dando lugar a una nueva estructura tipo túnel, denominado hilo de infección, por donde las bacterias migran desde el pelo radical hasta las células epidérmicas del córtex (Quinto y Cárdenas, 2007; Oldroyd y Downie, 2008).

Simultáneamente con la formación del hilo de infección, las células del córtex iniciarán un proceso de dediferenciación, lo que permite reiniciar la división celular y formar las células del primordio del nódulo. Las bacterias se desplazan a través del hilo de infección, desde el cual serán liberadas e internalizadas en las células del primordio. Una vez internalizadas, las bacterias se diferenciarán en bacteroides, estos son capaces de expresar la enzima nitrogenasa, encargada de reducir el nitrógeno diatómico (N_2) a amonio (NH_4^+) (Kohlen *et al.*, 2018, Oldroyd, 2013, Figura 6).

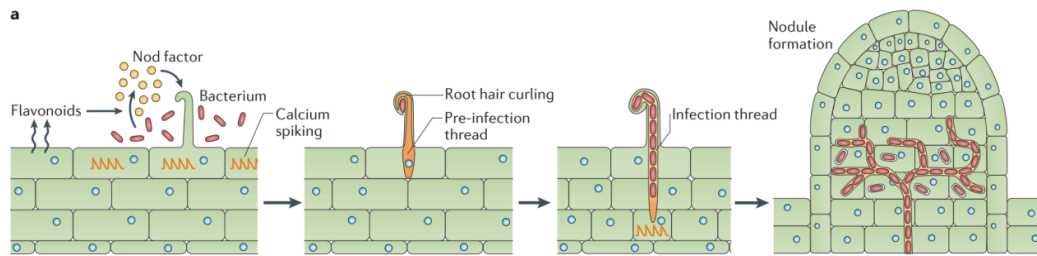


Figura 6. Colonización de los rizobios. Se establece el diálogo molecular entre rizobios y las raíces de las leguminosas, los hilos de infección progresan hacia el primordio del nódulo y las bacterias son internalizadas dentro del nódulo. Tomado de Oldroyd, 2013.

Existen dos tipos de nódulos: los indeterminados y los determinados, según la especie de leguminosa (Luo *et al.*, 2023). Los nódulos indeterminados se originan a partir de divisiones celulares internas del córtex; además, poseen un meristemo apical persistente y de forma cilíndrica alargada. Su gradiente de desarrollo va desde el ápice hasta la base del nódulo y se divide en diferentes zonas nodulares, estos nódulos se encuentran en *Medicago truncatula* y *Pisum sativum*. Mientras que los nódulos determinados son estructuras que se originan a partir de la división de las células externas del córtex, su estructura es esférica y, dado que su actividad meristemática cesa en etapas tempranas, carecen de un meristemo persistente. Además, el nódulo maduro se desarrolla a través de la expansión celular, este tipo de nódulo se encuentra en leguminosas como

Lotus japonicus, *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris* (Nap y Bisseling, 1990; Luo et al., 2023; Figura 7).

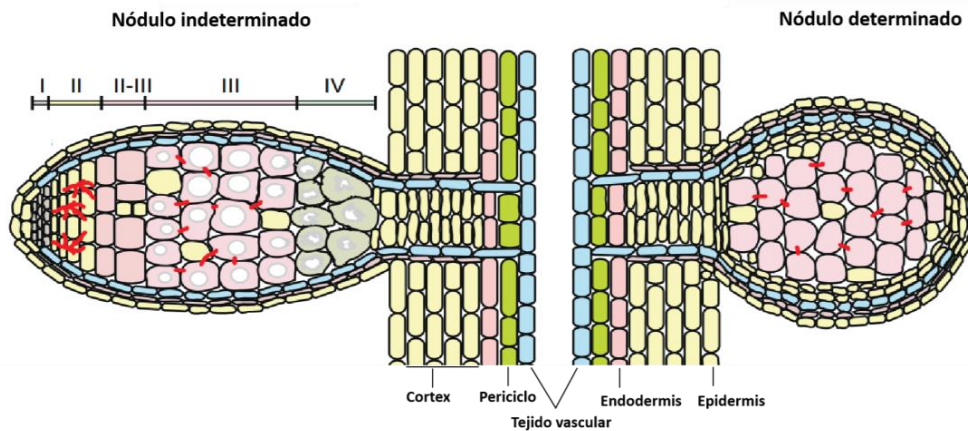


Figura 7. Estructura morfológica del nódulo indeterminado y del determinado. Modificado de Popp y Ott, 2011.

La expresión, así como la actividad de la nitrogenasa requieren de un ambiente hipóxico, esto debido a que es altamente sensible al oxígeno por lo que la planta genera dicho ambiente sintetizando la enzima hemoglobina simbiótica (leghemoglobina), hemoproteína encargada de regular el oxígeno mediante su transporte hacia las bacterias, en la zona de fijación de nitrógeno hay una concentración de aproximadamente 20-50 nM mientras que fuera del nódulo la concentración de oxígeno disuelto es de 250 μM (Huntet et al., 2001; Rutten et al., 2021; Batut y Boistard, 1994).

1.5. Generalidades de *Phaseolus vulgaris*

Phaseolus vulgaris, comúnmente conocido como frijol, es la especie más conocida del género *Phaseolus*, perteneciente a la familia *Fabaceae* o *Leguminosae*. Se trata de una planta herbácea anual que puede presentar un crecimiento trepador o arbustivo, según la variedad. El tallo es delgado y ramificado, mientras que las hojas son trifoliadas y alternas. Las flores están dispuestas en racimos axilares, que van del blanco al morado, rosado o violeta según la variedad de la planta. El fruto es una vaina alargada, recta o ligeramente curva, que contiene entre 4 y 12 semillas; estas pueden ser redondas u ovaladas y presentan coloración blanca, negra, café, roja o en combinaciones jaspeadas.

La germinación ocurre entre los 4 y 8 días después de la siembra, seguida de una fase vegetativa en la que se produce el crecimiento de hojas, tallos y ramas. Posteriormente, se presenta la fase de floración, en la que aparecen los primeros botones florales, seguida del proceso de maduración, en el que la flor se transforma en una vaina y las semillas alcanzan su tamaño final (Freytag y Debouck, 2002; Figura 8).

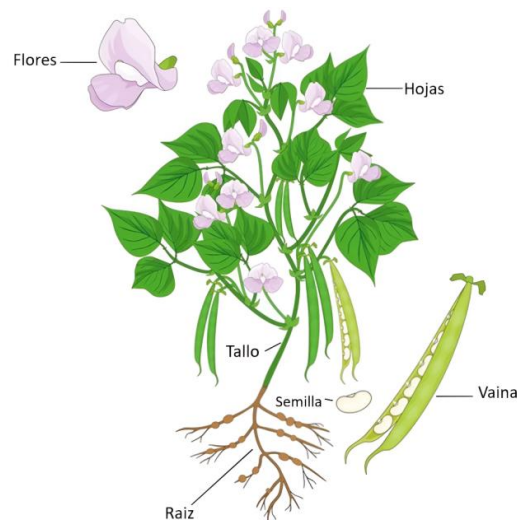


Figura 8. Morfología de la planta de *P. vulgaris*. Modificado de Flaya, M. (s. f.).

P. vulgaris es originario de Mesoamérica y su domesticación dio lugar a dos acervos: uno en la región andina, que abarca el sur de Perú, Bolivia y el noroeste de Argentina, y otro en la región mesoamericana, que abarca desde México hasta el norte de Ecuador (Gepts, 1998).

Respecto al valor nutricional, *P. vulgaris* presenta gran relevancia en la dieta alimenticia humana debido a su gran valor proteico, que varía del 14 al 33%, tiene una gran riqueza en aminoácidos como la lisina, la fenilalanina y la tirosina. Además, aporta entre 52 y 76 g de carbohidratos por cada 100 g de frijol crudo; también aporta entre 1.5 y 6.2 g de lípidos; es fuente de vitaminas y minerales esenciales como el hierro, magnesio, fósforo, potasio (Reyes *et al.*, 2008; Ulloa *et al.*, 2008). Además, países como Brasil, Nicaragua, Paraguay y Belice dependen de este cultivo como alimento básico. En México, el frijol representa aproximadamente el 36% de la ingesta alimentaria diaria. Además, México es uno de los principales países productores de frijol, siendo los

principales estados productores: Zacatecas, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Nayarit, Chiapas, Guanajuato, San Luis Potosí, Puebla e Hidalgo (Saburido y Herrera, 2015).

También, *P. vulgaris* tiene un papel importante en la agroecología ya que, al ser una leguminosa, tiene la capacidad de realizar el proceso de fijación biológica de nitrógeno mediante la interacción mutualista con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, esta asociación mejora la fertilidad del suelo y reduce la dependencia de fertilizantes químicos, contribuyendo a prácticas agrícolas sostenibles.

1.6. Vía de respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno

En las plantas, se ha identificado que la detección de oxígeno depende del mecanismo N-terminal, modulado por los Factores de Respuesta a Etileno del grupo VII (ERFVII, del inglés *Group VII Ethylene Response Factors*), también conocidos como Factores de respuesta a la hipoxia. Estos factores poseen una secuencia de consenso altamente conservada en el extremo N-terminal (Banti *et al.*, 2013, Figura 9A). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cinco factores transcripcionales asociados a la respuesta a la hipoxia; Related to APETALA2.12 (RAP2.12), RAP2.2, RAP2.3, Hypoxia Response ERF1 (HRE1) y HRE2 (Licausi *et al.*, 2010; Bailey-Serres *et al.*, 2012). Dichos factores desempeñan un papel importante en la regulación de la reprogramación transcripcional adaptativa en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno. Se ha reportado que los genes que codifican los factores RAP2.12, RAP2.2 y RAP2.3 se expresan de forma constitutiva, mientras que los que codifican HRE1 y HRE2 se expresan en respuesta a etileno y a condiciones de hipoxia. Sin embargo, su regulación ocurre principalmente a nivel postraducciona, ya que poseen un dominio N-terminal muy conservado (MCGGAI/VSDY/F), el cual, bajo condiciones de normoxia, conduce a su degradación constante mediante proteólisis mediada por ubiquitinación a través del N-terminal (Figura 9A). Este proceso de degradación comienza cuando el residuo de metionina localizado en el extremo N-terminal es removido por acción de la metionina aminopeptidasa (MAP, del inglés *Methionine Aminopeptidase*), dejando expuesta la cisteína, la cual es blanco de las enzimas de la planta cisteína oxidasa (PCOs, del inglés *Plant Cysteine Oxidases*), que la

oxidarán a un grupo sulfonilo. Una vez que el residuo de cisteína oxidado esté reconocido por la Arginil RNA Transferasa (ATE, del inglés *Arginyl-tRNA Transferase*), que adiciona un residuo de arginina. Posteriormente, los factores de respuesta a la hipoxia son marcados mediante ubiquitinación por la enzima E3 ligasa PRT6 (*PROTEOLYSIS6*), dirigiendo a los factores hacia su degradación por la vía del proteasoma 26S (Wang *et al.*, 2025; Bailey-Serres *et al.*, 2012)

En contraste, bajo condiciones de hipoxia, la actividad catalítica de las PCOs se inhibe, lo que permite que los factores de respuesta a la hipoxia se estabilicen, se acumulen en el citoplasma y sean translocados al núcleo, donde regularán la expresión de genes sensibles a la hipoxia, promoviendo así una respuesta adaptativa (Yan *et al.*, 2025; Xie *et al.*, 2021; Figura 9B).

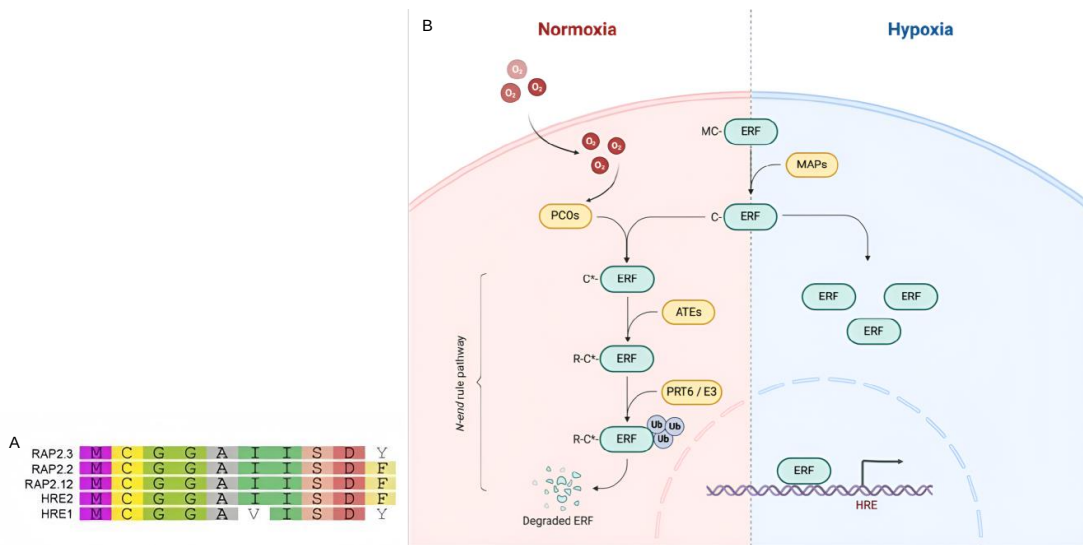


Figura 9. Vía de regulación de los factores de respuesta a etileno. A) secuencia consenso conservada de los factores de respuesta a la hipoxia, B) vía de degradación de los factores en condiciones de normoxia e hipoxia. Modificado a partir de Zahid *et al.*, 2023 y Tamang & Fukao, 2015.

2. ANTECEDENTES

Un estudio realizado por Shukla *et al.* (2019) reportó, mediante tinción histoquímica, la actividad del promotor PCO1 durante el desarrollo del primordio de la raíz lateral en *A. thaliana*. Las plantas fueron cultivadas durante siete días y posteriormente se sometieron a diferentes concentraciones de oxígeno. Se reportó que, en condiciones de normoxia, la actividad del promotor se observa a partir de la etapa IV del desarrollo del primordio; en condiciones de hipoxia, desde la etapa III; y, finalmente, en condiciones de hiperoxia, no se observó actividad del promotor de *PCO1* durante el desarrollo del primordio de la raíz lateral.

En un estudio de Weits *et al.* (2014) se reportó que la expresión de PCO1 se localiza tanto en el núcleo como en el citosol de las células vegetales. Además, realizaron un análisis del paisaje transcripcional de las PCOs de *A. thaliana* en distintos tejidos de la planta. Como resultado, se observó que los genes de la cisteína oxidasa de planta 1 de *Arabidopsis thaliana* (*AtPCO1*, del inglés *Arabidopsis thaliana Plant Cysteine Oxidase 1*) y de la cisteína oxidasa de planta 2 de *Arabidopsis thaliana* (*AtPCO2*, del inglés *Arabidopsis thaliana Plant Cysteine Oxidase 2*) se expresan diferencialmente durante la germinación de las semillas y en las silículas maduras.

También realizaron un análisis del paisaje transcripcional de PCOs en diferentes condiciones de estrés, en el que se observa que *AtPCO1* y *AtPCO2* se expresan diferencialmente en anoxia, hipoxia temprana y tardía, y en sumergencia temprana y tardía. Finalmente, se determinó la actividad de los promotores *AtPCO1* y *AtPCO2* en condiciones de normoxia e hipoxia mediante tinción histoquímica y se reportó que, en condiciones de normoxia, la actividad del promotor del gen *AtPCO1* se localiza en la zona meristemática del brote, mientras que la actividad del promotor del gen *AtPCO2* se localiza en la zona radicular. Sin embargo, en condiciones de inundación, la actividad del promotor *AtPCO1* se localiza en los cotiledones y en la zona meristemática, mientras que la de *AtPCO2* se localiza en toda la plántula. Se concluye que *AtPCO1* y *AtPCO2* se inducen en respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno.

En un estudio reportado por Weits *et al.* (2023), se realizó un análisis del paisaje transcripcional de las PCOs de *A. thaliana* en condiciones de normoxia e hipoxia, donde se reportó que *AtPCO1* y *AtPCO2* se encuentran diferencialmente expresados en tiempos tempranos de 4 horas a tiempos tardíos de 12 horas en condiciones de hipoxia. También realizaron un análisis del paisaje transcripcional de las PCOs en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes especies de plantas, en el que se observa que *PCO1* se expresa diferencialmente en condiciones de hipoxia en la especie *Pinus pinea*, mientras que en las especies de plantas basales *PCO1* se encuentra desregulado.

Un estudio de Koo *et al.* (2024) demostró la actividad del promotor *PCO1* en *A. thaliana* mediante tinción histoquímica. Las plántulas fueron sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia, donde se observó que, bajo normoxia, la actividad del promotor se encuentra en el meristemo apical del brote y en la zona de elongación de la raíz, en contraste, bajo una condición de hipoxia, la actividad del promotor se encuentra en toda la plántula, preferentemente en el meristemo apical del brote y de la raíz. Sugiriendo que *AtPCO1* está altamente inducido en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno.

En el grupo de trabajo del Dr. Luis Cárdenas Torres, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se realizó el análisis filogenético de las PCOs de *Phaseolus vulgaris* y se identificaron 5 genes. En un estudio previo, también se determinó la acumulación de los transcritos, de las PCOs, mediante RT-qPCR durante una cinética de nodulación de 3 a 42 días después de la inoculación (dpi, del inglés *Days Post Inoculation*) con el *Rhizobium tropici*. Los datos obtenidos se representan en la figura 10 como un mapa de calor (heatmap), donde se observa que *PvPCO1* está diferencialmente expresado a lo largo del proceso de nodulación y alcanza su pico de expresión a los 42 dpi, momento en el que ocurre la senescencia del nódulo (Figura 10).

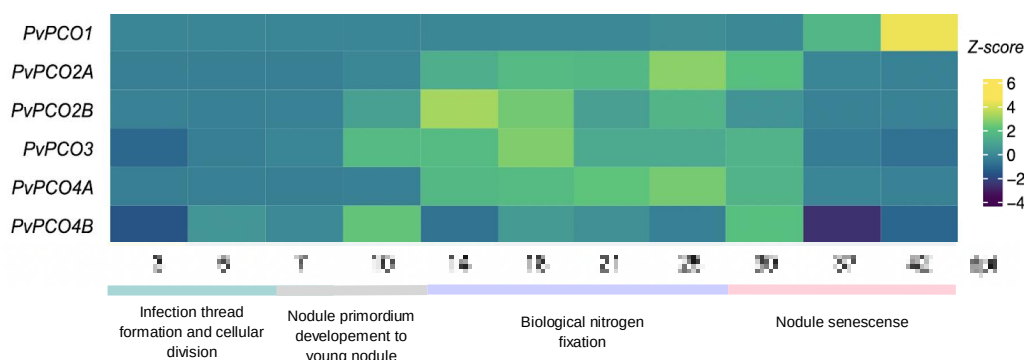


Figura 10. Análisis de la acumulación de los transcritos de PCOs en raíces silvestres de *P. vulgaris* durante la cinética de interacción con *R. tropici*. Se midieron tiempos de 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 25, 30, 37 y 42 (datos sin publicar).

Con la finalidad de visualizar mejor los cambios en los niveles de expresión de la *PvPCO1* en condiciones de nodulación, se presentan los gráficos correspondientes a los datos obtenidos mediante RT-qPCR, en los que se observa que el primer incremento en los niveles de acumulación de transcrito se produce a los 10 dpi (Figura 11).

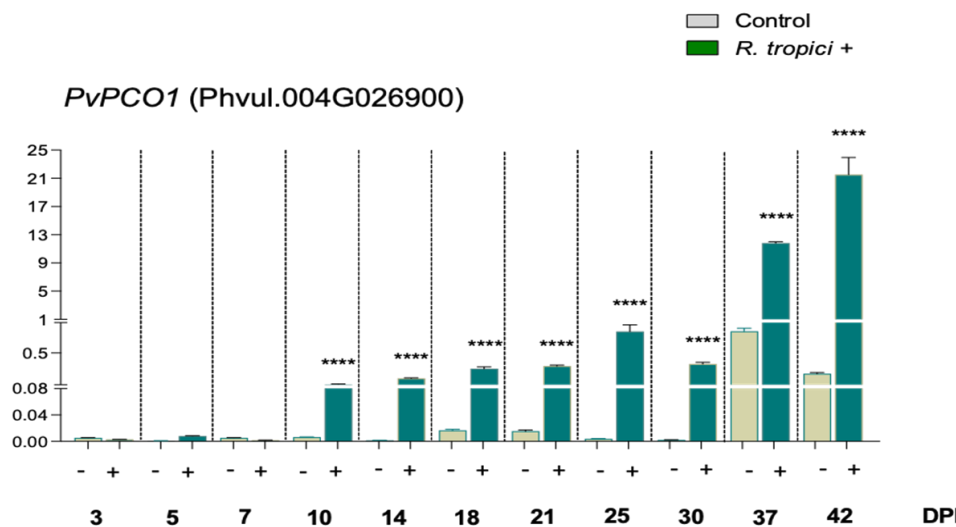


Figura 11. Análisis de la acumulación del transcrito de *PvPCO1* durante una cinética de nodulación en *P. vulgaris* inoculado con *R. tropici*. Los primordios y nódulos fueron colectados en los tiempos indicados, y los niveles de acumulación del transcrito fueron determinados mediante RT-qPCR (datos no publicados).

Este incremento continúa aumentando de manera gradual hasta los 21 dpi; a los 25 dpi se observa un incremento más grande, con una ligera disminución, pero significativa a los 30 dpi, para después incrementar y alcanzar los picos máximos de acumulación a los 37 y 42 dpi. Este patrón de expresión corresponde en gran medida al desarrollo y al funcionamiento del nódulo.

Además, se realizó un análisis similar de las PCOs de *P. vulgaris* en condiciones de anegamiento mediante RT-qPCR, el cual se muestra en un heatmap en la figura 12. En este gráfico se observa que *PvPCO1* presenta una expresión diferencial significativa a las 24 horas postanegamiento, de manera similar a las de *PvPCO2* y *PvPCO4*.



Figura 12. Análisis del perfil transcripcional de las PCOs de *P. vulgaris* durante una cinética de anegamiento. Se midieron tiempos de 0, 12, 24 y 72 horas (*datos sin publicar*).

3. JUSTIFICACIÓN

P. vulgaris es un cultivo de gran importancia para la seguridad alimentaria debido a su alto valor nutricional y a su capacidad de establecer una interacción simbiótica rizobio–leguminosa. Durante este proceso, la disponibilidad de oxígeno es un factor crítico tanto para el establecimiento de la simbiosis como para la organogénesis del nódulo. Sin embargo, *P. vulgaris* es altamente susceptible al estrés por anegamiento, una condición que provoca una disminución sistémica del oxígeno y activa las vías moleculares de respuesta al estado redox (Ntukamazina, *et al.*, 2017).

En el grupo del Dr. Luis Cárdenas se han identificado en el frijol los homólogos de la vía de respuesta a la hipoxia previamente descritos en *A. thaliana*. En esta vía, la estabilidad de los factores de transcripción del grupo VII (ERF-VII) depende de la oxidación del residuo N-terminal catalizada por las proteínas cisteína oxidasa (PCOs). En *A. thaliana* se ha demostrado que *PCO1* se induce en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (Weits *et al.*, 2014; Masson *et al.*, 2019). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que en *P. vulgaris* la acumulación del transcrito *PvPCO1* aumenta durante la nodulación y bajo estrés por anegamiento; sin embargo, aún no se ha caracterizado la actividad del promotor de *PvPCO1*, y mucho menos el patrón espacial y temporal asociado a la nodulación o al anegamiento. Por ello, resulta de interés evaluar la actividad del promotor de *PvPCO1* en estas condiciones.

Este estudio generará información importante, dado que la hipoxia transitoria está presente tanto en la formación del nódulo como en el estrés por anegamiento. Los resultados generados constituirán una aportación molecular relevante para ampliar el conocimiento sobre la dinámica de señalización del oxígeno en leguminosas y pueden sentar las bases para futuras estrategias biotecnológicas orientadas a mejorar la tolerancia al anegamiento sin comprometer la eficiencia simbiótica.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que el transcrito que codifica para la Planta Cisteína Oxidasa 1 de *P. vulgaris* (*PvPCO1*) se induce en condiciones de nodulación y anegamiento. Por lo tanto, la actividad del promotor de *PvPCO1* se mantendrá bajo condiciones de estrés por anegamiento y durante el proceso de nodulación.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar la actividad del promotor del gen *PvPCO1* en raíces de *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de estrés por anegamiento y durante la nodulación, mediante un sistema reportero GFP-GUS, para contribuir al entendimiento de su regulación transcripcional en ambos procesos.

5.2. Objetivos específicos

- Análisis *in silico* de los elementos *cis*-reguladores localizados en la región promotora del gen *PvPCO1*.
- Generación de la construcción molecular *pPvPCO1::GFP-GUS*.
- Caracterización de la actividad del promotor de *PvPCO1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* bajo estrés por anegamiento mediante tinción histoquímica.
- Caracterización de la actividad del promotor de *PvPCO1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* durante la nodulación, mediante tinción histoquímica y localización espaciotemporal por microscopía confocal.

6. METODOLOGÍA

6.1. Esquema de la metodología

La figura 13 muestra un diagrama de flujo metodológico dividido en cinco etapas principales: (1) análisis *in silico* de elementos cis-regulatorios, (2) generación de la construcción molecular, (3) generación de plantas compuestas, (4) cinética de anegamiento y (5) cinética de nodulación.

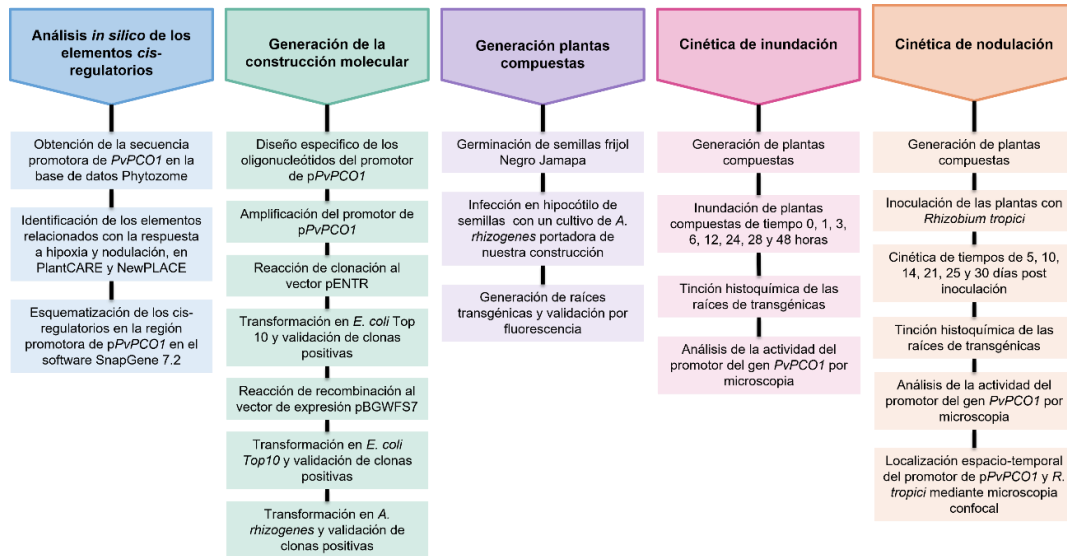


Figura 13. Esquema general de la estrategia experimental empleada para el análisis funcional del promotor del gen *PvPCO1* en frijol (*P. vulgaris*). El flujo metodológico comprende cinco etapas: (1) análisis *in silico* de elementos cis-regulatorios de la región promotora; (2) construcción molecular del promotor *pPvPCO1::GUS*; (3) generación de plantas compuestas mediante transformación con *A. rhizogenes*; (4) evaluación de la actividad del promotor durante una cinética de anegamiento; y (5) evaluación de la actividad del promotor durante una cinética de nodulación con *R. tropici*. La actividad del promotor se determinó mediante tinción histoquímica de GUS y análisis por microscopía.

La figura presenta el esquema general de la estrategia metodológica empleada para analizar la regulación transcripcional del promotor del gen *PvPCO1* y su respuesta a las condiciones de inundación y de nodulación en frijol (*Phaseolus vulgaris*). El trabajo se desarrolló en cinco etapas. En la primera, se realizó un análisis *in silico* de la región promotora para identificar elementos *cis*-regulatorios asociados a la respuesta a la hipoxia y a la nodulación, utilizando las bases de datos Phytozome, PlantCARE y NewPLACE, así como el programa SnapGene para representar la región promotora. Posteriormente, se diseñó y

construyó la fusión del promotor pPvPCO1 con el gen reportero GFP y GUS, mediante amplificación, clonación, recombinación en vectores de expresión y transformación en *Escherichia coli* y *A. rhizogenes*.

En la tercera etapa se obtuvieron plantas compuestas mediante la transformación de hipocótilos de frijol Negro Jamapa con *A. rhizogenes* portadora de la construcción genética, seguida de la selección de raíces transgénicas mediante fluorescencia. Finalmente, se evaluó la actividad del promotor en dos condiciones experimentales independientes: una cinética de anegamiento, en la que las plantas fueron sometidas a diferentes tiempos de anegamiento, y una cinética de nodulación, mediante la inoculación con *R. tropici*. En ambos ensayos se realizaron tinciones histoquímicas para detectar la actividad de GUS y análisis microscópicos de la expresión del promotor; además, en la cinética de nodulación se determinó la localización espacio-temporal de la actividad del promotor durante el desarrollo de la simbiosis.

6.2. Análisis *in silico* de los elementos *cis*-reguladores del gen pPvPCO1

Para el análisis *in silico* de la región promotora del gen *PvPCO1* (Phvul.004G026900.1) se utilizó la versión 2.1 del genoma de *P. vulgaris* de la base de datos Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), en la que se seleccionó una región de 2400 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción (ATG). La identificación de los elementos *cis*-regulatorios se realizó en el repositorio PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) y la interfaz gráfica NewPLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) en los cuales se seleccionaron los elementos potencialmente relacionados con la nodulación y la respuesta a bajas concentraciones de oxígeno. Finalmente, los elementos seleccionados se localizaron y se esquematizaron en la región promotora de *PvPCO1* con el software SnapGene 7.2 y se graficaron con el software GraphPad Prism.

6.3. Generación de la construcción molecular

Para el análisis de la actividad del promotor del gen *PvPCO1* bajo condiciones de nodulación y de estrés por inundación, se utilizó la construcción *pPvPCO1::GFP-GUS*, generada mediante el sistema de clonación GATEWAY. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados se muestran en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Cepas utilizadas para este trabajo

Nombre	Fondo genético	Construcción que porta	Uso	Referencia
<i>Escherichia coli</i> Top10	<i>E. coli</i> K-12	<i>pENTR</i> <i>pPvPCO1</i>	Clonación del vector de entrada	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Top10	<i>E. coli</i> K-12	<i>pBGWFS7</i> <i>pPvPCO1</i>	Propagación del plásmido recombinante	Invitrogen
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599	K599	<i>pBGWFS7</i> <i>pPvPCO1</i>	Transfomación de raíces	Valdes <i>et al.</i> , 1986
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 DsRed	CIAT 899	Plásmido con DsRed	Marcador reportero para ver la bacteria	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991

Tabla 2. Plásmidos utilizados para este trabajo

Nombre	Tipo de vector	Descripción	Referencia
<i>pENTR</i> D/TOPO	Vector Gateway®	Vector de entrada para clonación direccional mediante tecnología TOPO.	Thermo fisher scientific
<i>pBGWFS7</i>	Vector binario Gateway®	Vector de expresión, fucionado a los genes reporteros GFP y GUS.	Karimi <i>et al.</i> , 2002

Tabla 3. Construcciones utilizadas para este trabajo

Nombre	Componentes	Descripción	Referencia
<i>pENTRpPvPCO1</i>	<i>pPvPCO1</i>	Contiene el <i>pPvPCO1</i> clonado en el vector de entrada.	Este estudio
<i>pBGWFS7pPvPCO1</i>	<i>pPvPCO1::GFP-GUS</i>	Construcción binaria obtenida tras la recombinación Gateway®	Este estudio

6.3.1. Reacción de amplificación y purificación

Se realizó una PCR con la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA) para amplificar la región promotora del gen *pPvPCO1* a partir de ADN genómico de *P. vulgaris* y de oligonucleótidos específicos (Tabla 4). Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: un ciclo de 95°C por 60 segundos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 150 segundos y 72 °C por 300 segundos. Finalmente, el producto obtenido se purificó con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research).

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para la construcción *pPvPCO1::GFP-GUS*

Secuencia de los oligonucleótidos	
FwpPCO1	CAC CGT GAT TTC GTT GAC TGC
RvpPCO1	AAT GCC AAA ACA CCC CAA AGC

6.3.2. Reacción de clonación en el vector *pENTR/D-TOPO*

La reacción de clonación se realizó en un volumen final de 6 µl, en el que se añadieron 1 µL de agua, 1 µL de solución salina, 3 µL del producto de amplificación purificado (*pPvPCO1*) (219.7 ng/µL) y 1 µL del vector *pENTR/D-TOPO*; se centrifugó y se incubó durante 12 horas. Posteriormente, se añadieron 2 µL del buffer KCM (cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂) y cloruro de magnesio (MgCl₂) y se transformó la reacción completa *pENTRpPvPCO1* en *E. coli* Top10 quimiocompetentes. Las células fueron transformadas mediante un choque térmico a 42°C por un minuto y 4°C por dos minutos. La recuperación se realizó mediante la adición de 500 µL de medio LB (Lysogeny Broth) y su

incubación a 37°C en agitación durante una hora. A continuación, se plaquearon 100 µL de la suspensión en placas de medio LB complementado con kanamicina a 50 µg/mL y las placas se incubaron durante 12 horas a 37°C. La identificación de clonas positivas se realizó mediante PCR en colonia, además, se realizó la extracción del ADN plasmídico con el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research) y finalmente se mandó a secuenciar en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación del Instituto de Biotecnología.

6.3.3. Reacción de recombinación

La reacción de recombinación se llevó a cabo mediante la mezcla de 6 µL de buffer TE (Tris-EDTA), 1 µL de la reacción de clonación *pENTR**pPvPCO1* y 1 µL del vector destino *pBGWFS7*, 2 µL de enzima LR Clonase, se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 2 µL de la enzima Proteinasa K y se incubó por media hora a 37°C.

Como resultado de esta reacción se obtuvo el plásmido *pBGWFS7pPvPCO1*, el cual contiene la fusión transcripcional *pPvPCO1::GFP-GUS*. Posteriormente, el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* Top10, obteniendo la cepa *E. coli/pBGWFS7pPVPCO1*, para ello en un tubo Eppendorf de 2 ml se añadieron 4 µL de la reacción de recombinación y 8 µL del cultivo de *E. coli* Top10, y se dejó en hielo durante 10 minutos, para posteriormente someterlo a un choque térmico a 42°C por un minuto y finalmente, se realizó otro choque térmico con hielo durante 2 minutos. El cultivo se resuspendió en 500 µL de medio LB y se incubó a 37°C durante una hora en agitación constante. Finalmente, se plaqueó 100 µL de la suspensión quimicompetente en placas de medio LB complementado con espectinomicina 100 µg/mL y se incubó durante 12 horas a 37°C. La identificación de clonas positivas se realizó mediante PCR en colonia y, posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico con el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research).

6.3.4. Transformación en *Agrobacterium rhizogenes* K599

Para la transformación en *A. rhizogenes*, se utilizó el plásmido recombinante *pBGWFS7pPvPCO1*, el cual contiene la fusión transcripcional *pPvPCO1::GFP-GUS*. Como resultado, se obtuvo la cepa *A.*

rhizogenes/pBGWFS7pPvPCO1. Para ello, en un tubo Eppendorf de 1 mL se mezcló 1 µL del plásmido con el cultivo de *A. rhizogenes* K599 y se mantuvo en hielo durante 10 minutos; posteriormente, las células se transfirieron a una celda de electroporación y se sometieron a un choque eléctrico con un electroporador (Gene Pulser®/MicroPulser™, Bio-Rad). Posteriormente, las células se recuperaron mediante la adición de 700 µL de medio LB y se incubaron en agitación constante por 2 horas a 30°C. Finalmente, se plaquearon en placas de medio LB complementadas con espectinomicina a una concentración de 200 µg/mL y las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30°C. La identificación de clonas positivas se realizó mediante PCR en colonia.

6.3.5. PCR en colonia

Inicialmente, se seleccionaron las colonias y cada una se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril. Posteriormente, la suspensión de las colonias se lisó mediante 2 a 3 ciclos: 2 minutos en nitrógeno líquido y 10 minutos a 94°C. El lisado se centrifugó a 14000 rpm durante un minuto.

Para la PCR se realizaron reacciones de 20 µL que contenían: 13.9 µL de H₂O, 2 µL de buffer comercial, 0.5 µL de dNTPs, 0.4 µL de MgCl₂, 0.5 µL de cada oligonucleótido específico, 0.2 µL de la enzima Taq DNA Polymerase y 1 µL de la suspensión lisada de las clonas. Las condiciones para la reacción fueron: un ciclo de 95°C por 60 segundos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 150 segundos y una extensión final a 72 °C por 300 segundos. Finalmente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

6.4. Desinfección y germinación de semillas de *P. vulgaris*

Para la desinfección superficial de las semillas de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa, se realizaron dos lavados iniciales con agua estéril. A continuación, las semillas fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 25% durante 5 minutos, seguidas de tres enjuagues con agua estéril. Seguidamente, se trataron con una solución de etanol al 70% durante 4 minutos y, finalmente, se realizaron tres enjuagues con agua estéril.

Para la germinación, las semillas se colocaron en charolas metálicas

estériles con papel absorbente humedecido con medio Fahraeus (KH_2PO_4 0.73M, MgSO_4 1M, CaCl_2 0.9M, Na_2HPO_4 1.05 M, Citrato férrico 0.002M, H_3BO_3 46mM, MgSO_4 10 mM, ZnSO_4 760 mM, CuSO_4 760 mM, H_2MoO_4 440 mM). Finalmente, las charolas fueron selladas y se incubaron bajo condiciones de oscuridad a 28°C durante 48 horas, con una inclinación de aproximadamente 15°.

6.5. Generación de plantas compuestas de *P. vulgaris*

Para la generación de plantas compuestas, se empleó un cultivo de *A. rhizogenes* que contenía la construcción molecular *pPvPCO1::GFP-GUS*, así como el vector pBGWFS7, que sirvió como control.

Las cepas de *A. rhizogenes* se cultivaron en placas de medio LB complementado con espectinomicina 200 mg/ml, durante 48 horas a 30°C. Tras el crecimiento de los cultivos, se suspendieron en 700 µL de agua destilada estéril.

Para la inducción de raíces transgénicas, se realizó una herida en el hipocótilo de las plántulas de 48 horas utilizando una jeringa, seguida de la inoculación con 10 µL de la suspensión de *A. rhizogenes*. Las plántulas fueron transferidas a tubos de ensayo de vidrio que contenían tubos Falcon de 15 mL con medio Fahraeus, y se incubaron bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, a 28°C (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006).

Las raíces transformadas se generan a partir de una estructura constituida por células diferenciadas, denominada callo. Este proceso ocurre entre 7 y 10 días después de la infección, después de la generación de raíces transformadas se realizó un corte en la parte inferior del callo, eliminando así la raíz silvestre. Posteriormente, se observaron las raíces bajo un estereomicroscopio de fluorescencia (Olympus modelo SZX7) para seleccionar las que presentaban fluorescencia y se removieron las raíces que no mostraron fluorescencia y, por último, las plantas compuestas se volvieron a incubar por dos días bajo un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, a 28°C.

6.6. Cinética de anegamiento en plantas compuestas de *P. vulgaris*

Las plantas compuestas de *P. vulgaris* se trasplantaron en macetas

estériles con sustrato de vermiculita a una profundidad de 10 cm. Las macetas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se regaron cada tres días con medio Fahraeus hasta completar un periodo de acondicionamiento de 5 días. Una vez transcurrido el tiempo de acondicionamiento de las plantas, las macetas fueron sumergidas en agua estéril que cubría todo el sustrato y se mantuvieron sumergidas durante diferentes intervalos de tiempo: 0, 1, 3, 6, 12, 24, 28 y 48 horas (Figura 13).



Figura 14. Representación gráfica de la cinética de anegamiento. Figura creada con BioRender.

6.7. Cinética de nodulación con *Rhizobium tropici* DsRed

Para la inoculación de las raíces de las plantas de *P. vulgaris* que se encuentran expresando la construcción de la fusión transcripcional *pPvPCO1::GFP-GUS*, se cultivó un preinóculo de *R. tropici* CIAT 899 DsRed en medio PY, complementado con CaCl_2 0.7M y tres antibióticos de selección; rifampicina 50 $\mu\text{g/mL}$, tetraciclina 10 $\mu\text{g/mL}$ y ácido nalidíxico 20 $\mu\text{g/mL}$, durante 16 a 20 horas a 30°C en agitación constante. El cultivo de *R. tropici* DsRed se dividió en cuatro tubos Falcon de 50 mL, cada uno con 25 mL de cultivo. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 10 °C, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 15 mL de MgSO_4 10 mM. Nuevamente, se centrifugó bajo las mismas condiciones y finalmente se decantó y suspendió una última vez con 20 mL de MgSO_4 10 mM. Se midió la densidad óptica de la suspensión celular con un espectrofotómetro, se realizó el cálculo para la concentración de la suspensión del inóculo.

Para la inoculación de las plantas compuestas, se realizó en una campana de flujo laminar con 1 mL de inóculo con una DO600 de 0.946 y una concentración de 10^8 UFC/mL. Las macetas se mantuvieron en condiciones de invernadero y se regaron cada tres días con 20 mL de medio Fahraeus hasta los siguientes tiempos; 5, 10, 14, 21, 25 y 30 días posinoculación (dpi).

6.8. Tinción histoquímica de β -glucuronidasa

Las plantas compuestas fueron cosechadas para después someter el tejido radicular a un proceso de tinción histoquímica. Las raíces fueron tratadas con una solución de lavado I (Na_2HPO_4 0.5M, NaHPO_4 0.5M, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 100mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 100 mM) durante 5 minutos a temperatura ambiente transcurrido el tiempo se retiró la solución y se trataron con una solución de lavado II (solución de lavado I, EDTA 0.5M, Tritón x100) durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se retiró la segunda solución y se colocó una solución de lavado III (solución de lavado II, X-Gluc 100 mM) durante 2 horas y 43 minutos en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo, se retiró la solución y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril; finalmente, las raíces se clarificaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% durante 16 horas. Para la conservación de las raíces, se almacenaron en una solución de glicerol al 30%/DMSO al 2% a 4°C.

6.9. Visualización por microscopía

Las raíces teñidas se visualizaron al microscopio estereoscópico (Olympus modelo SZX7). Además, se emplearon cámaras especiales hechas con portaobjetos y marcos de Parafilm, en las que se colocaron glicerol al 30% y DMSO al 2%, junto con las muestras de tejido radicular, y se sellaron con un cubreobjetos. Dichas muestras se visualizaron en un microscopio invertido (Nikon modelo ECLIPSE TE300). Para la visualización de cortes longitudinales de nódulos, se realizó de forma *in vivo* mediante fluorescencia, donde se utilizó el microscopio confocal (Nikon modelo ECLIPSE Ti, Japan).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis *in silico* de los elementos *cis*-regulatorios en la región promotora *pPvPCO1*

Para el análisis *in silico* de la región promotora se contempló una región de 2400 pares de bases río arriba del codón de inicio de la transcripción (ATG), donde se identificaron 260 elementos que se encuentran implicados en el proceso de nodulación, así como en la respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno o estrés abiótico: NODCON1, NODCON2, WRKY71, GT1CONSENSUS, CURECORECR, WBOX, MYB, MYC, ABRE, ANAERO1CONSENSUS, ARE, TCA, MBS y TCA-elemento. También se identificaron elementos TATABOX implicados en el inicio de la transcripción (Figura 14).

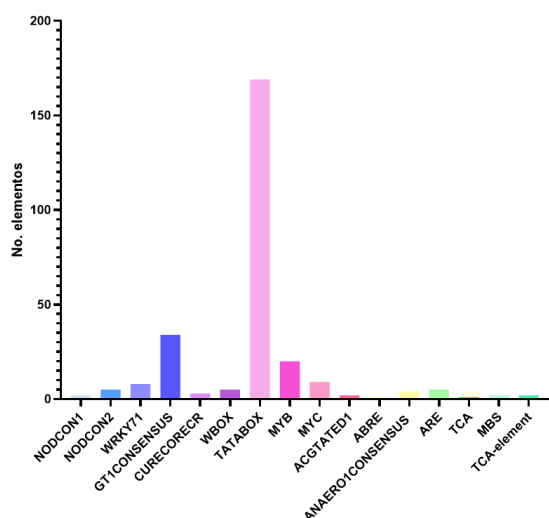


Figura 15. Elementos *cis*-regulatorios del promotor *PvPCO1* que participan en la respuesta a la hipoxia y en la nodulación.

7.2. Generación de la construcción molecular del promotor de *pPvPCO1*

A continuación se presenta la estrategia seguida para generar la construcción molecular *pPvPCO1::GFP-GUS*, que permitió evaluar la actividad del promotor de *pPvPCO1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. En primer lugar, la amplificación del fragmento de aproximadamente 2400 pb correspondiente a la región promotora de *pPvPCO1* confirmó el tamaño esperado, lo que indica

que los oligonucleótidos diseñados fueron específicos y adecuados para aislar la región reguladora de interés (Figura 15A).

La posterior clonación del fragmento en el vector de entrada pENTR/D-TOPO y la obtención de cuatro clonas positivas, corroboradas mediante PCR en colonia y secuenciación, permitieron verificar la correcta inserción y la integridad de la secuencia promotora (Figura 15B). La secuenciación fue un paso fundamental, ya que aseguró que el promotor no presentara mutaciones derivadas de la amplificación por PCR que pudieran alterar su actividad transcripcional.

Una vez validado el clon de entrada, se recombinó mediante el sistema Gateway hacia el vector destino pBGWFS7 permitió generar la construcción del plásmido *pBGWFS7pPvPCO1* en células de *E. coli* Top10. Donde se obtuvieron dos colonias positivas en *E. coli* Top10 y su validación mediante PCR en colonia confirmaron el éxito de la recombinación y la correcta transferencia del promotor al vector binario (Figura 15C). Este paso fue esencial, ya que el vector pBGWFS7 contiene los genes reporteros *GFP* y *GUS*, cuya expresión queda bajo el control de *pPvPCO1*, lo que permitirá evaluar posteriormente su actividad en tejidos vegetales.

Finalmente, se realizó la transformación del plásmido recombinante en *A. rhizogenes* K599 y la obtención de seis clonas positivas confirmadas por PCR en colonia demostraron que la construcción fue introducida exitosamente en la bacteria (Figura 15D). Se seleccionaron 2 colonias positivas para evaluar la eficiencia de cada clona para la generación de raíces transgénicas (clonas 2 y 5). Donde se seleccionó la clona 2 para la generación de plantas compuestas debido a que tuvo una mayor eficiencia en la generación de raíces transgénicas.

Este resultado fue indispensable para las etapas posteriores del estudio, ya que *A. rhizogenes* constituye el sistema de transferencia del T-DNA hacia las células de *P. vulgaris*, lo que posibilitó la generación de raíces transgénicas necesarias para analizar el patrón espacial y temporal de expresión del promotor *pPvPCO1* durante la simbiosis con *R. tropici* DsRed y en condiciones de anegamiento.

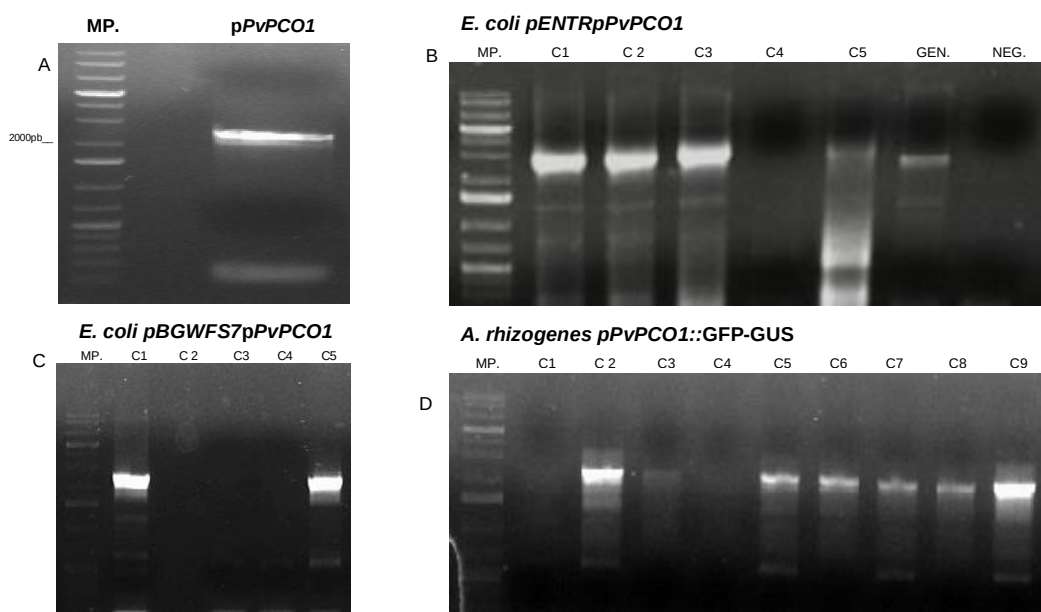


Figura 16. Validación de la construcción molecular *pPvPCO1::GFP-GUS* mediante PCR en colonia. A) Amplificación del promotor de *pPvPCO1*. B) Amplificación por PCR de *pENTR pPvPCO1*. C) Amplificación por PCR de *pBGWFS7 pPvPCO1*. D) Amplificación por PCR en *pBGWFS7 pPvPCO1* en *A. rhizogenes*.

7.3. Caracterización de la actividad de *pPvPCO1* bajo condiciones de estrés por anegamiento.

Con el propósito de determinar la actividad espacio-temporal del promotor *pPvPCO1* en respuesta al estrés por anegamiento, se generaron raíces transformadas con la construcción *pPvPCO1::GFP-GUS* y raíces control transformadas con el vector vacío *pBGWFS7*. Las plantas compuestas fueron sometidas a condiciones de anegamiento y se realizó una cinética de muestreo a las 0, 1, 3, 6, 12, 24, 28 y 48 horas posteriores al tratamiento. En cada tiempo se evaluó la actividad del promotor mediante el ensayo histoquímico de GUS.

Los resultados muestran un patrón diferencial entre las raíces control y las transformadas con la construcción de interés. En las raíces transformadas con el vector vacío no se detectó actividad del gen reportero en ninguno de los tiempos analizados (Figura 16A), lo que confirma que la tinción observada en las raíces transformadas con *pPvPCO1::GFP-GUS* es consecuencia de la actividad del *pPvPCO1* y no de una expresión inespecífica del vector o del procedimiento de transformación. En contraste, las raíces que contienen la construcción

pPvPCO1::GFP-GUS presentan un patrón dinámico de expresión en respuesta al anegamiento (Figura 16B). Durante las primeras horas del tratamiento (0 y 1 h) no se observa una señal evidente de GUS, lo que indica una actividad basal del promotor en condiciones previas al establecimiento del estrés. A partir de las 3 horas se detecta una tinción tenue, localizada principalmente en la región meristemática y en la zona de elongación de la raíz, lo que sugiere que estas regiones constituyen los primeros sitios en los que se activa la respuesta transcripcional de *PvPCO1*.

La intensidad de la tinción aumenta considerablemente a las 6 horas y alcanza su máxima expresión entre las 12 y 24 horas posteriores al anegamiento, observándose una señal intensa distribuida en una mayor proporción del tejido radical. Este incremento temporal indica que *pPvPCO1* responde de manera inducible al estrés por anegamiento y que su actividad coincide con el periodo en el que las raíces experimentan una mayor limitación de oxígeno como consecuencia de la inundación.



Figura 17. Actividad del promotor *pPvPCO1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* bajo condiciones de anegamiento. A) raíces transformadas con el vector vacío *pBGWFS7* y B) raíces transformadas con la construcción *pPvPCO1::GFP-GUS* durante una cinética de inundación de 0, 1, 3, 6, 12, 24, 28 y 48 horas. Escala de 2 cm.

Posteriormente, a las 28 y 48 horas, la intensidad de la tinción disminuye respecto de la observada entre las 12 y 24 horas, aunque la actividad del promotor aún es detectable. Esta reducción podría indicar que la respuesta transcripcional de *PvPCO1* es transitoria y que, una vez establecida la respuesta inicial al estrés, la expresión del gen disminuye a medida que la raíz desarrolla mecanismos de adaptación fisiológica a las condiciones de hipoxia.

En conjunto, estos resultados demuestran que *pPvPCO1* es un promotor inducible por anegamiento y que su activación depende del tiempo, con una expresión preferencial en regiones de crecimiento activo de la raíz y un máximo de actividad entre las 12 y 24 horas posteriores al inicio del tratamiento. Este patrón de expresión respalda la participación de *PvPCO1* en la respuesta temprana de *P. vulgaris* al estrés por la disminución del oxígeno en el sistema radical.

En el análisis de regiones específicas de la raíz principal se observó un patrón espacio-temporal de actividad de *pPvPCO1* (Figura 17). A las 0 horas, la actividad del promotor se localizó en la zona meristemática, principalmente en la columela, como lo indica la tinción azul del ensayo histoquímico de GUS (Figura 17A). A la 1 hora, la intensidad de la señal aumentó en la región meristemática y este patrón se mantuvo hasta las 3 horas de anegamiento (Figuras 17B-C).

A las 6 horas, la actividad del promotor aumentó y se extendió hacia el cilindro vascular, además de permanecer en la zona meristemática (Figura 17D). Entre las 12 y las 24 horas se observó la mayor intensidad de tinción, que se distribuyó a lo largo de la raíz principal, lo que indica el máximo nivel de actividad de *pPvPCO1* (Figuras 17E-F). Posteriormente, a las 28 horas, la intensidad de la señal disminuyó y la actividad se restringió nuevamente a la zona meristemática (Figura 17G). Finalmente, a las 48 horas, la actividad del promotor se mantuvo en la zona meristemática y en el cilindro vascular, aunque con menor intensidad que la máxima observada entre las 12 y 24 horas (Figura 17H).

En las raíces laterales, la actividad de *pPvPCO1* presentó un patrón similar al observado en la raíz principal (Figuras 17I-P). A las 0 horas, la actividad del promotor se localizó principalmente en la zona meristemática de la raíz lateral (Figura 17I). Entre 1 y 6 horas de anegamiento, la intensidad de la tinción aumentó gradualmente y permaneció concentrada en la región apical (Figuras 17J-M). A las 12 y 24 horas, se observó la mayor actividad del promotor, con una distribución más amplia de la tinción a lo largo de la raíz lateral (Figuras 17N-O). Posteriormente, a las 48 horas, la intensidad de la señal disminuyó,

observándose una menor actividad en la zona meristemática en comparación con los tiempos de máxima expresión (Figura 17P).

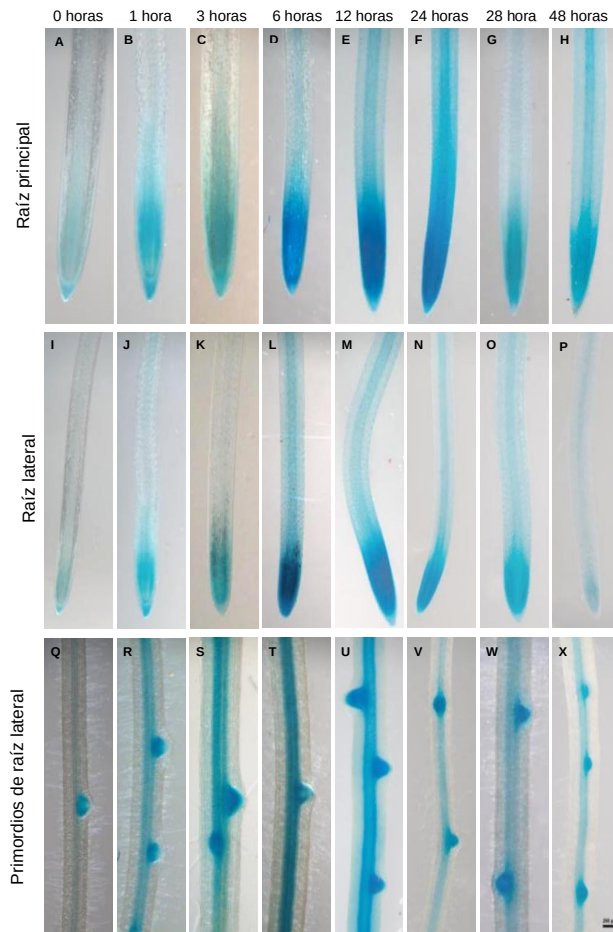


Figura 18. Actividad spatiotemporal del promotor de *pPvPCO1* en condiciones de anegamiento. Visualización de la actividad de GUS en la raíz principal (A-H), en la raíz lateral (I-P) y en los primordios de raíz lateral (Q-X). Escala de 200 μ m.

En los primordios de raíz lateral, *pPvPCO1* mostró actividad desde el inicio del experimento. A las 0 horas, la tinción con GUS se detectó específicamente en los primordios de raíz lateral (Figura 17Q). A partir de la 1 hora de anegamiento, además de mantenerse en los primordios, la actividad del promotor se extendió hacia las células del cilindro vascular, patrón que permaneció durante toda la cinética hasta las 48 horas (Figuras 17R-X). Este patrón indica una actividad sostenida de *pPvPCO1* en los tejidos asociados al desarrollo de raíces laterales y en la vasculatura durante la respuesta al anegamiento.

7.4. Caracterización de la actividad del promotor *pPvPCO1* durante el proceso de nodulación

Se evaluó la actividad espacio-temporal del promotor del gen *PvPCO1* durante la nodulación. Se generaron raíces transformadas con la construcción molecular *pPvPCO1::GFP-GUS* y raíces control con el vector vacío pBGWFS7. Las plantas compuestas fueron inoculadas con la bacteria *R. tropici* DsRed y se realizó una cinética a los tiempos: 5, 10, 14, 21, 25 y 30 días postinoculación (dpi). Posteriormente, se realizó el ensayo histoquímico de GUS.

En las raíces control, es decir, las plantas que expresan el vector vacío, tanto en condiciones no inoculadas como inoculadas, no se detectó actividad del promotor en ninguno de los tiempos evaluados durante la cinética, lo que confirma la ausencia de señal inespecífica derivada del vector vacío (Figuras 18A y C). Por el contrario, en las raíces transformadas con la construcción que porta la fusión transcripcional *pPvPCO1::GFP-GUS*, en condiciones no inoculadas, la actividad del promotor se observa en la región apical, en la zona de elongación y en la de emergencia de raíces laterales. Esta actividad se observa desde etapas tempranas, como a los 5 días, y se mantiene hasta los 25 días. Sin embargo, a los 30 días, *pPvPCO1* alcanza su nivel máximo de actividad (Figura 18B).

En las raíces inoculadas con *R. tropici*, la tinción se observa más intensificada y ampliamente distribuida que en las raíces no inoculadas. La actividad del promotor es más notable en los tiempos de 14 y 21 dpi, con una fuerte actividad en las zonas corticales donde se inician las estructuras nodulares. Mientras tanto, a los 25–30 dpi, la intensidad de la tinción disminuye ligeramente y la actividad se concentra principalmente en los nódulos maduros (Figura 18D).

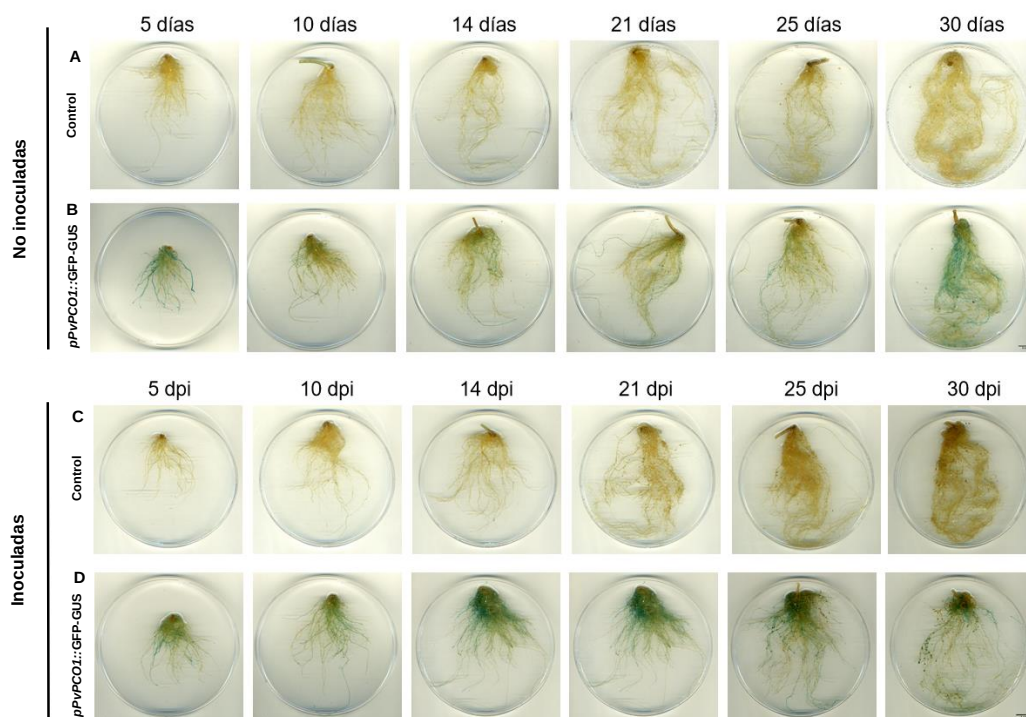


Figura 19. Actividad del promotor de *pPvPCO1* en raíces transgénicas de *P. vulgaris* durante la nodulación. A-B) raíces no inoculadas y C-D) raíces inoculadas con *R. tropici*. A-C) raíces transformadas con el vector vacío *pBGWFS7* y B-D) raíces transformadas con la construcción de interés, durante una cinética de nodulación de 5, 10, 14, 21, 25 y 30 días. Escala de 2 cm.

Como resultado, en regiones específicas de la raíz, como en las raíces principales en condiciones no inoculadas, se observa que, en 5 días, se presenta actividad en el meristemo basal, preferentemente en la zona de la columela (Figura 19A). En un plazo de 10 días, además de estar activo el promotor de *PvPCO1* en la zona de la columela y en el meristemo basal, la actividad se expande hasta las células de la vasculatura (Figura 19B). En un tiempo de 14 días, el promotor de *PvPCO1* alcanza su mayor actividad, observándose en las zonas meristemáticas y en la zona de elongación, principalmente en las células de la columela, del haz vascular, de la epidermis y del córtex (Figura 19C). A los 21 días, se observó una disminución de la actividad en el meristemo basal, preferentemente en el periciclo y en la columela de la raíz (Figura 19D). Mientras que en 25 días se observa en el meristemo basal y se expande a las células de la vasculatura de la zona de elongación (Figura 19E). Finalmente, a los 30 días, se observa en la zona de proliferación (Figura 19F).

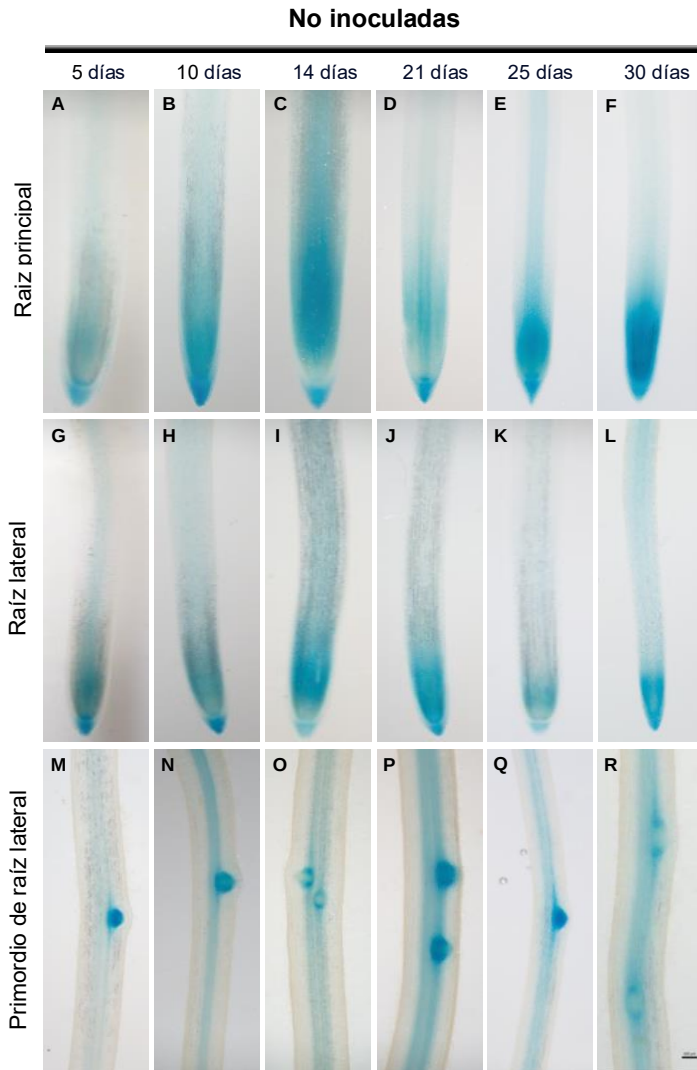


Figura 20. Actividad espacio-temporal del promotor de *pPvPCO1* en raíces no inoculadas. A-F) raíz principal; G-L) raíz lateral; y M-R) primordios de raíz lateral. Escala de 900 μ m.

En las raíces laterales, el tiempo de 5 días es similar al patrón de actividad de la raíz principal, en el que la actividad se concentra preferentemente en la columela y se mantiene hasta el día 10 (Figuras 19G-H). En un plazo de 14 días, la actividad del promotor disminuye en la columela y aumenta en la zona del meristemo basal (Figura 19I). La actividad del promotor durante 21 días se observa en toda la zona meristemática (Figura 19J). A los 25 días, disminuye la actividad y, a los 30 días, aumenta en la zona meristemática respecto a los 25 días (Figuras 19K-L).

Finalmente, en los primordios de la raíz lateral, se observa únicamente a los 5 días (Figura 19M). A los 10 días, además de estar activo en los primordios de raíz, también se encuentra activo en las células de la vasculatura de la raíz (Figura 19N), mientras que a los 14 días la actividad del promotor se encuentra preferentemente en el periciclo (Figura 19O). Posteriormente, la actividad del promotor a los 21 y 25 días se mantiene preferentemente en los primordios de la raíz lateral y en la vasculatura de la raíz (Figuras 19P-Q). Finalmente, durante 30 días se observa actividad en las células del haz vascular, así como en la parte de la Figura 19R.

Las raíces inoculadas con *R. tropici* Ds/Red, presentan de entrada una actividad del promotor de *pPvPCO1* mucho más acentuada en las raíces principales en el tiempo de 5 y 10 dpi y esta se observa en la zona meristemática y en la vasculatura de la raíz (Figuras 20A-B). A los 14 dpi, la actividad del promotor está prácticamente distribuida por toda la raíz (Figura 20C); esta actividad disminuye y se observa preferentemente en las zonas meristemáticas y del haz vascular. Esta actividad va de 21 a 30 dpi; sin embargo, a 25 dpi se observa que en la zona meristemática hay menor actividad únicamente en las células de la columela (Figuras 20D-F).

En las raíces laterales la actividad del promotor de *pPvPCO1* se observa en la zona meristemática y en las células del cilindro vascular (Figura 20G). Para los 10 dpi, se observó que el promotor está activo únicamente en la zona meristemática, preferentemente en la epidermis de la raíz (Figura 20H). Para los 14 dpi, además de estar activo en la zona meristemática, también se encuentra activo en las células de la vasculatura (Figura 20I); mientras que, para el tiempo de 21 dpi a 30 dpi, en las raíces laterales la actividad se observa en toda la raíz, preferentemente en la zona meristemática (Figuras 20J-L). En los primordios de raíz lateral desde los 5 dpi, la actividad se observa en la zona del cilindro vascular y, preferentemente, en los primordios de raíz lateral; esta actividad se mantiene hasta los 30 dpi (Figuras 20M-R).

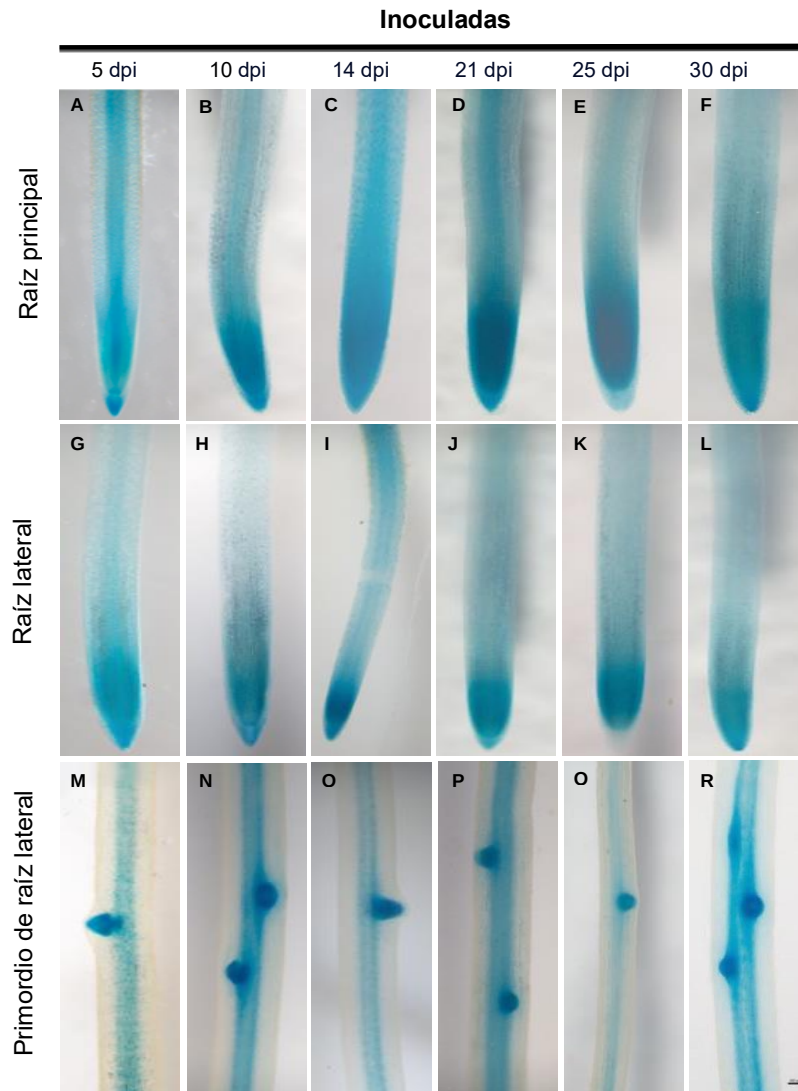


Figura 21. Actividad espacio-temporal del promotor de *pPvPCO1* en raíces inoculadas con *R. tropici*. A-F) raíz principal; G-L) raíz lateral; y M-R) primordios de raíz lateral. Escala de 900 μm .

Durante la organogénesis del nódulo, se observa que la actividad del promotor de *pPvPCO1* está presente a los 5 dpi y a los 7 dpi en la zona de división de las células corticales (Figura 21A); además, se observa actividad en los primordios de nódulo a los 7 dpi (Figura 21B).

De manera similar, en los nódulos jóvenes de 10 dpi a 14 dpi se observó que el promotor de *pPvPCO1* está activo en estos mismos (Figuras 21C-D); mientras que en los nódulos maduros de 21 dpi a 25 dpi se observa la actividad del promotor en las zonas de las lenticelas del nódulo, así como en la vasculatura

de la raíz (Figuras 21E-F). En los nódulos senescentes de 30 dpi, se observa que la actividad se mantiene en la zona de las lenticelas del nódulo y en el haz vascular de la raíz (Figuras 21G-H).

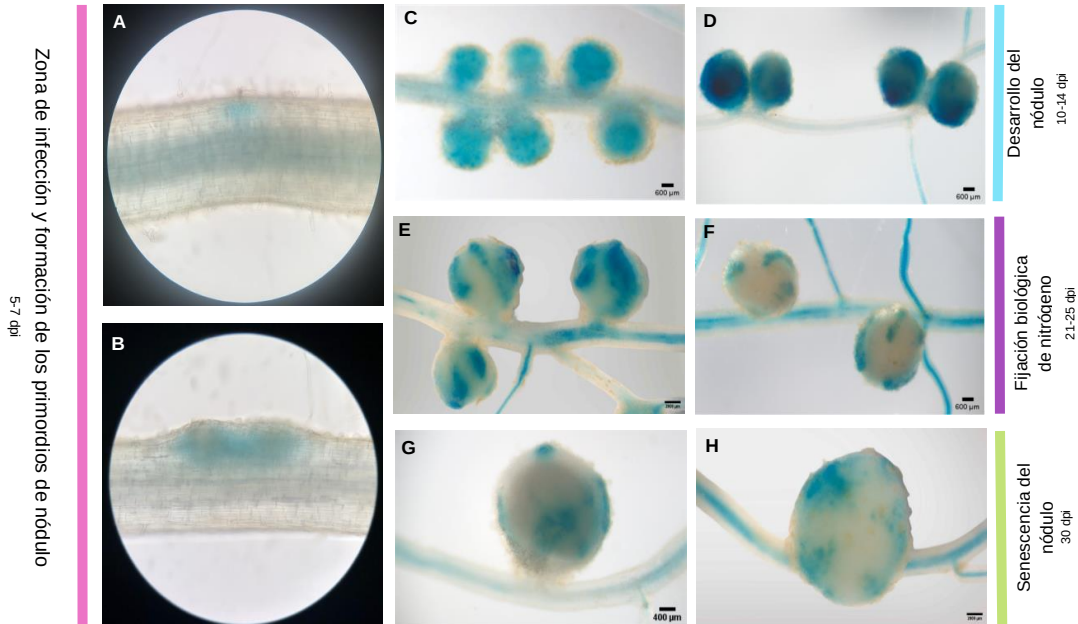


Figura 22. Actividad espacio-temporal del promotor de *pPvPCO1* durante la organogénesis del nódulo. A) zona de infección, B) primordios de nódulo, C-D) nódulos jóvenes, E-F) nódulos maduros y G-H) nódulos senescentes.

Se realizaron cortes longitudinales de nódulos a los 21 dpi y se analizaron mediante microscopía confocal. Se observó en la figura 22A fluorescencia roja, correspondiente a *R. tropici* CIAT899 que se encuentra expresando la proteína de fluorescencia roja DsRed permitiendo identificar a las bacterias durante el proceso de infección, mediante microscopía de fluorescencia. Esto evidencia una colonización activa dentro del nódulo. En la figura 22B, la fluorescencia verde correspondiente a la actividad del promotor de *pPvPCO1* se observó ampliamente distribuida en las células del nódulo, con mayor intensidad en las zonas cercanas a las regiones de colonización.

El análisis de la colocalización mostró una superposición parcial entre ambas señales, observada en las regiones de color amarillo/naranja (Figura 22C). Esta colocalización indica que la actividad del promotor de *pPvPCO1* se

da preferentemente en las zonas con mayor presencia de colonización bacteriana.

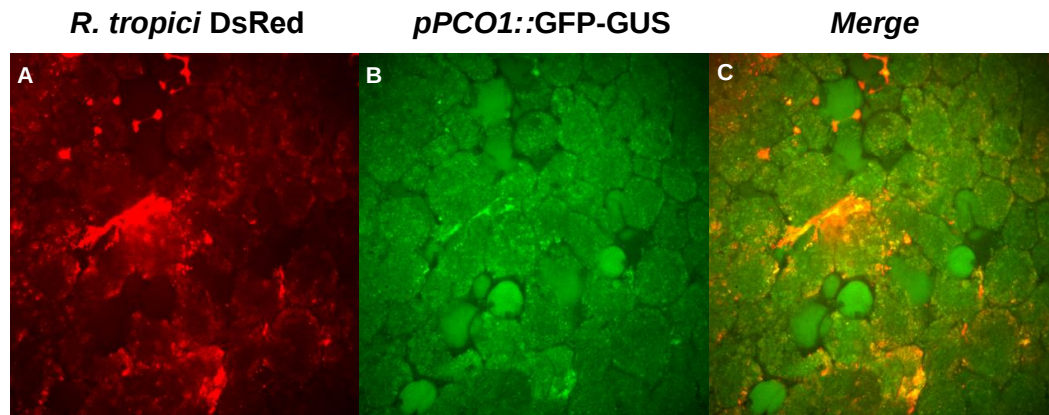


Figura 23. Localización de *R. tropici* DsRed y de la actividad del promotor de *pPvPCO1* en nódulos a los 21 dpi. A) localización de *R. tropici*, B) localización del promotor *PvPCO1* y C) colocalización de *R. tropici* y del promotor *PvPCO1*.

8. DISCUSIÓN

El anegamiento del suelo constituye uno de los principales tipos de estrés abiótico que afectan el desarrollo de las plantas, provocando una reducción en la difusión de oxígeno generando una condición de hipoxia (Zhang *et al.*, 2025). Sin embargo, existen condiciones hipóxicas en las cuales los bajos niveles de oxígeno forman parte del desarrollo de órganos vegetales como los nódulos simbióticos, los cuales son nichos hipóxicos que requieren mantener una baja disponibilidad de oxígeno para que se realice el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Rutten *et al.*, 2021).

El análisis *in silico* de los elementos *cis*-regulatorios del p *PvPCO1* permitió identificar un total de 103 elementos *cis*-regulatorios que se encuentran implicados en la respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno o estrés abiótico y en el proceso de nodulación. También se identificaron 157 elementos que participan en el inicio de la transcripción. Los elementos que más frecuentemente se localizaron en p*PvPCO1* fueron NODCON2, WRKY71, GT1CONSENSUS, MYB y TATA-BOX.

NODCON2 ha sido descrito como un elemento *cis*-regulatorio asociado a la expresión de genes como la nodulinas que se encuentran involucradas en la

expresión específica de los nódulos radiculares o genes de leghemoglobinas, juegan un papel crucial durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno, ya que se encarga de secuestrar al oxígeno dentro del nódulo (Stougaard *et al.*, 1990; Fehlbeg *et al.*, 2005). WRKY71 es un elemento regulador clave en respuesta a defensa, estrés abiótico y señalización hormonal principalmente del ácido abscísico, ácido salicílico, jasmonico y etileno, por lo que podría estar sujeto a una regulación sensible al estado redox (Eulgem *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2005).

Mientras que GT1CONSENSUS ha sido identificado como regulador de la respuesta al estrés osmótico, así como la señalización hormonal principalmente del ácido abscísico (SA) por lo que puede estar implicado en la modulación de la expresión génica bajo hipoxia, debido a que participa en redes de señalización asociadas al estado redox, osmótico, ROS, SA, entre otros (Le Gourrierec *et al.*, 1999; Villain *et al.*, 1996). El elemento MYB se ha identificado en regiones promotoras reconocidas por los factores de transcripción MYB, y que regulan la señalización por ácido abscísico y la expresión de genes de respuesta a estrés hídrico (Abe *et al.*, 2003).

Por otro lado, también se identificó un elemento *cis*-regulatorio que constituye uno de los motivos clásicos que se encuentran asociados a la expresión bajo condiciones de hipoxia, este es denominado ARE, se ha identificado en regiones de promotores como ADH1 y PDC que están involucrados en la respuesta metabólica durante la hipoxia (Sadeghnezhad *et al.*, (2014). La presencia de estos elementos sugiere que *PvPCO1* podría estar implicado no solo en la respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno provocada por algún estrés ambiental, sino también en la simbiosis y el establecimiento del nódulo.

En la actividad de *pPvPCO1*, bajo condiciones de anegamiento tanto en las raíces principales como en las laterales, se observa que a las 0 h la señal es basal y se restringe principalmente al ápice radical. Mientras que a partir de las 1-6 hrs de anegamiento, la tinción aumenta notablemente en la zona meristemática y de elongación, esto sugiere que *PvPCO1* es un gen altamente sensible a la disminución de oxígeno actuando en la respuesta inicial del estrés por hipoxia. De manera similar, los estudios previos en *A. thaliana* han

demostrado que PCO1 se encuentra altamente inducido en condiciones de hipoxia temprana (Weits *et al.*, 2014). A las 12 y 24 h, se logra alcanzar la máxima actividad del promotor de *PvPCO1* donde la señal es intensa y se extiende hacia más regiones de la raíz, este periodo podría representar la fase de aclimatación metabólica de las plantas ante esta condición, esto es muy importante ya que se ha demostrado en *A. thaliana*, así como en *P. pinea* PCO1 existe una expresión diferencial a las 4, 8 y 12 horas en condiciones de inundación con respecto a las condiciones de normoxia (Weits *et al.*, 2022). Posteriormente, a las 28 y 48 h, aunque la señal persiste principalmente en la zona apical, parece disminuir.

En los primordios de raíces laterales a las 0 horas se observa actividad del promotor en el primordio de raíz lateral, sin embargo a las 1-48 horas además de estar activo en los primordios de nódulo también se observa tinción en la zona del cilindro vascular, en estudios similares en *A. thaliana* se observó la actividad del *pPCO1* en condiciones hipóxicas en primordios de raíces laterales donde se observa que *AtPCO1* se encuentra activo desde la etapa I en los primordios así como en la vasculatura y se mantienen hasta la etapa VII del desarrollo de raíces laterales (Shukla *et al.*, 2019). Es decir, existe una fuerte correlación entre la expresión de las PCOs y las etapas tempranas del desarrollo de las raíces laterales.

En el análisis histoquímico de la actividad de *PvPCO1*, se reveló que en las raíces no inoculadas la tinción es baja y se restringe principalmente a la zona apical y a los primordios de raíz lateral; esto concuerda con los reportes que indican que dicha zona es considerada un tejido de baja disponibilidad de oxígeno. También, en un estudio realizado por Shukla y colaboradores (2019), se propone un modelo en el que la iniciación del primordio está regulada principalmente por la acumulación de auxinas, mientras que el crecimiento progresivo dentro de los tejidos reduce la difusión de oxígeno, estableciendo un microambiente hipóxico en las zonas meristemáticas.

En contraste, las raíces inoculadas mostraron una mayor intensidad de tinción, preferentemente en la región apical, en los primordios de raíz lateral y en los tejidos vasculares, este incremento en la actividad sugiere que la interacción con *R. tropici* induce cambios fisiológicos que alteran la homeostasis de oxígeno. Esta menor disponibilidad de oxígeno podría estar siendo provocada por la división celular cortical que ocurre durante la formación de los meristemas del

nódulo en la simbiosis. Durante la organogénesis de los nódulos, el análisis de la actividad del promotor se observa en etapas tempranas, como en la división celular cortical y en primordios de nódulo, así como en los nódulos jóvenes y en lenticelas de nódulos maduros/senescentes. Durante la división celular y el desarrollo de primordio, se requiere de una reorganización celular, y la generación de una alta actividad metabólica y un aumento en el consumo de oxígeno, además en los nódulos jóvenes, se establece un periodo de proliferación celular activa y diferenciación de células infectadas, sugiriendo que *PvPCO1* podría participar en la regulación del oxígeno durante la transición hacia un microambiente hipóxica, sobre todo en los nódulos maduros donde se genera una barrera adicional de oxígeno constituido por un córtex especializado, además de la expresión de las leg-hemoglobinas especializadas para secuestrar el oxígeno (Wycoff *et al.*, 1998). En el análisis de acumulación de transcritos de *PvPCO1* corresponde con los datos de la actividad del promotor, y esto sucede desde etapas tempranas de la simbiosis, por lo que *PvPCO1* está participando durante la organogénesis del nódulo desde etapas tempranas hasta las etapas tardías. En resumen, los mecanismos de percepción del oxígeno están presentes tanto en el desarrollo de la raíz como en el de los nódulos simbióticos, como regulan el establecimiento de los meristemos y la función de las células bajo condiciones de hipoxia.

9. CONCLUSIONES

1. *PvPCO1*, bajo condiciones de anegamiento, está activado desde tiempos tempranos, alcanzando su mayor actividad a las 24 horas, lo que sugiere que participa activamente en la respuesta a la baja disponibilidad de oxígeno.
2. *PvPCO1* se encuentra activo durante distintas etapas de la organogénesis nodular, lo que sugiere su participación en procesos asociados al establecimiento y desarrollo del nódulo.
3. La actividad del promotor *PvPCO1* evidenció una regulación temporal dinámica, frente al anegamiento y a la interacción simbiótica.

10. PERSPECTIVAS

1. Realizar la caracterización del silenciamiento y de la sobreexpresión de *PvPCO1* en condiciones de estrés por anegamiento y durante el proceso de nodulación, a fin de determinar su participación en dichos procesos.
2. Determinar la localización subcelular de *PvPCO1* mediante la transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* con la construcción molecular *35S:PCO1-GFP*, utilizando microscopía confocal.

11. REFERENCIAS

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis AtMYC2* (bHLH) and *AtMYB2* (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15, 63-78.
- Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A., & Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in plant science*, 12(9), 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.003>
- Armstrong, R. E., & Jones, W. (2006). Rhizome phyllosphere oxygenation in Phragmites and other species in relation to redox potential, convective gas flow, submergence and aeration pathways. *New Phytol*, 172, 719-731
- Armstrong, W., Beckett, P. M., Justin, S. H. F. W., & Lythe, S. (1991). Modeling, and other aspects of root aeration by diffusion. *Plant life under oxygen deprivation*, 267–282. SPB Academic Publishing.
- Ashikari, M., Nagai, K., & Bailey-Serres, J. (2025). Surviving floods: Escape and quiescence strategies of rice coping with submergence. *Plant Physiology*, 197(2). <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaf029>
- Aslam, A., Mahmood, A., Ur-Rehman, H., Li, C., Liang, X., Shao, J., Negm, S., Moustafa, M., Aamer, M., & Hassan, M. U. (2023). Plant adaptation to flooding stress under changing climate conditions: Ongoing breakthroughs and future challenges. *Plants*, 12(22), Article 3824. <https://doi.org/10.3390/plants12223824>
- Bailey-Serres, J., & Voesenek, L. A. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 313-339.
- Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S., & Bailey-Serres, J. (2002). RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance. *Science*, 296, 2026–2028.
- Bidel, L. P., Renault, P., Pagès, L., & Rivière, L. M. (2000). Mapping meristem respiration of *Prunus persica* (L.) Batsch seedlings: potential respiration of the

- meristems, O₂ diffusional constraints and combined effects on root growth. *Journal of experimental botany*, 51(345), 755–768.
- Björkman, O. (1966). The effect of oxygen concentration on photosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 19(3), 618-633. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1966.tb07046.x>
- Borisjuk, L., & Rolletschek, H. (2009). The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist*, 182(1), 17–30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02752.x>
- Boyle, S. A., & Yeung, E. C. (1983). Embryogeny of *Phaseolus*: developmental pattern of lactate and alcohol dehydrogenases. *Phytochemistry* 22, 2413–2416.
- Chávez Suárez, L., Álvarez Fonseca, A., & Ramírez Fernández, R. (2014). Aspectos de interés sobre las acuaporinas en las plantas. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 45–54. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193232155005.pdf>
- Dietz, K. J., Turkan, I., & Krieger-Liszkay, A. (2016). Señalización dependiente del estado redox y de especies reactivas de oxígeno dentro y fuera del cloroplasto fotosintético. *Plant Physiol.* 171, 1541–1550. 10.1104/pp.16.00375
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M., & Sánchez, F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus spp.*: A tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1385–1393. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1385>
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by *WRKY* transcription factors. *EMBO J.* 18, 4689-4699.
- Flaya, M. (s. f.). Morfología de la planta de frijol. (Ilustración). Depositphotos.

- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development (Cambridge, England)*, 139(5), 883–893. <https://doi.org/10.1242/dev.071928>
- Gomes, G., & Scortecci, K. (2002). Auxin and its role in plant development: Structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biol*, 23, 894–904.
- González-Guzmán, M., Gómez-Cadenas, A., & Arbona, V. (2021). Absciscic acid as an emerging modulator of the responses of plants to low oxygen conditions. *Front. Plant Sci*, 12, 661-789.
- Hancock, J. T. (2022). A Brief History of Oxygen: 250 Years on. *Oxygen*, 2(1), 31-39. <https://doi.org/10.3390/oxygen2010004>
- Harper, D. A. T. (2024). Late Ordovician Mass Extinction: Earth, fire and ice. *National Science Review*, 11(1), 319. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwad319>
- He, F., Wang, H. L., Li, H. G., Su, Y., Li, S., & Yang, Y. (2018). PeCHYR 1, a ubiquitin E3 ligase from *Populus euphratica*, enhances drought tolerance via ABA-induced stomatal closure by ROS production in *Populus*. *Plant Biotechnol. J.* 16, 1514–1528. doi: 10.1111/pbi.12893
- Herzog, M., Striker, G. G., Colmer, T. D & Pedersen, O. (2016). Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat – a review of root and shoot physiology. *Plant, Cell & Environment*, 39, 1068–1086.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in plant science*, 10, 800. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzlander, M., Belt, K., & Millar, A. H. (2016). The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiol*, 171, 1551–1559. doi: 10.1104/pp.16.00166
- Jia, W., Ma, M., Chen, J., & Wu, S. (2021). Plant Morphological, Physiological

- and Anatomical Adaption to Flooding Stress and the Underlying Molecular Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1088. <https://doi.org/10.3390/ijms22031088>
- Kawase, M. (1979). Role of cellulose in aerenchyma development in sunflower. *American Journal of Botany*, 66, 183-190.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7, 193-195
- Khorobrykh, S., Havurinne, V., Mattila, H., & Tyystjärvi, E. (2020). Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 91. <https://doi.org/10.3390/plants9010091>
- Koo, D., Lee, H. G., Bae, S. H., Lee, K., & Seo, P. J. (2024). Callus proliferation-induced hypoxic microenvironment decreases shoot regeneration competence in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 17(3), 395–408. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.01.009>
- Le Gourrierc, J., Li, Y. F., & Zhou, D. X. (1999). Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J*, 18, 663-668.
- Lenton, T. M., Rothschild, L. J., & Lister, A. M. (2003). The coupled evolution of life and atmospheric oxygen. *Evolution on Planet Earth*, 35–53. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012598655-7/50030-6>
- Li, S., Pezeshki, S. R., & Shields, F. D. (2006). Partial flooding enhances aeration in adventitious roots of black willow (*Salix nigra*) cuttings. *J. Plant Physiol*, 163, 619-628.
- Loreti, E., Van Veen, H., & Perata, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Curr. Opin. Plant Biol*, 33, 64–71.
- Loreti., E., & Perata, P. (2020). The many facets of hypoxia in plants. *Plants*, 9(6), 745.

- Manghwar, H., Hussain, A., Alam, I., Khoso, M. A., Ali, Q., & Liu, F. (2024). Waterlogging stress in plants: Unraveling the mechanisms and impacts on growth, development, and productivity. *Environmental and Experimental Botany*, 224, 105-824.
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 225. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>
- Masson, N., Keeley, T. P., Giuntoli, B., White, M. D., Puerta, M. L., Perata, P., Hopkinson, R. J., Flashman, E., Licausi, F., & Ratcliffe, P. J. (2019). Conserved N-terminal cysteine dioxygenases transduce responses to hypoxia in animals and plants. *Science*, 365(6448), 65–69. <https://doi.org/10.1126/science.aaw0112>
- Martínez-Arias, C., Witzell, J., Solla, A., Martin, J. A., & Rodríguez-Calcerrada, J. (2022). Beneficial and pathogenic plant-microbe interactions during flooding stress. *Plant, cell & environment*, 45(10), 2875–2897. <https://doi.org/10.1111/pce.14403>
- Martínez-Arias, C., Witzell, J., Solla, A., Martín, J. A., & Rodríguez-Calcerrada, J. (2022). Beneficial and pathogenic plant-microbe interactions during flooding stress. *Plant Cell and Environment*, 45(10), 2875–2897. <https://doi.org/10.1111/pce.14403>
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici* sp. nov., a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* spp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 417–426.
- Ntukamazina, N., Onwonga, R. N., Sommer, R., Mukankusi, C. M., Mburu, J., & Rubyogo, J. C. (2017). Effect of excessive and minimal soil moisture stress on agronomic performance of bush and climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1373414. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1373414>

- Pan, J., Sharif, R., Xu, X., & Chen, X. (2021). Mechanisms of Waterlogging Tolerance in Plants: Research Progress and Prospects. *Frontiers in plant science*, 11, 627331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.627331>
- Pan, R., Buitrago, S., Feng, X., Hu, A., Zhou, M., & Zhang, W. (2022). Ethylene regulates aerenchyma formation in cotton under hypoxia stress by inducing the accumulation of reactive oxygen species. *Environ. Exp. Bot*, 197, 104826.
- Parolin, P. (2009). Submerged in darkness: adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. *Annals of Botany*, 103, 359-376.
- Petsch, S. T. (2003). The global oxygen cycle. En H. D Holland & K. K. Turekian (Eds.), *Treatise on Geochemistry. Elsevier*, 8, 515. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/08159-7>
- Pucciariello, C., & Perata, P. (2021). The Oxidative Paradox in Low Oxygen Stress in Plants. *Antioxidants*, 10(2), 332. <https://doi.org/10.3390/antiox10020332>
- Renziehausen, T., Dirr, A., Schmidt-Schippers, R., Flashman, E., & Schippers, J. (2025). Oxygen sensing and plant adaptation to flooding in a changing climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 380, 1927. <https://doi.org/10.1098/rstb.2024.0238>
- Sadeghnezhad, E., Askari, H., Soltani, S., & Honarvar, F. (2014). Identification and Distribution of Anaerobic Responsive Elements (AREs) in Genes Functional Categorization of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 1(4).
- Saglio, P. H. (1985). Effect of path or sink anoxia on sugar translocation in roots of maize seedlings. *Plant Physiology*, 77, 285-290.
- Sandalio, L. M., & Romero-Puertas, M. C. (2015). Peroxisomes sense and respond to environmental cues by regulating ROS and RNS signalling networks. *Ann. Bot.* 116, 475–485. doi: 10.1093/aob/mcv074

- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., & Voesenek, L. A. C. J. (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low-oxygen stress research. *The New Phytologist*, 214(4), 1403-1407. <https://doi.org/10.1111/nph.14519>
- Sauter M. (2013). Root responses to flooding. *Plant biology*, 16(3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.03.013>
- Shukla, V., Lombardi, L., Lacopino, S., Pencik, A., Novak, O., Perata, P., Giuntoli, B., & Licausi, F. (2019). Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 12(4), 538–551. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.00>
- Stamati, K., Mudera, V., & Cheema, U. (2011). Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 2(1), 2041731411432365. <https://doi.org/10.1177/2041731411432365>
- Steffens, B., Rasmussen, A. (2016). The physiology of adventitious roots. *Plant Physiol*, 170, 603–617.
- Stougaard, J., Jørgensen, J. E., Christensen, T., Kühle, A., y Marcker, K. A. (1990). Interdependence and nodule specificity of cis-acting regulatory elements in the soybean leghemoglobin lbc 3 and N23 gene promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, 220, 353-360.
- Tamang, B. G., & Fukao, T. (2015). Plant adaptation to multiple stresses during submergence and following submergence. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30164–30180. <https://doi.org/10.3390/ijms161226226>
- Valdes Franco, J. A., Collier, R., Wang, Y., Huo, N., Gu, Y., Thilmony, R., & Thomson, J. G. (1986). Draft Genome Sequence of *Agrobacterium rhizogenes* Strain NCPPB2659. *Genome Announcements*, 4(4),746-16.

- Villain, P., Mache, R., Zhou, D. X. (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J Biol Chem*, 271, 32593-32598.
- Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J. (2015). Flood adaptive traits and processes: An overview. *New Phytol*, 206, 57–73. doi: 10.1111/nph.13209.
- Weits, D. A., van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2021). Molecular oxygen as a signaling component in plant development. *New Phytologist*, 229(1), 24-35. <https://doi.org/10.1111/nph.16424>
- Weits, D. A., Zhou, L., Giuntoli, B., Dalle Carbonare, L., Iacopino, S., Piccinini, L., Shukla, V., Bui, L. T., Novi, G., van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2023). Acquisition of hypoxia inducibility by oxygen sensing N-terminal cysteine oxidase in spermatophytes. *Plant, Cell & Environment*, 46(1), 322–338. <https://doi.org/10.1111/pce.14440>
- Weits, D., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten H. M., Riegler, H., Hoefgen, R., Perata, P., van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2014). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat Commun* 5, 3425. <https://doi.org/10.1038/ncomms4425>
- Wycoff, K. L., Hunt, S., Gonzales, M. B., VandenBosch, K. A., Layzell, D. B., & Hirsch, A. M. (1998). Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant physiology*, 117(2), 385–395. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.385>
- Xie, Z., Zhang, Z. L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D., & Shen, Q. J. (2005). Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiol*, 137, 176-189.
- Yan, K., Zhao, S., Cui, M., Han, G., & Wen, P. (2018). Vulnerability of photosynthesis and photosystem I in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) exposed to waterlogging. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 125, 239–246.

Zhang, Y., Chen, X., Geng, S., & Zhang, X. (2025). A review of soil waterlogging impacts, mechanisms, and adaptive strategies. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1545912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1545912>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efectos en la planta ante condiciones de estrés por anegamiento..	9
Figura 2. Estrategias adaptativas de la planta ante condiciones de anegamiento.....	11
Figura 3. Estrategias utilizadas por las plantas ante la inundación.....	12
Figura 4. Nichos hipóxicos naturales en plantas.....	13
Figura 5. Diálogo molecular establecido durante la asociación leguminosa-rizobio.....	15
Figura 6. Colonización de los rizobios	16
Figura 7. Estructura morfológica del nódulo indeterminado y del determinado.....	17
Figura 8. Morfología de la planta de <i>P. vulgaris</i>	18
Figura 9. Vía de regulación de los factores de respuesta a etileno.	20
Figura 10. Análisis de la acumulación de los transcritos de PCOs en raíces silvestres de <i>P. vulgaris</i> durante la cinética de interacción con <i>R. tropici</i>	23
Figura 11. Análisis de la acumulación del transcrito de <i>PvPCO1</i> durante una cinética de nodulación en <i>P. vulgaris</i> inoculado con <i>R. tropici</i>	23
Figura 12. Análisis del perfil transcripcional de las PCOs de <i>P. vulgaris</i> durante una cinética de anegamiento	24
Figura 13. Estrategia de la ingeniería genética hasta la transformación de raíces transgénicas.	28
Figura 14. Representación gráfica de la cinética de anegamiento	35
Figura 15. Elementos <i>cis</i> -regulatorios del promotor <i>PvPCO1</i> que participan en la respuesta a la hipoxia y en la nodulación.....	37
Figura 16. Validación de la construcción molecular <i>pPvPCO1::GFP-GUS</i> mediante PCR en colonia	39
Figura 17. Actividad del promotor <i>pPvPCO1</i> en raíces transgénicas de <i>P. vulgaris</i> bajo condiciones de anegamiento	40
Figura 18. Actividad espaciotemporal del promotor de <i>pPvPCO1</i> en condiciones de anegamiento.....	42

Figura 19. Actividad del promotor de <i>pPvPCO1</i> en raíces transgénicas de <i>P. vulgaris</i> durante la nodulación.....	44
Figura 20. Actividad espacio-temporal del promotor de <i>pPvPCO1</i> en raíces no inoculadas	45
Figura 21. Actividad espacio-temporal del promotor de <i>pPvPCO1</i> en raíces inoculadas con <i>R. tropici</i>	47
Figura 22. Actividad espacio-temporal del promotor de <i>pPvPCO1</i> durante la organogénesis del nódulo	48
Figura 23. Localización de <i>R. tropici</i> DsRed y de la actividad del promotor de <i>pPvPCO1</i> en nódulos a los 21 dpi	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Cepas utilizadas para este trabajo</i>	30
Tabla 2. <i>Plásmidos utilizados para este trabajo</i>	30
Tabla 3. <i>Construcciones utilizadas para este trabajo</i>	31
Tabla 4. <i>Oligonucleótidos específicos para la construcción pPvPCO1::GFP-GUS</i>	31