



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de la regulación post-transcripcional de *CSD1* y *ADH1* mediada por microRNAs en respuesta a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Carlos De la Rosa Ureña

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Aguirre Linares
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Ángel Arturo Guevara García
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. José Luis Reyes Taboada en el laboratorio Consorcio de la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles y del Dr. José Luis Reyes Taboada del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo fue apoyado por proyectos DGAPA-PAPIIT (IN-205015 y IN-202918) y CONACyT (CB-151571) otorgados a Dr. José Luis Reyes Taboada.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor de tesis, Dr. José Luis Reyes Taboada (Pepe), por el gran apoyo brindado y la enorme paciencia que me ha tenido durante todos estos años, pero sobretodo por su gran amistad.

A la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles por su gran apoyo y por tener discusiones en relación a mi proyecto bastantes enriquecedoras.

A los miembros del comité tutor integrado por Dr. Jesús Aguirre Linares y Dr. Ángel Arturo Guevara García, por sus valiosas aportaciones e ideas que ayudaron a profundizar y darle dirección a mi proyecto.

A los miembros del jurado integrado por Dr. Omar Homero Pantoja Ayala, Dra. Svetlana Shishkova, Dr. Damien Jean Formey de Saint Louvent, Dr. Oswaldo Valdés López y Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza, por sus valiosos comentarios, sugerencias e ideas que ayudaron a mejorar esta tesis.

A CONACyT por otorgarme la beca de Doctorado No. 245753, a la DGAPA-UNAM por el apoyo económico recibido en la etapa de Escritura de tesis y al apoyo otorgado por Docencia del Instituto de Biotecnología por estancias en otros laboratorios.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para asistir a congresos tanto Nacionales como Internacionales.

A todos los miembros del Consorcio de la Dra. Alejandra A. Covarrubias y el Dr. José Luis Reyes que aportaron desde el inicio del proyecto hasta la culminación de esta tesis.

A la Lic. Rosa María Solórzano Menier, Dra. Marina Battaglia, M.C. David F. Rendón Luna y Dr. Jesús S. López Bucio por sus consejos y su excelente apoyo para realizar los ensayos de Western blot.

A la Dra. Catalina Arenas Huertero, Dra. Guadalupe Sosa Valencia y al M.C. Luis Alfredo Bañuelos Vázquez por su apoyo y consejos en la generación de raíces pilosas de *P. vulgaris*.

Al M. C. Carlos A. González Chávez, encargado de la Unidad de Transformación Genética y Cultivo de Tejidos Vegetales, por su ayuda y facilidades en el crecimiento de plantas en el invernadero.

Al apoyo recibido por los miembros del laboratorio de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas (CCG) UNAM. A la Dra. Georgina Hernández y Dr. Luis Pedro Iñiguez, por colaborar en el proyecto de análisis del splicing alternativo de precursor pre-miR398a-miR2119; al Dr. Alfonso Leija Salas por donar muestras de vainas de frijol para realizar experimentos exploratorios del precursor pre-miR398a-miR2119. Al Dr. Mario Ramírez Yañez y a Victor Manuel Bustos Z., por la gran ayuda en establecer y estandarizar el tratamiento de estrés oxidativo mediante el crecimiento de plantas de *P. vulgaris* en un sistema hidropónico.

Dr. Luis Lozano Aguirre y Dr. Santiago Castillo Ramírez del CCG, por colaborar en el estudio evolutivo del precursor pre-miR398a-miR2119 y de ADH1 en leguminosas.

Dra. Marcelina García Aguilar y Dr. Stewart Gillmor, por su apoyo e implementación de la técnica “Hibridación *in situ* de microRNAs”, en una breve estancia realizada en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO).

AGRADECIMIENTOS A MIS AMISTADES Y FAMILIARES por compartir momentos únicos e importantes durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos de la LCG: Daniel, Jorge, Mario, Orlando, Luis Pedro y Guanatos.

A mis amigos de la maestría: Kencho, Adam, Enrique, Che-nene, Lisata, Miriam, Sofía y Hannalí y Alfredo.

A mis amigos de “los asados”: Ruth, Tijuanita, Carmen, Rocío, César, Balderas y Chimino.

A mis amigos “como en los viejos tiempos...”: Esme, Lupita y David.

A mis amigos de “los depas de don David”: Amy Ronn, Manuel (abuelo), Natali, Ale y Mary.

A mis amigos de “Una y ya...”: Adam, Chuy, Checho, Palens, Perrinsky, Braulio, David Velasquez, Ricardo, Rafa, Pueblita, Ever y Danny.

A mis amigos de la tía: Villa, Garcés, Chupón, Peza, Pedro, Chiri, Checo, Fer y Buki.

A mis amigos los Lmb's: Anibal, Lalo, Jasiel, Paco, Candido, Ronald, Luis Roberto, Mafo, Luis Jaime, Noé, Sheko, Memito, Pepito, Iván, Galleta y el Bola.

A los miembros de los equipos de fútbol

Rucabanda: Fily, Iván, Corzo, Raunel, Lozano, Jalisco, Saralegui, Edson, Beto y Christian.

Bioperros: Luis Pedro, Chuy, Braulio, Parcerero, Ricardo, Rafa, Palens, Checho, Morelos, Danny, Hachita, Ricardo Caldera, David Velasquez, Espinoza, Jorge, Javi, Vic, Loquillo y Luis.

Efecto phaseolus: Chuchín, Cesar, Dante, Inti, Iván, Marco y Alex Tromas.

A los miembros de los equipos de basquetbol

Pitbulls: Ram, Gaby, Kevin, Micha, Rivelino, Mayra y Lety.

Bean-team: Damien, Mario, Martha, Laura, Alfredo y Jerome.

Pangolines: Joe, Alfredo, Lozano, Gama, David, Selene, Lore, Susy, Raunel y Edson.

Al ensamble musical del IBt, a Claudia y David, por compartir su talento, tiempo y paciencia en los ensayos, así como en las distintas presentaciones/conciertos que dimos durante este tiempo.

A Marieli por su gran amistad y compañía.

A mi familia que en todo momento me apoyaron y me motivaron para llegar hasta este punto, concluir el doctorado. A mis hermanas, Anabel y Fanny; mis cuñados, Erik y Pascual; mis sobrinos, Erikito y Sarchi. A mis tías, Ana y Gely; A mis tíos, Hippie, Tavo, Juan y Cato; A mis primos. A mi nana, Doña Güera. De manera muy especial, quisiera agradecer infinitamente a mis PADRES, Triny y Carlos, porque siempre creyeron y confianzaron en mí. Gracias por siempre motivarme seguir adelante.

*PAPEL DE LA REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE CSD1 Y
ADH1 MEDIADA POR MICRORNAS EN RESPUESTA A DÉFICIT
HÍDRICO EN PHASEOLUS VULGARIS*

INDICE

I. RESUMEN	9
II. ABSTRACT	10
III. ABREVIATURAS	11
IV. INTRODUCCIÓN	12
IV.I Biogénesis de microRNA en plantas.....	16
IV.II Regulación de la transcripción de los genes <i>MIR</i>	16
IV.III Regulación y procesamiento del precursor de miRNA	17
IV.IV Estabilidad y degradación de miRNAs.....	18
IV.V Exportación de los miRNAs del núcleo al citoplasma.....	19
IV.VI Regulación de la actividad de miRNA.....	20
IV.VII Mecanismos de acción de los miRNAs.....	21
IV.VIII Participación de miRNAs en desarrollo y en respuesta a estrés.....	24
V. ANTECEDENTES	31
VI. HIPÓTESIS	41
VII. OBJETIVOS.....	41
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
VIII.I Crecimiento de plantas y tratamientos aplicados	42
VIII.II Extracción de RNA	43
VIII.III Northern blot.....	43
VIII.IV Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	44
VIII.V PCR cuantitativo (qPCR) para mRNAs y miRNAs.....	44
VIII.VI Purificación de DNA genómico	46
VIII.VII Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	46
VIII.VIII Purificación de fragmentos de DNA a partir de productos de PCR	47
VIII.IX Construcciones de vectores	47
VIII.X Generación de raíces transgénicas, raíces pilosas o <i>hairy roots</i>	48
VIII.XI 5´RACE.....	49
VIII.XII Extracción de proteínas totales de muestras vegetales y análisis por Western Blot ...	49
VIII.XIII Análisis bioinformático.....	50
IX. RESULTADOS	52
CAPÍTULO I	52

IX.I Identificación y conservación de los mRNAs blanco regulados por miR398 en <i>P. vulgaris</i>	52
IX.II miR2119 regula a una copia adicional de ADH1 en <i>P. vulgaris</i>	54
IX.III miR398a, miR2119 y miR398b aumentan su acumulación durante el desarrollo de la raíz en <i>P. vulgaris</i>	56
IX.IV miR398a, miR2119 y miR398b disminuyen su acumulación ante déficit hídrico	59
IX.V Incremento de los niveles de los mRNAs de <i>CSD1</i> y <i>ADH1</i> en el tratamiento de déficit hídrico	61
IX.VI Los niveles de acumulación de proteína de ADH1 y de CSD1 aumentan en respuesta a déficit hídrico	64
IX.VII Sobre-expresión de pre-miR398a-2119 regula a <i>CSD1</i> y <i>ADH1 in vivo</i>	65
IX.VIII Modulación de <i>ADH1</i> y <i>CSD1</i> mediada por miRNAs en condiciones de inundación ...	66
CAPÍTULO II	69
IX.IX Estudio de la conservación del precursor pre-miR398a-miR2119 en un subgrupo de las leguminosas	69
IX.X Surgimiento de miR2119 y la adquisición del un precursor dicistrónico en la subfamilia de las Papilionoideae.....	72
IX.XI Eventos de duplicación del gen ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae	80
IX.XII Análisis del sitio de unión de miR2119 consenso en los clados de ADH1 de la subfamilia de las Papilionoideae.....	89
IX.XIII Posible origen de miR2119 a través de los eventos de duplicación de la ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae.....	92
CAPÍTULO III	95
IX.XIV Splicing alternativo del precursor pre-miR398a-miR2119 en <i>P. vulgaris</i>	95
IX.XV Caracterización de los sitios de splicing alternativo del precursor pre-miR398a-miR2119 en <i>P. vulgaris</i>	100
IX.XVI Expresión diferencial de los precursores pre-miR398a-miR2119 en el desarrollo de vainas de <i>P. vulgaris</i>	106
IX.XVII Conservación de los sitios de splicing en los géneros <i>Phaseolus</i> y <i>Vigna</i>	109
X. DISCUSIÓN	118
XI. CONCLUSIONES.....	125
XII. PERSPECTIVAS.....	126
XIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	127
XIV. TABLAS SUPLEMENTARIAS	129
XVII. BIBLIOGRAFÍA	130

I. RESUMEN

Comúnmente los genes *MIR* de plantas generan un transcrito que contiene a un sólo precursor para un microRNA. El procesamiento del precursor por DICER-LIKE 1 y factores asociados resulta en la producción de un dúplex de RNA (microRNA:microRNA*) de 20-24 nt de longitud, a partir del cual una cadena es elegida e incorporada a ARGONAUTA 1, la cual lo guía hacia su mRNA blanco ocasionando la inhibición de la traducción o el corte y la degradación del mismo. Se han descrito loci de microRNAs particulares que contienen más de dos precursores en un mismo transcrito, tal es el caso de la familia de *MIR395* en arroz, donde un sólo transcrito contiene hasta ocho precursores con la misma secuencia del miR395 en cada uno de ellos. En nuestro trabajo encontramos un caso único hasta ahora donde un microRNA conservado, miR398, está contenido en el mismo transcrito junto con un microRNA específico de leguminosas, miR2119. En *Phaseolus vulgaris* (frijol común), se demostró que miR398 y miR2119 son microRNAs funcionales teniendo como mRNAs blanco a la Cu/Zn Superóxido Dismutasa 1 (*CSD1*) y la Alcohol Deshidrogenasa 1 (*ADH1*), respectivamente. El precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119 se encuentra conservado en ciertas especies de leguminosas. Nuestros resultados indican que el aumento de la acumulación de miR398 y miR2119 mantiene reprimido los niveles de sus mRNAs blanco durante el desarrollo en *P. vulgaris*. Sin embargo, en respuesta a déficit hídrico en *P. vulgaris*, la represión miR398 y miR2119 conlleva a un aumento coordinado de la acumulación de los mRNAs blanco de *CSD1* y *ADH1*. Además, se observó que los miRNAs modulan el aumento de los niveles de *CSD1* y *ADH1* cuando las plantas de *P. vulgaris* son sometidas al tratamiento de inundación, lo que sugiere que el estado redox y el metabolismo de la fermentación deben de estar coordinados bajo distintas condiciones adversas.

II. ABSTRACT

Plant microRNAs are commonly in transcripts containing a single microRNA precursor. Processing of microRNA precursor by DICER-LIKE 1 and associated factors results in the production of a 20-24 nt small RNA, followed by its incorporation into an AGO-containing protein complex to guide silencing of an mRNA with a complementary target sequence. Transcripts of some microRNA loci contain more than one precursor with stem-loop structure, thus encoding more than one microRNA in the same transcript. Here we describe a unique case where the evolutionary-conserved miR398a is encoded in the same transcript as the legume-specific miR2119. The dicistronic arrangement found in common bean (*Phaseolus vulgaris*) was also observed in other legumes. In *P. vulgaris* the accumulation of both mature miR398 and miR2119 is increased during plant development in roots. In water deficit conditions, both miRNAs are repressed, and we have shown that they target the mRNAs for CSD1 and ADH1, respectively. Our results indicate that the repression of miR398 and miR2119 leads to coordinated up-regulation of CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit in *P. vulgaris*. Furthermore, we show that miRNAs directed up-regulation of CSD1 and ADH1 mRNAs also occurs when plants are exposed to flooding, suggesting that plant redox status and fermentation metabolism must be closely coordinated under different adverse conditions.

III. ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico (<i>ABscisic Acid</i>).
ABRE	Elementos de Respuesta a ABA (<i>Responsive Element</i>).
AGO1	Argonauta 1
ADH1	Alcohol Deshidrogenasa 1.
cDNA	DNA complementario (<i>complementary DNA</i>)
CSD1	Cu/Zn Superóxido Dismutasa 1 (<i>Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1</i>).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>).
MIR	Gen que produce un microRNA.
miRNA	microRNA
miRNA*	microRNA estrella, secuencia complementaria al miRNA.
mRNA	RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>).
nt	Nucleótido.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
Pre-miRNA	Precursor de miRNA.
qPCR	PCR cuantitativo (<i>quantitative PCR</i>).
RACE	Amplificación Rápida de extremos de cDNA (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (<i>RNA Induced Silencing Complex</i>).
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>RiboNucleic Acid</i>).
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>).
RT-PCR	Transcriptasa Reversa-PCR (<i>Reverse Transcriptase-PCR</i>).

IV. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que frecuentemente están expuestas a diferentes estreses ambientales, condiciones externas que afectan el crecimiento, el desarrollo y la productividad. El estrés puede ser biótico, impuesto por otros organismos (insectos, bacterias, hongos, virus), ó abiótico, y surgir a partir de un exceso o déficit de un factor físico o químico. Entre las condiciones ambientales que pueden causar adversidad a las plantas se incluye la inundación, la sequía, temperaturas extremas, el exceso de salinidad en el suelo, la deficiencia de nutrientes, así como el exceso o la baja intensidad de luz (Shinozaki et al., 2015).

El estrés desencadena varias respuestas en las plantas, las cuales responden y se adaptan a través de varios procesos fisiológicos, bioquímicos y cambios en la expresión génica, adquiriendo tolerancia o evitando el estrés (Bray et al., 2000). La respuesta de la planta dependerá de la duración y de la severidad con la que el estrés es impuesto (Bray, 1997). Además, la resistencia o sensibilidad al estrés depende de la especie, el genotipo, la etapa del desarrollo, el órgano o el tipo celular (Shinozaki et al., 2015).

El estrés hídrico resulta del exceso de agua o si la cantidad o la calidad del agua disponible en el ambiente es insuficiente para abastecer las necesidades básicas requeridas por las plantas. La sequía, la alta salinidad en el suelo y las bajas temperaturas provocan déficit hídrico (Shinozaki et al., 2015). El déficit hídrico puede definirse como la situación en la cual el potencial hídrico y la presión de turgor disminuyen lo suficiente para interferir con los procesos celulares (Hsiao, 1973). El déficit hídrico es ocasionado por la pérdida moderada de agua, la cual conlleva al cerrado de estomas y la limitación del intercambio gaseoso. El crecimiento es uno de los procesos fisiológicos más sensibles al déficit hídrico debido a la reducción de la presión del turgor. La expansión celular sólo puede ocurrir cuando la presión del turgor es mayor que la producida por la pared celular. Por lo tanto, el déficit hídrico inhibe el crecimiento celular debido a la baja presión del turgor (Mckersie and Leshem, 1994). A nivel celular, el déficit hídrico induce cambios en la concentración de solutos, volumen celular, forma e integridad de la membrana, pérdida de turgor, cambios en los gradientes de potencial hídrico, etc. La pérdida severa de agua resulta en la deshidratación o desecación, lo que podría ocasionar graves daños en la estructura celular, metabolismo y eventualmente, el cese de actividades enzimáticas (Smirnoff, 1993). Más aún, este estrés hídrico severo puede generar el arresto de la fotosíntesis, perturbación en el metabolismo y finalmente, la muerte (Mckersie and Leshem, 1994; Shao et al., 2009).

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia para contender o evitar el estrés. Estos mecanismos son el escape, la evasión y la tolerancia al estrés como la sequía (Fang and Xiong, 2015). Las plantas que escapan a la sequía son capaces de completar

su ciclo de vida antes de que el estrés ocurra, presentando un alto grado de plasticidad en el desarrollo. La evasión es la habilidad de las plantas de mantener los tejidos hidratados bajo condiciones de déficit hídrico, mientras que la tolerancia permite mantener las funciones normales incluso en potenciales hídricos por debajo de los niveles óptimos (Chaves et al., 2003). Por un lado, en la evasión existen ciertos ajustes estructurales morfológicos y de crecimiento de la planta como reducir la pérdida de agua a través del cierre estomático, enrollamiento de la hoja, aumento de la acumulación de cera en la superficie de la hoja, así como cambios en el desarrollo del sistema radical, etc (Tardieu, 2013; Zhang et al., 2005). Por otro lado, la tolerancia se logra a través de coordinar mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos, los cuales incluyen la expresión de genes específicos y la acumulación de proteínas de respuesta, así como de ciertos genes que participan en la transducción de señal a la respuesta. Las plantas pueden adquirir tolerancia a través de sintetizar osmolitos regulatorios que permiten mantener la presión de turgor y también, a través del ajuste de actividades enzimáticas de defensa que ayudan a reducir o reparar el daño causado por el estrés (Fang and Xiong, 2015).

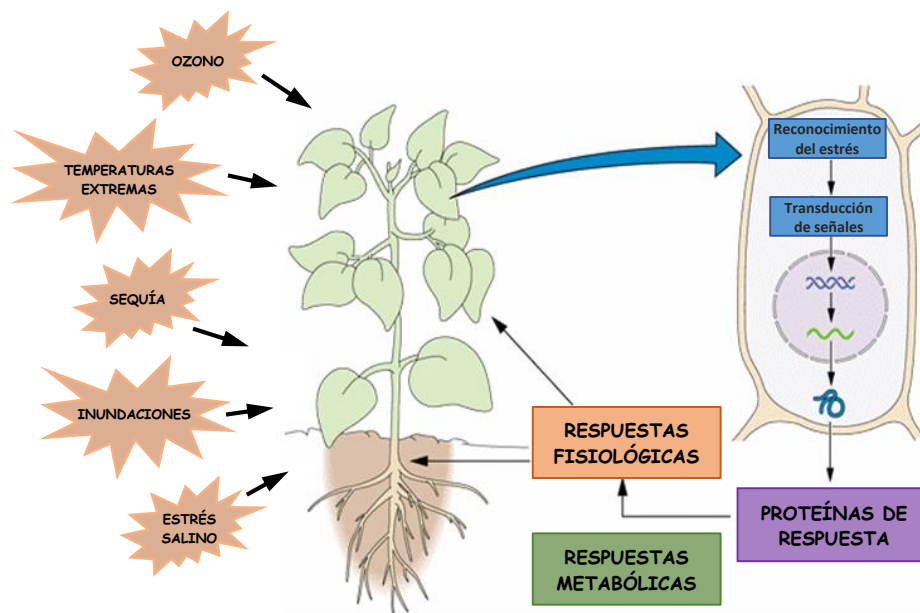


Figura 1. Las plantas responden y se adaptan a diferentes estreses ambientales. La planta percibe y reconoce diferentes formas de estrés. A nivel celular, el reconocimiento del estrés desencadena una transducción de señales que resulta en el cambio de la expresión genética y esto a su vez, puede influir en el metabolismo y en el desarrollo de la planta. Imagen tomada y modificada de (Bray et al., 2000).

El primer paso de regulación en la respuesta al déficit hídrico es el reconocimiento de la señal: la disminución del agua disponible en la célula es percibida desencadenando una vía de transducción de señales (Figura 1). Así, un estrés físico puede ser convertido en una respuesta bioquímica (Bray, 1997). La respuesta primaria induce, entre otros efectos, la expresión de genes que intervienen en diferentes procesos, como la protección de otras proteínas, entre ellas factores transcripcionales, ácidos nucleicos o estructuras celulares (chaperonas, hidrofílicas y proteínas LEAs), síntesis y/o liberación de ácido abscísico (Battaglia et al., 2008; Sakuma et al., 2002). Posteriormente, se producen respuestas fisiológicas como la regulación y el cerrado de los estomas, la síntesis de osmolitos (prolina, glicina-betaína, etc.) y la activación del sistema de transporte para la desintoxicación de iones, entre otras (Jacob et al., 1999; Ramanjulu and Bartels, 2002). Sin embargo, el aumento de la expresión de ciertos genes no significa que estén involucrados en la respuesta adaptativa, la inducción de algunos genes puede ser producto del daño ocasionado por el estrés. Por ello, la respuesta de los genes durante déficit hídrico puede clasificarse en dos tipos, basados en su respuesta en términos de escala de tiempo, genes de respuesta temprana y genes de respuesta tardía. Esto permite proponer que los genes de respuesta temprana pueden proveer de protección inicial y de amplificación de la señal mientras que los genes de respuesta tardía podrían estar involucrados en la adaptación al estrés (Ramanjulu and Bartels, 2002).

La respuesta ante el déficit hídrico activa distintas vías de señalización a través de la expresión de genes específicos que intervienen en diferentes procesos, como factores transcripcionales que regulan la expresión y las proteínas que participan directamente en la protección celular (Shinozaki et al., 2003). El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que participa en numerosos procesos fisiológicos como la dormancia y la germinación de la semilla, durante el desarrollo de las plantas, y en la respuesta a estrés biótico o abiótico, como en la tolerancia a la desecación (Finkelstein et al., 2002). El déficit hídrico promueve la síntesis de ABA, el cual induce la expresión de genes de respuesta a ABA. Los genes de respuesta a ABA (vía dependiente de ABA) contienen elementos de regulación en *cis* en su región promotora, entre los que destacan los elementos ABRE (ABA-responsive element). Estos elementos en *cis* favorece la interacción con factores de transcripción, los cuales, a su vez, inducen la expresión en respuesta a ABA. Sin embargo, también existe la vía independiente a la señalización por ABA en la respuesta a déficit hídrico, y los genes de respuesta involucrados en la segunda vía contienen los elementos DRE (Dehydration-responsive element) y otros elementos regulatorios en sus regiones promotoras importantes para la respuesta a déficit hídrico (Shinozaki et al., 2003; Uno et al., 2000). Adicionalmente, la respuesta al déficit hídrico también puede estar sujeta a

regulación epigenética, metilación de DNA o modificaciones post-traduccionales en las histonas, que puede jugar un papel importante en la memoria y la adaptación al estrés en plantas (Lamke and Baurle, 2017).

El análisis de mutantes relacionadas con el metabolismo de RNA ha revelado que el procesamiento, el decaimiento y la estabilidad del RNA juega un papel importante en la regulación de la expresión genética a nivel post-transcripcional en respuesta a estrés abiótico (Matsui et al., 2019). Recientemente, se ha descrito que en la respuesta y la adaptación al déficit hídrico a nivel post-transcripcional pueden estar involucrados los siguientes procesos: la adición del “cap” al extremo 5’ y la poliadenilación (poliA) en el extremo 3’ del mRNA, el procesamiento del mRNA por splicing para la eliminación de intrones y ensamble de exones, el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma, la regulación de la estabilidad del mRNA, la eficiencia traduccional y la regulación de la expresión génica por microRNAs (Covarrubias and Reyes, 2010; Gallie, 1993). Esto se ha logrado gracias al estudio de mutantes de *A. thaliana*, en las cuales, se han identificado factores involucrados en la respuesta a estrés, particularmente en la vía de respuesta a ABA, asociados al metabolismo del RNA. Por ejemplo, la mutante *the supersensitive to ABA and drought 1 (SAD1)* muestra sensibilidad a ABA y a sequía. SAD1 codifica para un polipéptido similar a Sm-like ribonucleoproteína pequeña nuclear involucrado en el reconocimiento y la precisión de los sitios de splicing, así como en la eficiencia del procesamiento del mRNA (Cui et al., 2014; Xiong et al., 2001). Otro ejemplo son las mutantes de *A. thaliana* con defecto en las proteínas de unión al “cap” como CBP20 y CBP80, también llamadas ABH1 (*ABA hypersensitive 1*), muestran hipersensibilidad a ABA en la germinación y en el cierre estomático, confiriendo tolerancia a la sequía (Hugouvieux et al., 2001). Estas proteínas forman parte del complejo CBC (*the nuclear cap-binding protein complex*), el cual se une al cap de los transcritos provenientes de la RNA polimerasa II. Con ello, CBP20 y CBP80 pueden influenciar el splicing alternativo del primer intrón de ciertos genes, particularmente el sitio de splicing 5’ (Raczynska et al., 2010). Otro caso es la mutación en el gen *LOS4 (low expression of osmotically responsive gene 4)* que codifica para una RNA helicasa DEAD box en *A. thaliana* y muestra fenotipo de hipersensibilidad al tratamiento de ABA y tolerancia al frío (Gong et al., 2005). La mutante *LOS4* mostró un aumento en la acumulación de mRNAs con poliA en el núcleo, lo que sugiere que ésta helicasa de RNA está involucrada en la exportación de los mRNAs (Gong et al., 2005). Por último, la mutante en *HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)* causó hipersensibilidad a ABA durante la germinación en *A. thaliana* (Lu and Fedoroff, 2000). Interesantemente, se ha caracterizado la participación de HYL1 como una proteína de unión a RNA de doble cadena que está involucrada

en la biogénesis de ciertos RNAs pequeños no codificantes llamados microRNAs, los cuales se describirán a continuación.

IV.I Biogénesis de microRNA en plantas

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA no codificantes de 20-24 nt que participan en la regulación genética a nivel post-transcripcional o traduccional. Los miRNAs se originan a partir de los transcritos primarios llamados pri-miRNAs que forman una estructura secundaria tipo tallo y asa, la cuál es reconocida y procesada por enzimas DICER LIKE 1 (DCL1), una RNAsa tipo III, produciendo un RNA de doble cadena aproximadamente de 21 nt. Posteriormente, una de las dos cadenas de RNA es selecciona y asociada a la proteína Argonauta 1 (AGO1), ésta cadena es llamada miRNA maduro o cadena guía. El miRNA maduro cargado en AGO1 reconoce a su mRNA blanco a través de complementariedad de bases, provocando un corte o inhibiendo la traducción del mRNA blanco para evitar su expresión (Bartel, 2004; Brodersen et al., 2008) (Figura 2).

IV.II Regulación de la transcripción de los genes *MIR*

La biogénesis de los miRNAs en plantas se genera a partir de la transcripción de un gen *MIR* por la RNA polimerasa II (Pol II). Los genes *MIR* se encuentran localizados frecuentemente en zonas intergénicas y se transcriben de manera similar a los genes que codifican para proteína (Xie et al., 2005). En la mayoría de los casos, el pri-miRNA de cada gen *MIR* produce un precursor de miRNA en plantas, a diferencia de lo que ocurre en los sistemas animales donde frecuentemente el transcrito contiene precursores de varios miRNAs (Li and Mao, 2007). Al transcrito que es producido por la Pol II se le añade en el extremo 5' un "cap" (7-metil-guanilato) y una cadena de poliA en el extremo 3', al igual que los mRNAs, para conferir estabilidad al pri-miRNA (Xie et al., 2005). Los genes *MIR* contienen en sus regiones promotoras, elementos regulatorios como cajas TATA y motivos de unión a factores de transcripción. Estos elementos regulatorios permite una regulación espacio-temporal y de respuesta a estrés por factores que actúan en *trans*, así como, acumulación diferencial de ciertas isoformas de un mismo miRNA que provienen de pri-miRNA de genes distintos (Bologna and Voinnet, 2014; Xie et al., 2005). Por ejemplo, el factor de transcripción APETALA 2 (AP2) está involucrado en el desarrollo de la semilla, en el mantenimiento de las células del meristemo y la identidad de los órganos florales en *A. thaliana*. AP2 tiene una regulación bifuncional a través de regular la transcripción de *MIR156* y *MIR172* de manera positiva y negativa, respectivamente (Yant et al., 2010). Particularmente en estrés, el factor transcripcional SQUAMOSA promoter binding protein-like7

(SPL7) induce la expresión de *MIR398b* y *MIR398c* en condiciones de deficiencia de cobre, mientras que otro factor transcripcional MYB2 se une al promotor de *MIR399F* para activar la transcripción bajo limitación de fósforo en *A. thaliana* (Baek et al., 2013; Yamasaki et al., 2009).

IV.III Regulación y procesamiento del precursor de miRNA

El transcrito primario o pri-miRNA del gen *MIR* es reconocido y procesado por DICER LIKE 1 (DCL1) para generar al precursor de miRNA (pre-miRNA), el cual produce una estructura tipo tallo asa con 2 nt sobresalientes en el extremo 3' al final del tallo. Después, en una segunda ronda de procesamiento, DCL1 corta al pre-miRNA dando lugar a un RNA de doble cadena o dúplex de RNA (miRNA/miRNA*) de ~21 nt, éste contiene 2 nt sobresalientes no-apareados de cadena sencilla en sus extremos 3' y un grupo fosfato en sus extremos 5', que es característico de un corte generado por una RNAsa de tipo III como lo es DCL1, ambos procesamientos se realizan en el núcleo (Margis et al., 2006). DCL1 contiene dominios RNA helicasa-DEXD/box, DUF283 (con propiedades de unión a RNA), dominio PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE (PAZ), dos dominios en tandem de RNAsa III y dos dominios en tandem de unión a RNA de doble cadena (*double strand-RNA binding domain*, dsRBD) (Margis et al., 2006). Mutaciones individuales en los dominios del sitio catalítico RNAsa III, dominio dsRBD o dominio de RNA helicasa reduce la acumulación de los miRNAs en general (Kasschau et al., 2003; Willmann et al., 2011). El dominio de RNA helicasa es requerido para el procesamiento preciso de algunos pri-miRNA por DCL1 *in vivo* (Liu et al., 2012). Sin embargo, la eficiencia y la precisión del procesamiento del pri-miRNA también necesita de la asistencia de varios factores como las proteínas: SERRATE (SE), HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y TOUGH (TGH), estas proteínas de unión a RNA en conjunto interactúan con DCL1 y son requeridas para la acumulación de los miRNAs (Xie et al., 2015). HYL1 es una proteína de unión a RNA de doble cadena que contiene dos dominios de unión a RNA (dsRBD) en su extremo N-terminal, mientras que en el C-terminal muestra seis secuencias repetidas de 28 aminoácidos, con alto grado de similitud entre cada una de ellas (Lu and Fedoroff, 2000; Wu et al., 2007). En cambio, la proteína SE se une a RNA de cadena sencilla en el N-terminal e interacciona con DCL1 a través de su dominio de dedos de Zinc (Zinc finger domain), el cual es requerido para mantener actividad óptima de DCL1 (Iwata et al., 2013; Machida et al., 2011). TGH es una proteína de unión a RNA de cadena sencilla y se asocia a ambas formas del transcrito, pri-miRNA y pre-miRNA. La pérdida de función de *tgh* reduce la actividad de DCL1, así como la asociación con el complejo HYL1 y el pri-miRNA, lo que sugiere que TGH puede promover el corte eficiente y el reclutamiento del pri-miRNAs por DCL1 (Ren and Yu, 2012). HYL1, TGH, SE y DCL1 se localizan en regiones sub-nucleares específicas llamadas cuerpos-D

(*Dicer bodies*, D-bodies), las cuales se caracterizan por ser estructuras altamente dinámicas visualizadas como *foci* dentro del compartimento nuclear donde se reclutan y se procesan a los pri-miRNAs (Fang and Spector, 2007; Song et al., 2007). Algunos estudios han revelado que la localización celular de los cuerpos-D puede ser importante para la biogénesis de miRNAs. Las proteínas NOT2 y MOS2 han sido propuestas para la formación correcta de los patrones de los cuerpos-D en *A. thaliana*. MOS2 es una proteína de unión a RNA e interacciona con los pri-miRNAs *in vivo*, y NOT2 interactúa directamente con DCL1. La pérdida de función en *mos2* altera la formación y el reclutamiento de los pri-miRNA en los cuerpos-D (Wu et al., 2013b); en cambio, la mutante *not2* incrementa el número de *foci*, sugiriendo la participación en el ensamblado de los cuerpos-D (Wang et al., 2013).

IV.IV Estabilidad y degradación de miRNAs

En plantas, los RNAs pequeños son modificados en el extremo 3' para conferir estabilidad o inducir degradación. En la biogénesis de miRNAs, después de la producción del dúplex miRNA/miRNA*, ambas cadenas son metiladas en el grupo hidroxilo 2' de la ribosa del extremo 3' por la enzima HUA ENHANCER 1 (HEN1), una metil-transferasa (MTasa) dependiente de Mg²⁺ (Yu et al., 2005). El estudio de mutantes *hen1* en *A. thaliana* se observó que los miRNAs muestran nucleótidos adicionales por uridilación (1-8 bases) en el extremo 3', así como también miRNAs que carecen de nucleótidos en el extremo 3', lo cual sugiere que la metilación en los miRNAs por HEN1 ayuda a proteger de la degradación y/o de la uridilación en el extremo 3' (Zhai et al., 2013). Además, la uridilación es un mecanismo de regulación para desestabilizar a los miRNAs en plantas. HEN1 SUPPRESSOR1 (HESO1), es una enzima uridyl-transferasa terminal responsable de la uridilación de la mayoría de los miRNAs (Ren et al., 2012; Zhao et al., 2012). En *A. thaliana*, los estudios de las mutantes de la pérdida de función de *heso1* y de las sobreexpresoras de *HESO1* mostraron incremento y reducción de la acumulación de los miRNAs, respectivamente, sugiriendo que la uridilación promueve la degradación de los miRNAs en plantas (Ren et al., 2012). Además, existe una familia de genes *SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN)* que codifica para cuatro exonucleasas que actúan en dirección 3' a 5' con redundancia funcional y degradan a los miRNAs en *A. thaliana*. Ensayos enzimáticos *in vitro* demostraron que SDN1 actúa específicamente en RNA de cadena sencilla y que la actividad de exonucleasa es parcialmente inhibida por el grupo metilo presente en el extremo 3' de los miRNAs (Ramachandran and Chen, 2008). SDNs son las responsables de la eliminación y el truncamiento de los nucleótidos en el extremo 3' de los miRNAs en la mutante *hen1* y de tipo silvestre en *A. thaliana*. Los estudios de secuenciación masiva de RNA pequeños comparando

los perfiles de mutantes *hen1* con la mutante *hen1 sdn1 sdn2* mostraron que el truncamiento de miRNAs está reducido cuando SDN1 y SDN2 no están presentes (Yu et al., 2017a). Sin embargo, SDN1 es incapaz de degradar miRNAs con uridilación en el extremo 3' *in vitro*, por lo que no parece ser la responsable de la degradación de miRNAs uridilados que probablemente esté realizando otra SDN u otra exonucleasa de RNA pequeños (Ramachandran and Chen, 2008).

IV.V Exportación de los miRNAs del núcleo al citoplasma

La exportación de los miRNAs del núcleo al citoplasma es parte fundamental para la actividad funcional de los miRNAs. Exportina 5 (Exp5), una proteína de unión a RNA de doble cadena dependiente de Ran-GTP, exporta el precursor pre-miRNA de núcleo a citoplasma en animales. En *A. thaliana*, el miRNA/miRNA* producido por DCL1 en el núcleo, es exportado del núcleo al citoplasma por la proteína HASTY (HST, ortólogo a Exp5). Mutantes en *hasty* revelan que la acumulación de ciertos miRNAs es reducida y los mRNAs blanco correspondientes aumentan su acumulación (Park et al., 2005). Al parecer, HST se requiere para la biogénesis o estabilidad de ciertos miRNAs en diferentes tejidos vegetales. Asimismo, se realizaron fraccionamientos de RNA de núcleo y de citoplasma en mutantes de *hasty*, pero no se encontraron alterados los niveles de miRNAs de ciertas fracciones, sólo disminuyen de manera general en comparación con el tipo silvestre, por lo que no es muy convincente la evidencia de que HST participe en la exportación de miRNAs dado a que se esperaría una mayor acumulación y retención de miRNAs en el núcleo en dicha mutante. Sin embargo, la mutante *hst-3* (delección de 3 nt en el primer exón de HST), reduce la acumulación de miRNAs significativamente debido a que bloquea la interacción entre HST y AtRAN1, una GTPasa pequeña. Exp5 y otras exportinas de la familia β -importinas, sólo se unen a sus cargos/clientes en asociación con Ran-GTP. Esta observación de que *hst-3* interfiere con la acumulación de miRNAs de manera dependiente de Ran-GTP sugiere que HST interactúa con algunos miRNAs y apoya la hipótesis que HST pudiera participa directamente en el procesamiento y la exportación de miRNAs. Sin embargo, se requeriría un análisis más profundo para dilucidar la función de HASTY en la biogénesis de miRNAs (Park et al., 2005). Recientemente, un estudio sobre el transporte de miRNAs del núcleo al citoplasma encontró que AGO1 puede cargar miRNAs en el núcleo y realizar el transporte hacia el citoplasma independiente a HST (Bologna et al., 2018). La proteína AGO1 contiene dos motivos en su extremo N-terminal de tipo coil, NLS (*nuclear-localization*) y NES (*nuclear-export signal*) que le permiten transportarse de núcleo-citoplasma a través de CRM1/EXPORTIN1 (EXPO1), la cual permite el transporte activo de proteínas que son dependiente de NES. Además, en ensayos de inmunoprecipitación de AGO1 en extractos nucleares demostraron que la

interacción con la proteína HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) y los miRNAs cargados en AGO1 presentaron metilación el extremo 3'. Por lo tanto, los miRNAs de plantas son madurados por los factores del procesamiento (DCL1, HYL1, SE, etc.), metilados por HEN1 y cargados por AGO1 en compañía de HSP90 en el núcleo para transportarlos al citoplasma a través de EXPO1 dependiente del motivo NES (Bologna et al., 2018).

IV.VI Regulación de la actividad de miRNA

AGO1 reconoce al dúplex miRNA/miRNA* y elige al miRNA maduro, ya sea en el núcleo o en el citoplasma. El miRNA maduro cargado en AGO1 reconoce a su mRNA blanco a través de complementariedad de bases, provocando el corte o la inhibición de la traducción del mRNA blanco mediado por el Complejo del Silenciamiento Inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés) en el citoplasma (Brodersen et al., 2008). El modelo actual para el cargado del miRNA en RISC se ha descrito en *A. thaliana* de la siguiente manera: la proteína HSP90 y la proteína Ciclofilina 40 (CYP40) forman un complejo con AGO1. La unión de ATP a HSP90 causa un cambio conformacional en AGO1 que permite la incorporación del dúplex de RNA al complejo AGO1-HSP90-CYP40. La hidrólisis de ATP por HSP90 conduce a la disociación de HSP90-CYP40 y el miRNA*, los cuales son separados del complejo AGO1-miRNA resultando en un RISC maduro (Iki et al., 2010; Yu et al., 2017b). La secuencia complementaria al miRNA es llamada miRNA estrella (miRNA*), la cual en la mayoría de los casos es degradada después de la disociación de AGO1, siendo independiente de la actividad del corte de AGO1 (Eamens et al., 2009). Sin embargo, algunos miRNAs* pueden ser cargados en otras AGOs, así pueden llegar a ser estabilizados y ser funcionales (Liu et al., 2017).

La selección y el cargado de los RNAs pequeños en las proteínas AGO no es aleatoria. La selección de la cadena guía o miRNA maduro puede ser afectada por factores que participan en el procesamiento del precursor pre-miRNA, la base nucleotídica presente en el extremo 5' y la estabilidad termodinámica en la estructura del dúplex de RNA. HYL1 y CPL1 (fosfatasa de HYL1) facilitan el procesamiento del pre-miRNA y la selección de la cadena guía, ya que mutantes de *hyl1* y *cpl1* muestran una mayor acumulación de miRNA* con respecto al tipo silvestre (Eamens et al., 2009; Manavella et al., 2012). El genoma de *A. thaliana* codifica para 10 proteínas AGOs, aunque algunas de ellas son redundantes, tienden a incorporar ciertos RNAs pequeños dependiendo del nucleótido presente en el extremo 5'. AGO1 tiene preferencia por el cargado de miRNAs que inician con uracilo en el extremo 5'. En contraste, algunos miRNAs* con adenosina en el extremo 5' son asociados preferencialmente en AGO2, mientras que aquellos miRNAs con citosina en el extremo 5' son incorporados en AGO5 (Mi et al., 2008). Sin embargo,

existen ejemplos como la familia *MIR165/MIR166*, los cuales la mayoría de sus miembros son RNAs que contienen uracilo en el extremo 5' son incorporados a AGO1 pero también a AGO10; mientras que miR390 es cargado en AGO7 en vez de AGO2, a pesar de tener una adenosina en el extremo 5' (Montgomery et al., 2008; Zhu et al., 2011b). Adicionalmente, el cargado de miRNAs en AGOs se ve afectado también por la estructura de dúplex de RNA. AGO2 prefiere dúplex de RNA sin ningún desapareamiento en la parte central, mientras que AGO1 favorece el dúplex de RNA que muestra desapareamiento en la parte central. En cambio, la asociación de AGO10 con miR166 está determinada por la estructura del miR166/miR166*, específicamente por una combinación de un desapareamiento (12U/*8U) y varios apareamientos adyacentes en el dúplex del RNA (Zhu et al., 2011b).

IV.VII Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs en plantas regulan la expresión de los mRNAs blanco a través de dos principales mecanismos de acción: el corte o la inhibición de la traducción del transcrito. Los miRNAs necesitan alta complementariedad para reconocer a su sustrato en plantas. Un estudio reciente muestra que además de la alta complementariedad entre el miRNA y su mRNA blanco, también es necesario el contexto del sitio de unión del miRNA y los niveles de expresión de ambos pueden contribuir al reconocimiento del mRNA blanco en *A. thaliana* (Li et al., 2014). En plantas, el corte del mRNA blanco es considerado como la vía predominante en la represión de la expresión genética y AGO1 es la proteína efectora de la mayoría de los miRNAs (Bartel, 2004). AGO1 contiene cuatro dominios: el dominio N-terminal, el dominio PAZ, el dominio MID (*the middle domain*) y el dominio PIWI. El dominio PAZ une a los miRNAs en el extremo 3', mientras que el dominio MID interactúa con el fosfato del extremo 5' (Frank et al., 2012). El dominio PIWI adopta un plegamiento tipo RNasa H y exhibe actividad catalítica de endonucleasa de RNA mediada por una triada de aminoácidos Asp-Asp-His (DDH), éste actúa cortando el mRNA blanco en la posición complementaria entre el nucleótido 10 y 11 del miRNA (Liu et al., 2004). El transcrito cortado por AGO1 genera un fragmento 5' con un grupo hidroxilo en el extremo 3' y otro fragmento 3' con un fosfato en el extremo 5', posteriormente ambos son degradados (Llave et al., 2002). El corte de AGO1 promueve el decaimiento de los mRNAs blanco por acción de exonucleasas sin el requerimiento de desadenilación del extremo 3' o "*decapping*" del extremo 5'. En *A. thaliana*, EXORIBONUCLEASE 4 (XRN4), una exonucleasa citoplasmática que degrada los fragmentos en dirección 5' a 3', es la responsable de degradar los fragmentos 3' producidos después del corte de AGO1 (Souret et al., 2004). En *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga unicelular, los fragmentos 5' son poliadenilados en el extremo 3' por la enzima nucleotidyl-

transferasa MUT68, la cual conduce a la degradación del fragmento 5' por el exosoma citoplasmático en dirección 3' a 5' (Ibrahim et al., 2006). Además, la proteína HESO1, previamente descrita como una enzima uridyl-transferasa de miRNAs, también uridila fragmentos 5' en sus extremos 3', en mutantes *heso1* de *A. thaliana* se incrementa la abundancia de los fragmentos 5', lo cual sugiere que la uridilación pudiera inducir su degradación (Ren et al., 2014). Por otro lado, existe otro mecanismo de acción que emplean los miRNAs para regular a sus mRNAs blanco que es a través de la inhibición de la traducción. Se ha visto que un subgrupo de miRNAs y una fracción de AGO1 se asocian a polisomas, correlacionando el papel que desempeñan los miRNAs en la inhibición de la traducción (Lanet et al., 2009). Un estudio reciente muestra que el complejo AGO-miRNA puede inhibir estéricamente el reclutamiento o el movimiento de los ribosomas después de unirse a la región de 5' no traducible (5'-UTR) o al marco abierto de lectura (ORF) del mRNA blanco. Este resultado indica que los miRNAs de plantas pueden inhibir el inicio o la elongación de la traducción del transcrito (Iwakawa and Tomari, 2013). Además, se ha visto asociado el proceso de inhibición de la traducción mediada por miRNAs a sitios subcelulares llamados cuerpos de procesamiento (*Processing bodies*, P-bodies), los cuales son distintos loci citoplasmáticos que contienen enzimas involucradas en la degradación de mRNAs (Liu et al., 2005). Algunos factores requeridos para la inhibición de la traducción mediada por miRNAs incluye a la enzima KATANIN 1 (KTN1, requerida para la formación apropiada de los microtúbulos), VARICOSE (VCS, uno de los componentes de P-bodies), la proteína GW-repeat protein SUO y la proteína ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) con localización en el retículo endoplásmico (Brodersen et al., 2008; Li et al., 2013; Yang et al., 2012). Mutaciones en estos genes interfieren con la represión mediada por miRNAs a nivel de traducción, lo que sugiere que los mecanismos de acción por el corte del transcrito y la inhibición de la traducción son dos modos de acción independientes (Yu et al., 2017b). Se han propuesto mecanismos de represión por miRNAs en animales incluyendo la disociación del complejo del inicio de la traducción, reclutamiento de represores de la traducción y desplazamiento de las proteínas que se unen al poliA del mRNA. Estas actividades de represión de miRNAs en animales requieren de la asistencia de una proteína de andamiaje GW182, la cual no se encuentra presente en plantas, pero no se descarta que este tipo de regulación también suceda (Iwakawa and Tomari, 2015).

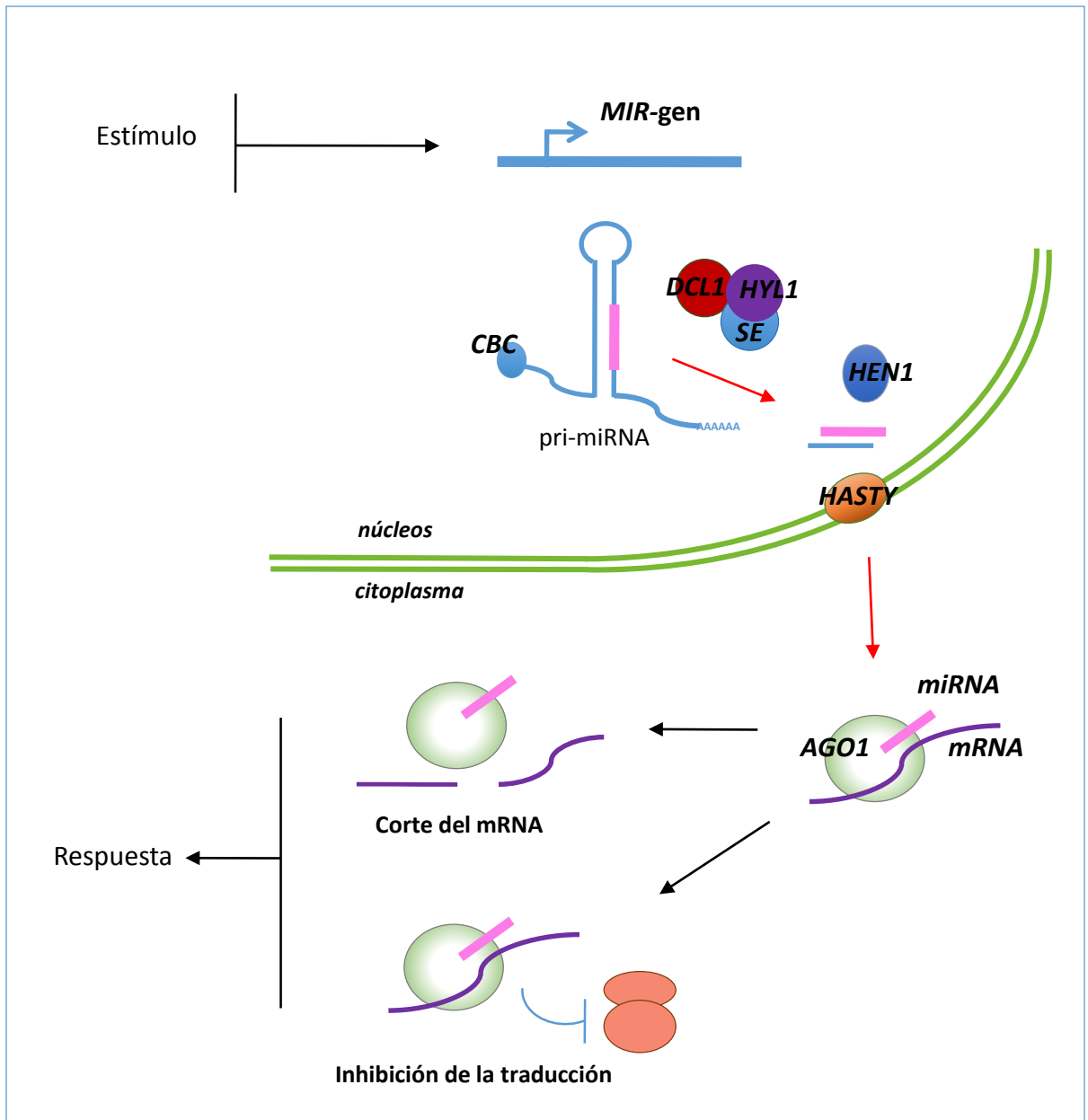


Figura 2. Modelo de la biogénesis de microRNAs en plantas. El gen *MIR* se transcribe y el transcrito adopta estructura tipo tallo-asa, llamado pri-miRNA que es reconocido por diferentes proteínas de unión a RNA de doble cadena. DCL1 procesa en dos rondas por corte el pri-miRNA a pre-miRNA y posteriormente, la generación del RNA de doble cadena de 21 nt que es exportado de núcleo a citoplasma. En el citoplasma, AGO1 carga al miRNA maduro y lo guía hacia su mRNA blanco, induciendo el corte o inhibición de la traducción del mRNA. Figura tomada y modificada de (Covarrubias and Reyes, 2010).

IV.VIII Participación de miRNAs en desarrollo y en respuesta a estrés

Un gran número de miRNAs en plantas se han identificado mediante secuenciación de siguiente generación (*Next Generation Sequencing, NGS*) y análisis genéticos, lo que ha permitido involucrarlos en diversos procesos de la planta como desarrollo de la hoja, raíz, sistema vascular y floral, así como, importantes en la transición de fase juvenil a adulta y reproductiva. Además, los miRNAs están involucrados en respuestas a diferentes estrés como sequía, estrés salino, frío, estrés oxidativo, deficiencia de nutrientes y estrés biótico (Li et al., 2017).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha visto que los miRNAs participan de distintas formas en el desarrollo. Durante su periodo de vida, las plantas experimentan dos procesos de transición: de la etapa juvenil a la adulta y de la etapa vegetativa a la reproductiva (Poethig, 2013). El primero de ellos depende de un gradiente de expresión mediado por miR156 y miR172 (Figura 3). La acumulación de miR156 aumenta en el meristemo apical de tallo durante etapas tempranas del crecimiento, pero disminuye la acumulación de miR156 conforme la planta madura y envejece. Por el contrario, los niveles de expresión de miR172 aumentan conforme transcurre los días del desarrollo, y se promueve la transición de etapa vegetativa a la fase reproductiva (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Zhu and Helliwell, 2011). miR156 mantiene la fase juvenil a través de restringir la expresión de una familia de factores de transcripción llamados SQUAMOSA promoter binding protein-like (SPL), los cuales son reguladores que actúan en vías con diferentes funciones en el desarrollo. Particularmente, *SPL9*, *SPL10* y *SPL1* participan en la regulación del tamaño, la forma y el borde de la hoja. El fenotipo de las plantas que sobreexpresan miR156 retrasa la floración; mientras que las mutantes con la expresión de los *SPL's* (*pSPL3::rSPL3*, *pSPL9::rSPL9* y *pSPL10::rSPL10*) que tienen mutado el sitio de unión de miR156 y son resistentes al corte mediado por el miRNA inducen la floración temprana (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). La sobreexpresión de miR156 en maíz y en *A. thaliana* produce un fenotipo similar (Chuck et al., 2007). En conjunto con esta evidencia, miR156 es un miRNA altamente conservado (Axtell and Bowman, 2008), lo que sugiere que miR156 es un regulador maestro de la fase juvenil en las plantas. Por otro lado, SPL9 actúa como activador transcripcional de *MIR172b*, el cual previene la expresión de los factores de transcripción AP2 (Wu et al., 2009). La proteína AP2 regula el tiempo de floración, la identidad de los órganos florales y el destino del meristemo floral. El genoma de *A. thaliana* codifica para más de cien factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia APETALA2/ethylene response element binding protein (AP2/EREBP), entre los cuales, dentro del clado AP2 se han descrito a seis miembros AP2-like como mRNAs blanco de miR172: TARGET OF EAT 1 al 3 (TOE1, TOE2 y TOE3), SCHLAFMÜTZE (SMZ), SCHNARCHZAPFEN (SNZ) y AP2 (Aukerman and Sakai, 2003; Dietz

et al., 2010; Yant et al., 2010). Mutantes individuales de la sobreexpresión de AP2, SMZ, SNZ, TOE1 o TOE2 mostraron un fenotipo de retraso en la floración; mientras que las mutantes como la sobreexpresión de 35S:miR172 o la pérdida de función de *ap2*, la cuádruple (*toe1 toe2 smz snz*) mutante y séxtuple (*toe1 toe2 smz snz toe3-1 ap2-12*) mutante mostraron fenotipo de floración temprana con respecto a la planta silvestre (Col-0) (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004; Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010).

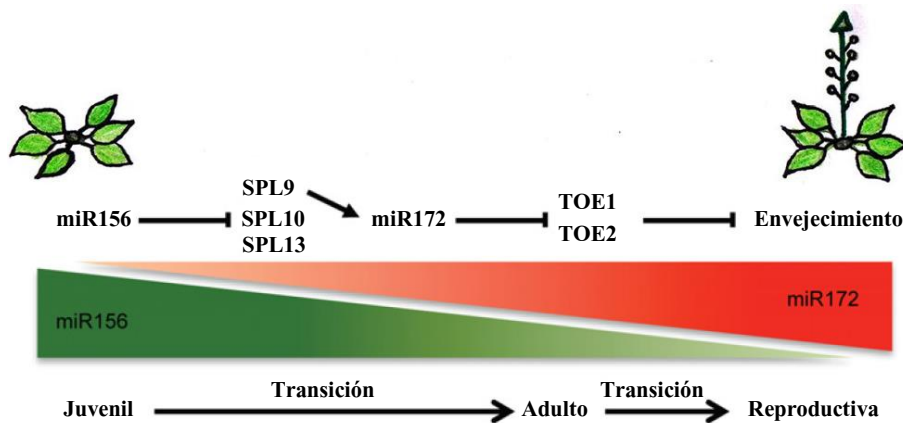


Figura 3. miR156 y miR172 actúan en la transición de la fase juvenil a la adulta y la fase vegetativa a la reproductiva en *A. thaliana*. El gradiente mediado por miR156 y miR172 desencadena cambios en el desarrollo de *A. thaliana*. La expresión de miR156 mantiene la etapa juvenil restringiendo la expresión de los factores de transcripción SPLs, los cuales promueven la transición de juvenil a adulto y participan positivamente en el tiempo de floración. SPL9 induce la expresión de *MIR172*, el cual estimula la floración y está involucrado en determinar el meristemo floral a través de regular a los factores de transcripción AP2-like (TOE1, TOE2, etc). Esta imagen tomada y modificada de (Li et al., 2017; Singh et al., 2018).

En 2004, Jones-Rhoades y Bartel describieron por primera vez la participación de miRNAs en estrés. En este estudio, se identificaron miRNAs conservados y se refinó el método computacional para incrementar la sensibilidad de identificar mRNAs blanco. Entre las nuevas familias de miRNAs identificadas se encontraron miR393, miR394, miR395, miR396, miR397, miR398 y miR399 en *A. thaliana* y sus homólogos en arroz (*Oryza sativa*). Así mismo, se identificaron sus mRNAs blanco, aunque algunos de ellos se habían descrito previamente como involucrados en el desarrollo (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). Por ejemplo, miR396 regula a los transcritos de siete genes *Growth Regulating Factors (GRF)* que participan como reguladores positivos durante diferentes procesos de crecimiento de la planta y en respuesta a distintas

formas de estrés (Kim et al., 2003; Rodriguez et al., 2016). miR393 y miR394 regulan transcritos que codifican para las proteínas con Caja F (F-box proteins), las cuales reconocen proteínas blanco específicas para la proteólisis y exponen a la proteína blanco como sustrato para ubiquitinación de SCF E3 ubiquitin ligasa (Vierstra, 2003). Otro transcrito regulado por miR394, de la misma subfamilia de los genes que codifican para proteínas con Caja F, LCR (LEAF CURLING RESPONSIVENESS) está involucrado en el mantenimiento y la identidad del meristemo apical del tallo (Knauer et al., 2013). miR393 tiene cuatro mRNAs blanco relacionados con genes que codifican para proteínas con Caja F, incluyendo a TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1), reconoce proteínas AUX/IAA como blanco para la proteólisis dependiente de auxina (Gray et al., 2001). Adicionalmente, se encontraron otros mRNAs blanco con funciones que parecen estar fuera del circuito regulatorio del programa de desarrollo, estos transcritos codifican para enzimas como lacasa, superóxido dismutasa y ATP sulfurilasa (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). miR397 regula al transcrito de la lacasa (*LAC*), miembro de una familia de enzimas oxidativas involucradas en el proceso de lignificación de la pared celular de plantas (Riva, 2006). miR398 regula a dos transcritos que codifican para la Cu/Zn Superóxido dismutasa, CSD1 y CSD2, éstas enzimas participan en proteger a la célula de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y ambas responden a estrés oxidativo (Kliebenstein et al., 1998). miR395 regula a los transcritos que codifican para ATP sulfurilasa1, 3 y 4 (*APS1*, *APS3* y *APS4*), enzimas encargadas de catalizar el primer paso de asimilación del sulfato inorgánico (Leustek, 2002). Al estudiar los patrones de expresión de miR395 en condiciones limitantes de azufre, se encontró un aumento en la acumulación de miR395 conforme disminuía la concentración de sulfato (SO_4^{2-}) en el medio de crecimiento de *A. thaliana*, y éste incremento de miR395 correlaciona inversamente con la disminución de la acumulación de su mRNA blanco, *APS1* (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). Posteriormente, Sunkar y Zhu clonaron miRNAs provenientes de bibliotecas de RNAs pequeños de plántulas de *A. thaliana* expuestas a distintos estreses abióticos. Entre los miRNAs identificados destaca miR393, el cual aumenta su acumulación significativamente en los tratamientos de frío, deshidratación, NaCl y ABA. Además, la acumulación de miR397b y miR402 aumenta ligeramente en respuesta a los mismos tratamientos, mientras que miR319c responde solamente al tratamiento por frío (Sunkar and Zhu, 2004).

También se ha descrito la participación de miRNAs involucrados en estrés por limitación de nutrientes. Existen miRNAs que mantienen la homeostasis de fósforo, el cual se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, pero también juega un papel importante en la transferencia de energía, así como en la regulación de reacciones enzimáticas y de vías metabólicas. Por esto, el fósforo es frecuentemente un nutriente limitante para el crecimiento de

las plantas. miR399 regula al transcrito del gen *PHO2*, el cual codifica para una enzima E2 ubiquitina-conjugasa que funciona como regulador negativo para la absorción, la translocación y el transporte del fosfato durante condiciones óptimas de crecimiento (Chiou et al., 2006). Particularmente, *PHO2* contiene al menos cinco sitios complementarios a miR399 en la región 5'UTR localizados entre 200 - 400 nt curso arriba del codón de inicio de la proteína, aunque el segundo y el tercer sitio parece ser los sitios predominantes al corte inducido por miR399 en *PHO2* (Allen et al., 2005). Bajo condiciones limitantes de fosfato, miR399 aumenta su acumulación en hojas y se ha comprobado mediante análisis de injertos entre la parte aérea y la raíz que miR399 es transportado a lo largo del floema y posteriormente, relocalizado en la raíz donde inhibe al transcrito *PHO2*, así miR399 actúa como molécula señal y permite la translocación del fosfato de las raíces a la parte aérea (Pant et al., 2008). Esto correlaciona con el fenotipo observado de la mutante sobreexpresora de miR399 donde la cantidad de fosfato en las hojas aumenta de cinco a seis veces con respecto al tipo silvestre en condiciones óptimas de crecimiento y muestra un fenotipo similar a la mutante *pho2* (Bari et al., 2006; Chiou et al., 2006). Interesantemente, un RNA no codificante llamado *INDUCED BY PHOSPHATE STARVATION 1 (IPS1)* regula la acción de miR399. Una característica de este RNA no codificante es que tiene una secuencia altamente conservada de 24 nt que es casi perfectamente complementaria a la secuencia de miR399, sólo las bases 10 y 11 del miRNA se encuentran desapareadas con 4 base del transcrito de *IPS1* en el mismo sitio generando una pequeña burbuja, lo cual impide el corte inducido por el miRNA. miR399 e *IPS1* aumentan su acumulación en limitación de fosfato, por lo que *IPS1* estaría actuando como un pseudo-blanco y titulando la actividad de miR399 sobre su mRNA blanco, *PHO2*. Particularmente, a este mecanismo se ha denominado “*mimetismo*” y está involucrado en la modulación fina de la actividad de miR399 durante la respuesta a la limitación de fosfato (Franco-Zorrilla et al., 2007). Análisis bioinformáticos indicaron que algunos transcritos de genes anotados o RNAs que no codifican para proteína pueden servir como mimetizadores moleculares endógenos para regular la actividad de algunos miRNAs (Wu et al., 2013a). Asimismo, se ha empleado la metodología de *Short tandem target mimic (STTM)* para el análisis funcional de ciertos miRNAs o miRNAs que pertenecen a una misma familia. El STTM consiste en generar un transcrito que contiene dos secuencias cortas con los sitios de unión para el miRNA, donde cada sitio de unión presenta desapareamiento en la posición de corte (entre la posición 10 y 11 del miRNA), como resultado, el STTM secuestra al miRNA impidiendo el corte y promoviendo la degradación del miRNA (Yan et al., 2012a). Por otro lado, existen otros miRNAs que también participan en la homeostasis de fosfato, miR827 regula al transcrito de *NITROGEN LIMITATION ADAPTATION (NLA)*, una E3 ubiquitin-ligasa tipo RING

que interactúa con el transportador de fosfato PHOSPHATE TRANSPORTER1 (PHT1) que se localiza en la membrana plasmática (PM). En concentraciones adecuadas de fosfato, la interacción entre NLA y PHT1 en la PM conlleva directamente a la ubiquitinación de PHT1, lo cual desencadena la degradación de PHT1 a través de la endocitosis mediada por clatrina en la vacuola (Lin et al., 2013). En limitación de fosfato, miR827 aumenta su acumulación e inhibe la expresión de *NLA*, promoviendo la absorción del nutriente a través de PHT1 (Kant et al., 2011; Lin et al., 2013). miR778 es otro miRNA involucrado en la homeostasis de fosfato, éste se induce durante condiciones de limitación de fosfato y regula al transcrito del gen *Su(var) 3-9 homologs 6* (*SUVH6*) que codifica para una metiltransferasa de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9). La sobreexpresión de miR778 (*35S::miR778*) reduce la expresión de *SUVH6*, pero incrementa la acumulación de miR399 y los transportadores de fosfato, lo que conduce a la acumulación de fosfato en las hojas. En contraste, una disminución de los niveles de expresión de miR778, utilizando la tecnología STTM contra miR778 (*35S::MIM778*) que actúa como esponja o secuestrador del miR778, causa un fenotipo opuesto a la sobreexpresión de miR778 (Wang et al., 2015). Estos resultados sugieren una interacción entre miRNAs y componentes epigenéticos, que proporcionan un nivel adicional a la regulación de la homeostasis de fosfato en plantas.

El cobre es un micronutriente esencial para la fotosíntesis, la respuesta oxidativa y otros procesos fisiológicos (Pilon et al., 2006). Se han descrito al menos tres miRNAs que regulan a mRNAs blanco que codifican para proteínas que utilizan cobre. Entre ellos, miR398 regula al mRNA de las proteínas CSD1 y CSD2, miR408 regula a mRNAs blanco que codifican para Plastocianina, Cupredoxina, Uclacianina 2 (*UCC2*) y lacasa 3 (*LAC3*); mientras que miR397 regula a lacasa 4 (*LAC4*) (Abdel-Ghany and Pilon, 2008; Ma et al., 2015; Sunkar et al., 2006). SPL7 participa en activar e inducir la expresión de miR398, miR408 y miR397 durante la deficiencia de cobre y con ello, la disminución de tanto de sus mRNAs blanco como de sus proteínas, mencionadas previamente. Como resultado, el cobre limitante queda disponible para otras proteínas como las Plastocianinas (PC), proteínas esenciales para la fotosíntesis (Yamasaki et al., 2009). En cambio, la alteración de los miRNAs que participan en la respuesta a cobre frecuentemente afecta la respuesta de las plantas a diferentes estreses (Abdel-Ghany and Pilon, 2008). Por ejemplo, las plantas mutantes de *A. thaliana* que expresan *CSD2* con cambios en el sitio de unión del miR398 y es resistente al corte inducido por el miRNA, muestran un fenotipo con mayor tolerancia a la alta intensidad de luz, metales pesados, frío y otros estreses, pero hipersensible a estrés por calor (Guan et al., 2013; Sunkar et al., 2006). La mutante sobreexpresora de miR408 resulta en una mayor tolerancia a estrés salino, frío y estrés oxidativo, pero en la hipersensibilidad a sequía y a estrés osmótico. En este estudio, se observó que la

capacidad antioxidante celular aumentó en plantas que presentan una elevada expresión de miR408, por lo tanto, se obtuvieron niveles menores de especies reactivas de oxígeno y esto correlacionó con el aumento de la acumulación de los transcritos de genes asociados a funciones antioxidantes para mantener el estado redox como *CSD1*, *CSD2*, glutatión S-transferasa (*GSTU25*), así como genes auxiliares en la respuesta a estrés como la chaperona de cobre *CCS1* y el gen *SAP12*. En conjunto, demostraron una participación de miR408 en respuesta a estrés abiótico (Ma et al., 2015).

Además, se ha demostrado mediante análisis funcional que algunos miRNAs son importantes para la adaptación ante cierto estrés como la sequía. Por ejemplo, los miembros de la familia *MIR169* participan en regular el transcrito que codifica para el factor de transcripción (TF) *NFYA5* en *A. thaliana* (Li et al., 2008). Bajo condiciones de sequía, miR169a y miR169c disminuyen su acumulación para permitir la acumulación del transcrito *NFYA5*, dependiente de la vía de ABA. El análisis de expresión mostró un aumento en la actividad del promotor de *NFYA5* (*NFYA5p:GUS*) con β -glucuronidasa en el tejido vascular y en las células guarda. La mutante sobreexpresora de miR169a o de pérdida de función de *nfy5* incrementa la apertura de los estomas y presenta una mayor pérdida de agua, ambas mutantes con fenotipos de hipersensibilidad a sequía; mientras que la sobre-expresión de *NFYA5* disminuye la apertura de los estomas y reduce la pérdida de agua, como resultado se obtiene un fenotipo resistente a la sequía en comparación con el tipo silvestre (Li et al., 2008). En contraste, se ha descrito un grupo de miRNAs que aumentan su acumulación en respuesta a sequía. La sobreexpresión de estos miRNAs aumenta la resistencia a sequía, probablemente el efecto puede ser causado por cambios en el desarrollo o en el estado redox relacionado con la represión de su mRNA blanco, como es el caso de miR396 (GRFs), miR394 (LCR), miR164 (NACs, TF's que modulan procesos durante el desarrollo), miR408 (Plantacianina) y miR2118 (TIR-NBS-LRR, familia de receptores asociados a la respuesta de defensa ante patógenos) (Chen et al., 2015; Fang et al., 2014; Hajyzadeh et al., 2015; Song et al., 2013; Wu et al., 2015). Otro ejemplo es el de miR159 en *A. thaliana* que aumenta su acumulación en respuesta a tratamiento de ABA exógeno o sequía durante la germinación de la semilla (Reyes and Chua, 2007). miR159 regula la expresión de los transcritos *MYB33* y *MYB101*, ambos codifican para factores de transcripción que actúan como reguladores positivos en respuesta a ABA. La sobreexpresión de miR159 reprime la expresión de *MYB33* y *MYB101* en plantas transgénicas de *A. thaliana*, las cuales presentan hiposensibilidad a ABA. En cambio, plantas sobreexpresoras de *MYB33* y *MYB101*, en su versión resistente al corte y a la regulación por miR159, presentan hipersensibilidad a ABA, facilitando la dormancia de la semilla bajo condiciones estresantes. Por lo tanto, los mRNAs blanco de miR159

podrían tener un papel crucial en asegurar la dormancia de la semilla durante condiciones estresantes como ABA exógeno o sequía (Reyes and Chua, 2007). Recientemente, los análisis de microarreglos y de secuenciación masiva han mostrado que existen distintos miRNAs cuyos niveles de acumulación se regulan por condiciones de déficit hídrico en distintas plantas; sin embargo, a la fecha se sabe poco sobre su función en respuesta al estrés (Covarrubias and Reyes, 2010; Ding et al., 2013; Noman et al., 2017).

Como se describió con anterioridad, la gran mayoría de los estudios referentes a la regulación de miRNA se han realizado en *A. thaliana*, la planta modelo de estudio por excelencia que ha permitido identificar miRNAs y sus mRNAs blanco involucrados en desarrollo y en respuesta a estrés, así como factores que participan en la biogénesis a través de mutantes en dicha planta. Sin embargo, para tener una mayor comprensión de la regulación de los miRNAs en otras plantas, es importante expandir nuestro estudio en plantas de interés agronómico como lo es frijol, una leguminosa que posee diferentes estrategias adaptativas a las seleccionadas en *A. thaliana*, y es de nuestro interés explorar la participación de los miRNAs en la regulación genética, así como las respuestas que sean específicas de leguminosas.

V. ANTECEDENTES

Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae) son la tercera familia de plantas superiores con mayor número de especies con alrededor de 20,000 especies (Gepts et al., 2005). La familia de las leguminosas mantiene una distribución cosmopolita, representando un importante constituyente ecológico y en el uso de sistemas agrícolas. La habilidad de la mayoría de las especies de leguminosas de fijar nitrógeno a través de la simbiosis con rizobias es quizás una de las características mejor conocidas para esta familia (Azani et al., 2017). La bacteria convierte el nitrógeno atmosférico en amonio por la enzima nitrogenasa, en órganos simbióticos especializados de la raíz llamados nódulos. El nitrógeno fijado es cedido a la planta huésped para utilizarlo en la síntesis de compuestos esenciales como aminoácidos, ácidos nucleicos, entre otros (Dos Santos et al., 2012). En general, la familia de las leguminosas es excepcionalmente diversa en morfología, fisiología y en términos ecológicos, la cual representa uno de los ejemplos más interesantes en aspectos evolutivos y de diversificación en plantas (Azani et al., 2017). Sin embargo, no todas las leguminosas forman asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno (Griesmann et al., 2018).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa de interés agrícola por ser una de las semillas alimenticias importantes en Latinoamérica que aporta un alto contenido de proteínas en la dieta del consumo humano. Esta planta se ha utilizado como modelo en el laboratorio Consorcio de la Dra. Alejandra A. Covarrubias y del Dr. José Luis Reyes para estudiar la respuesta al déficit hídrico. Nuestro laboratorio está interesado en conocer los mecanismos desarrollados por el frijol para contender ante el déficit hídrico por limitación de agua. Además, el frijol es una leguminosa que se caracteriza por haber tenido un proceso de domesticación. Por esta razón, pensamos que el frijol pudiera tener respuestas específicas de leguminosas que creemos que es importante explorar. Esto nos permitirá conocer nuevas estrategias que las plantas utilizan para contender ante la escasez de agua y con ello la participación de ciertos miRNAs.

En nuestro laboratorio se llevó a cabo la identificación de miRNAs en frijol mediante la construcción de bibliotecas de RNA pequeños (Arenas-Huertero et al., 2009). Con ello, la identificación de un nuevo miRNA, llamado miR2119, se aisló a partir de una biblioteca de RNAs pequeños de hoja adulta de plantas de frijol sometidas a la condición de sequía. Para este nuevo RNA pequeño, se exploró en diferentes tejidos de frijol y otras especies de leguminosas la presencia de miR2119, la cual se detectó mediante Northern blot (Arenas-Huertero et al., 2009) (Figura 4). Además, se reportó en trabajos independientes la identificación de miR2119 utilizando

tecnología de secuenciación de siguiente generación en soya y *Medicago truncatula* (Jagadeeswaran et al., 2009; Lelandais-Briere et al., 2009).

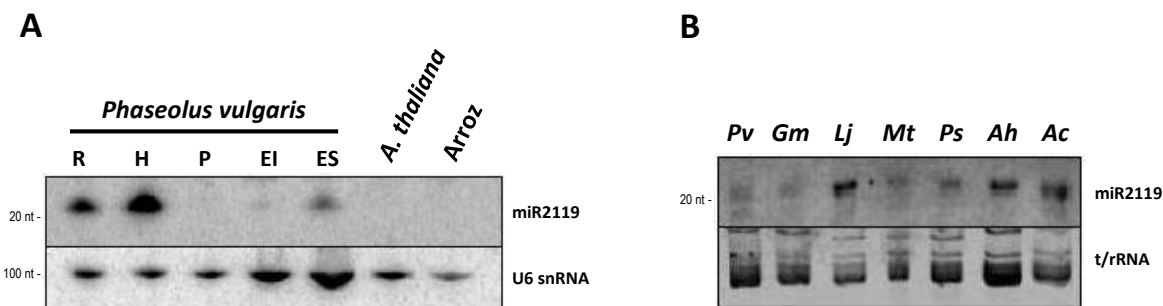


Figura 4. Detección de la expresión de miR2119 en diferentes leguminosas. **A)** Análisis de Northern blot para miR2119 en diferentes tejidos de *Phaseolus vulgaris*. Se corrió RNA total (10 µg) de diferentes muestras de frijol como raíz (R), hoja (H), plántulas (P), embrión inmaduro (EI), embrión seco (ES), y también muestras de hojas de *A. thaliana* y plántulas de arroz. Se utilizó el transcrito de U6 snRNA como control de carga para la señal de miR2119 (De la Rosa, 2012). **B)** Análisis tipo Northern blot para miR2119 en diferentes especies de leguminosas. El RNA total (10 µg) de cada muestra se extrajo de plántulas para cada especie. *Phaseolus vulgaris* (Pv); *Glycine max* (Gm); *Lotus japonicus* (Lj); *Medicago truncatula* (Mt); *Pisum sativum* (Ps); *Arachis hypogaea* (Ah); *Acacia cochliacantha* (Ac). Se tomó como referencia del cargado de las muestras a los tRNA y rRNAs (Arenas-Huertero et al., 2009).

Para estudiar la distribución de miR2119 y explorar su presencia en otras leguminosas, se tomó como referencia la secuencia madura del miR2119 ó secuencia precursora de miR2119 de *P. vulgaris*, se utilizó el programa BLAST de la base de datos de NCBI para explorar en diferentes secuencias como EST (*Expressed Sequence Tag*) y mRNAs, así como las secuencias genómicas de *G. max* y *M. truncatula* disponibles en la base de datos de Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). Se identificó la presencia de miR2119, así como su secuencia precursora en diferentes leguminosas. Para cada secuencia que contenían a miR2119 fueron sujetas a predicción *in silico* por plegamiento de RNA de estructura secundaria del precursor de miRNA mediante el programa Mfold (www.unafold.rna.albany.edu). Entre estas secuencias se incluyó a la secuencia de miR2119 reportada previamente en *G. max* y *M. truncatula* en miRBase, ver. 21.0 (Arenas-Huertero et al., 2009). Sin embargo, no pudimos encontrar evidencia de alguna secuencia relacionada a miR2119 en especies fuera de la familia de las leguminosas (Fabáceas), lo cual sugiere que miR2119 es un miRNA específico de esta familia vegetal. Esto es consistente

con el análisis mediante Northern blot donde se detectó la señal y la presencia de miR2119 en las mismas especies de leguminosas (*G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula*, *P. sativum* y *A. hypogaea*); pero ausente la acumulación de miR2119 en *A. thaliana* y *O. sativa*, ambas especies distantes a leguminosas (Arenas-Huertero et al., 2009). Adicionalmente, en la base de datos de NCBI se encontraron secuencias de EST's similares a miR2119 en otras leguminosas como *Phaseolus acutifolius*, *Vigna radiata*, *A. hypogaea* y *Trifolium pratense*, lo cual nos permitió observar y comparar la secuencia madura de miR2119 en diferentes especies de leguminosas, manteniendo la conservación de la secuencia principalmente en el extremo 5' (posición 1-10 nt), incluyendo la región semilla (posición 2-8 nt) y con algunos cambios hacia el extremo 3', sugiriendo una presión selectiva por mantener la identidad y conservación de la función de miR2119 en leguminosas (Figura 5A).

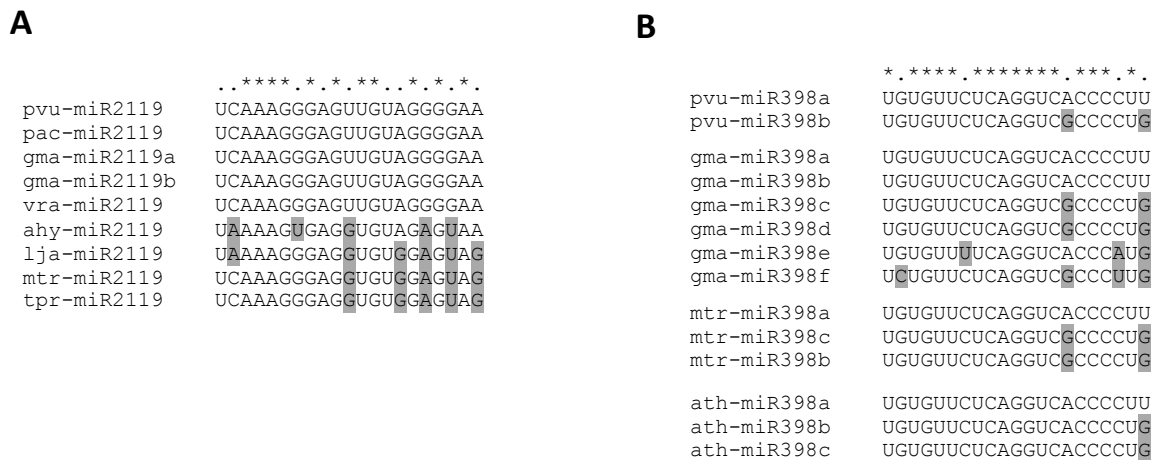


Figura 5. Conservación y alineamiento de la secuencia madura de miR2119 y miR398 en distintas especies. A) Alineamiento mediante Clustal W de las secuencias maduras de miR2119 en diferentes especies de leguminosas: *Phaseolus vulgaris* (pvu); *Phaseolus acutifolius* (pac); *Glycine max* (gma); *Vigna radiata* (vra); *Arachis hypogaea* (ahy); *Lotus japonicus* (lja); *Medicago truncatula* (mtr); *Trifolium pratense* (tpr). **B)** Alineamiento de los miembros de familia de miR398 pertenecientes a los genomas de *P. vulgaris* (pvu), *G. max* (gma), *M. truncatula* (mtr) y *Arabidopsis thaliana* (ath). En los alineamientos se representa la identidad, el cambio y la diferencia de las bases con un asterisco, un punto y resaltado en gris, respectivamente, en comparación con la secuencia de *P. vulgaris* (De la Rosa, 2012).

Durante la caracterización del locus de *MIR2119* se mapeó la secuencia de EST del precursor de miR2119 en el genoma de *P. vulgaris* disponible en Phytozome. Sorpresivamente,

se identificó otro precursor de miRNA río arriba de la secuencia precursora de miR2119, un miRNA miembro de la familia de miR398 (miRNA conservado en plantas vasculares). La distancia entre la base de un precursor al otro es de 160 nt, lo cual sugirió que ambos precursores de miRNAs pudieran co-transcribirse como parte de un transcrito dicistrónico. Con base en lo anterior, se exploró y se encontraron EST adicionales de miR2119 que también incluían la secuencia de miR398 en *P. acutifolius*, *V. radiata*, *G. max*, *M. truncatula* y *L. japonicus* (Figura 6).

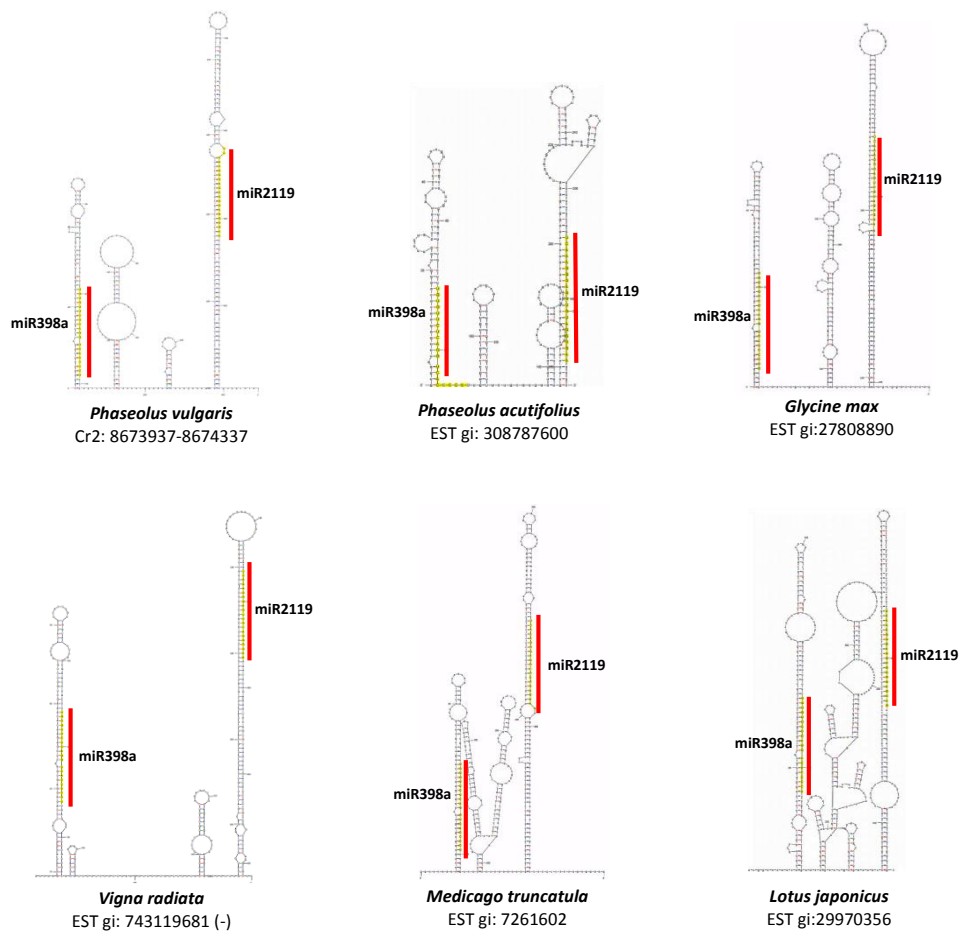


Figura 6. Estructura secundaria de los precursores *MIR398a-MIR2119* en leguminosas. La secuencia de cada precursor contiene de miR398a y miR2119, y fue obtenida en la base de datos de NCBI que incluye a los EST's de *P. acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *L. japonicus* y *V. radiata*. La secuencia de EST indica el número de acceso en NCBI, el signo de "-" indica la orientación opuesta de la cadena; "Cr:" indica el cromosoma y la posición en que se encuentra el precursor dicistrónico de *P. vulgaris* en Phytozome. El plegamiento de las estructuras secundarias de cada precursor fue obtenido utilizando el programa de predicción Mfold (www.unafold.rna.albany.edu).

Existen anotados dos loci para *MIR398* en el genoma de *G. max* localizados en el cromosoma 1 y 2 con la misma secuencia de miRNA maduro, gma-miR398a y gma-miR398b, respectivamente (miRBase, ver. 21.0). El análisis correspondiente en estos dos loci *MIR398*, reveló la presencia del precursor de miR2119 río abajo de los dos precursores de miR398, con la misma identidad en la secuencia madura de miR2119, los cuales fueron denominados gma-miR2119a y gma-miR2119b, respectivamente. Además, se encontraron cuatro loci adicionales que codifican para miR398 (Figura 5B), de los cuales ninguno estuvo relacionado con la secuencia de miR2119, otro precursor o RNA pequeño aledaño. Los cuatro loci adicionales fueron localizados en el cromosoma 8 (*MIR398c*, miRBase ver. 21.0), cromosoma 2 (*MIR398d*), cromosoma 14 (*MIR398e*) y cromosoma 15 (*MIR398f*). Asimismo, el genoma de *M. truncatula* codifica para tres loci de *MIR398* (miRBase, ver. 21.0). El locus *MIR398a* está ligado a *MIR2119* y se encuentra en el cromosoma 5; mientras que los loci *MIR398b* y *MIR398c* fueron localizados en el cromosoma 5 y 7, respectivamente, de los cuales no se encontró ningún posible miRNA conocido en su proximidad. En el genoma de *P. vulgaris*, hay dos loci que codifican para miR398, uno localizado en el cromosoma 2, donde se co-transcribe junto con miR2119 (Figura 7A), y otro locus localizado en el cromosoma 8, donde se transcribe de manera independiente (Phvul.008G202400, Figura 7B), los cuales fueron designados como pvu-miR398a y pvu-miR398b, respectivamente. En contraste, en *A. thaliana* existen tres regiones en el genoma que codifican para precursores de miR398a, miR398b y miR398c, con alto grado de conservación (Figura 5B), sin embargo, no se encontró la presencia del precursor de miR2119 o secuencia similar, excepto por la cercanía de *MIR398b* y *MIR398c*, los cuales están separados uno del otro por 3.5 kb en el cromosoma 5. Por lo tanto, nuestro análisis de secuencia sugiere que existen dos tipos de locus que contiene miR398, uno donde el transcrito contiene a dos precursores donde *MIR398* está seguido de *MIR2119*, y otro donde *MIR398* permanece como unidad transcripcional independiente y es similar a los loci encontrados en especies fuera de las leguminosas.

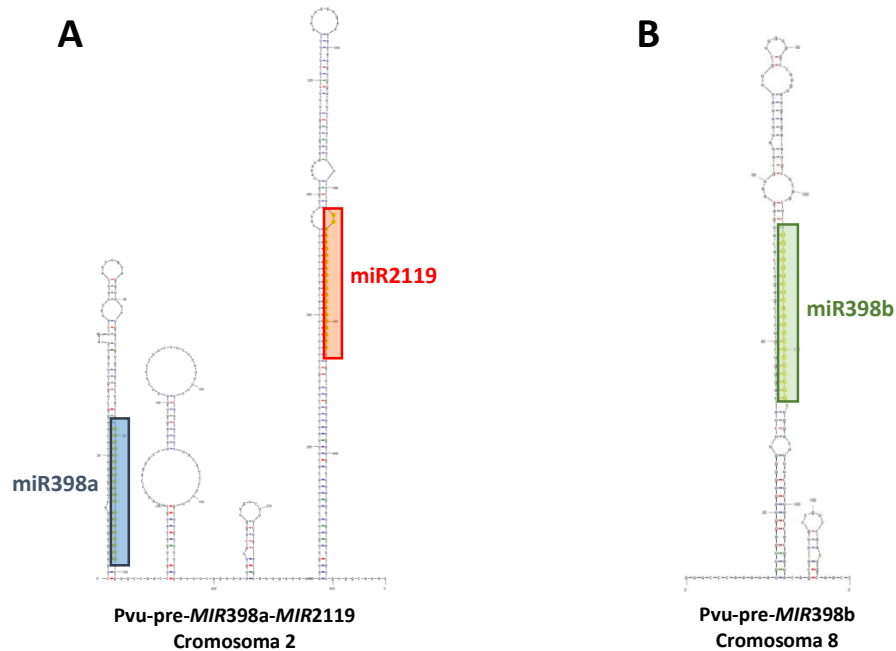


Figura 7. Predicción de estructura secundaria de las dos copias de *MIR398* identificadas en *P. vulgaris*. Estructuras secundarias determinadas con el programa mFold de **A)** precursor dicistrónico pre-*MIR398a-MIR2119* localizado en el cromosoma 2 (pos. 8673937-8674337) y **B)** precursor pre-*MIR398b*, unidad transcripcional independiente localizado en el cromosoma 8 (No. de identificador en phytozome, Phvul.008G202400). La posición de los miRNAs maduros está indicada con los rectángulos de color azul, rojo y verde para miR398a, miR2119 y miR398b, respectivamente.

Parte del estudio biológico de la función de los miRNAs reside en saber cuáles transcritos son regulados a nivel post-transcripcional, para esto se han desarrollado diferentes estrategias como predicciones bioinformáticas y validación experimental. Durante el estudio de miR398 en distintas especies como *A. thaliana*, *O. sativa*, *M. truncatula* y *P. vulgaris*, se identificaron al menos cinco mRNAs blanco para miR398 (Beauclair et al., 2010; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Naya et al., 2014; Trindade et al., 2010). Inicialmente, se identificaron dos transcritos que codifican para Cu/Zn Superóxido Dismutasa 1 y 2 (CSD1 y CSD2) localizadas en el citosol y el cloroplasto, respectivamente. Ambos transcritos fueron confirmados experimentalmente mediante 5' RACE (*5' Rapid Amplification of cDNAs End*) como mRNAs blanco de miR398 en *A. thaliana* y *O. sativa* (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). Además, miR398 también regula a la proteína *Copper Chaperone for Superoxide Dismutase 1* (CCS1), la chaperona que cede el cobre a CSD1 y a CSD2, y otro transcrito que también regula miR398 es COX5b-1 que codifica para una subunidad de la Citocromo C oxidasa mitocondrial, también validado experimentalmente (Beauclair et al., 2010; Jones-Rhoades and Bartel, 2004). Por último, en un análisis de

degradoma o PARE (por sus siglas en inglés, *Parallel Analysis of RNA Ends*), una versión modificada de 5'RACE utilizando secuenciación de siguiente generación, se identificó el transcrito de MtN19-like protein (*M. truncatula Nodulin 19*) como mRNA blanco de miR398 en soya, mientras que el transcrito *Nod19* fue confirmado experimentalmente mediante 5'RACE en *P. vulgaris* (Naya et al., 2014).

Durante la etapa de maestría, realicé el experimento de 5'RACE para *CSD1* en *P. vulgaris*, utilizando RNA obtenido de hojas sometidas a tratamiento de sequía. Se identificó el sitio de apareamiento entre miR398 con *CSD1*, ubicado en la región del 5'-UTR del transcrito. Se validó experimentalmente y se mapeó el sitio de corte en el mRNA de *CSD1* mediado por miR398. Esto se logró, a través de secuenciar el producto de PCR obtenido de 5'RACE clonado en el vector de 7 colonias diferentes, donde sólo 5 secuencias obtenidas de éstas colonias mapean con el sitio de corte predicho (Figura 8). Los resultados obtenidos confirman que el mRNA blanco de miR398 es la *CSD1* en *P. vulgaris* (De la Rosa, 2012).

Pvu-*CSD1* (Cu/Zn Superoxido Dismutasa 1)

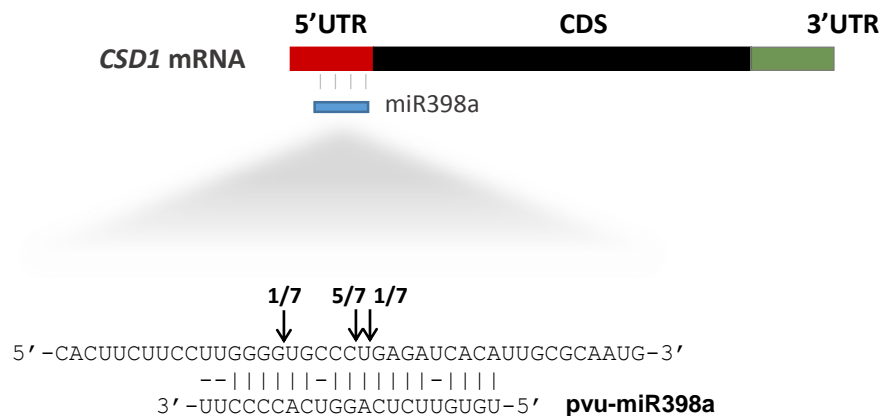


Figura 8. *CSD1* es el mRNA blanco de miR398 en *P. vulgaris*. Diagrama de la parte superior muestra la estructura del transcrito de *CSD1* y el sitio de reconocimiento de miR398a. Se indican los sitios 5'-UTR y 3'-UTR en rojo y verde, respectivamente, y CDS (por sus siglas en inglés, coding sequence) en negro. Diagrama de la parte inferior muestra la validación de *CSD1* mediante 5'RACE. Productos de PCR del 5'RACE fueron clonados y secuenciados de manera independiente. La secuencia obtenida de cada clona fue mapeada al sitio de apareamiento y el sitio del corte es indicado con una flecha. El apareamiento de bases es representado por "|" y despareamiento es indicado con "-".

Adicionalmente, con la finalidad de explorar la función de miR2119, se planteó la identificación de mRNAs blanco utilizando herramientas bioinformáticas mediante los programas miRanda y WMD3. Previamente, el algoritmo miRanda se desarrolló para identificar mRNAs blanco en animales (John et al., 2004). Durante la predicción de mRNA blancos con miRanda, algunos de los parámetros fueron modificados y se le dió mayor peso e importancia a la complementariedad casi perfecta en la región semilla (2-8 nt) entre el miRNA con su mRNA blanco. La colección de secuencias utilizada fue tomada de los EST's del grupo de las Fabaceas disponible en la base de datos de NCBI del 2008. Se generó una lista de resultados (Tabla 1) con los posibles mRNAs blanco donde el mejor candidato fue el transcrito que codifica para la enzima Alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) (Arenas-Huertero et al., 2009).

Tabla 1. Predicción de mRNA blancos para Pvu-miR2119 mediante el programa miRanda

microRNA	* EST (gi)	** Apareamiento mRNA:miRNA	ΔG	Descripción del EST
Pvu-miR2119	170753931	- : -	-31.9	ADH1
	171648484	:-	-31.2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa
	171648483	:-	-31.2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa
	171608126	-: -	-31.0	C2-H2 zinc finger protein [G. max]
	171608123	-: -	-31.0	C2-H2 zinc finger protein [G. max]
	171638482	- : -	-29.9	subtilisin-like protease[A.hypogaea]
	171588015	:- - :	-28.5	hypothetical protein [T. pratense]
	171525368	:- - :	-28.5	hypothetical protein [T. pratense]

* corresponde al número de acceso en la base de datos de NCBI. ** Apareamiento de bases Watson-Crick es indicado por "|", wooble (G:U) por ":" y desapareamiento por "-" (Arenas-Huertero et al., 2009).

Aunado a esto, también se implementó otro programa llamado WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). WMD3 cuenta con una colección de múltiples secuencias de EST's y transcritos de diferentes plantas que se utilizan como herramienta para diseñar y crear miRNA artificiales (amiRNAs), y por otro lado, identificar mRNAs blanco de miRNAs. Para la predicción de mRNAs blanco, el algoritmo busca apareamiento extenso (del nucleótido 2 al 12, tomando como referencia el extremo 5' del miRNA maduro) entre el miRNA y el mRNA blanco, permitiendo al menos un desapareamiento. Otro parámetro importante, es el sitio de corte predicho entre la base 10 y 11 de miRNA complementario al transcrito. La región 3' (los nucleótidos del 13 al 21) tolera al menos cuatro desapareamientos, pero no más de dos desapareamientos consecutivos. Se tomaron las secuencias de miR2119 de cada especie de leguminosa y por separado, se realizó la predicción para los posibles mRNAs blanco para miR2119, para aquellas especies con transcritos almacenados en WMD3. Este análisis mostró

que el mejor candidato para ser regulado por miR2119 fue nuevamente el transcrito de la ADH1 en las leguminosas como *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *A. hypogaea* y *L. japonicus* (Figura 9). Al comparar miR2119 entre las diferentes leguminosas, se observaron diferentes cambios hacia el extremo 3' (Figura 5A), con respecto a la secuencia de *P. vulgaris*. Sin embargo, a pesar de que miR2119 presenta varios cambios entre diferentes especies, existen cambios compensatorios en el transcrito de ADH1 que permiten mantener el apareamiento con miR2119 en al menos seis diferentes leguminosas (Figura 9).

PUT-181a-24834 (ADH1)	5' AUCCUCUUAACUCCUUUGC 3'	Medtr3g125230 (ADH1)	5' AUACUCUUAACUCCUUUGC 3'
	- : -		- :-
pvu-miR2119	3' AAGGGGAUGUUGAGGAAACU 5'	mtr-miR2119	3' GAUGAGUGUGAGGAAACU 5'
PUT-181a-34634 (ADH1)	5' AUCCUCUUAACUCCUUUGC 3'	PUT-171a-10168 (ADH1)	5' AUCCUCUACACCUUUGC 3'
	- : -		- -
pac-miR2119	3' AAGGGGAUGUUGAGGAAACU 5'	ahy-miR2119	3' AAUGAGUGUGAGUAAA 5'
Glyma13g09530 (ADH1)	5' AUCCUCUUAACUCCUUUGC 3'	PUT-171a-37083 (ADH1)	5' AUACUCUACACUCCUUUGC 3'
	- : -		- :
gma-miR2119a/b	3' AAGGGGAUGUUGAGGAAACU 5'	lja-miR2119	3' GAUGAGUGUGAGGAAA 5'

Figura 9. ADH1 es el candidato más probable a ser mRNA blanco de miR2119 en leguminosas. Predicción de mRNA blanco utilizando el programa WMD3. Apareamiento de miR2119 con mRNA blanco en las diferentes leguminosas como pvu: *P. vulgaris*; pac: *P. acutifolius*; gma: *G. max*; mtr: *M. truncatula*; ahy: *A. hypogaea*; lja: *L. japonicus*. La anotación utilizada para el transcrito de ADH1 corresponde a la anotación utilizada en la base de datos de Plant GDB y número de identificador en Phytozome para las especies, *G. max* y *M. truncatula*. En gris se resalta los cambios compensatorios con respecto a las secuencias de *P. vulgaris*. El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-".

Para validar que ADH1 es un mRNA blanco de miR2119, durante la maestría realicé un ensayo de 5'RACE para el transcrito de ADH1. Se obtuvieron productos de PCR del 5'RACE, los cuales se clonaron y se secuenciaron. Las secuencias resultantes se mapearon al transcrito de ADH1 donde las 10 secuencias de cada clona coincidieron con el sitio de corte predicho por miR2119 en el transcrito de ADH1 (Figura 10). Los resultados obtenidos confirmaron que el mRNA blanco de miR2119 es el transcrito que codifica para la enzima ADH1 en *P. vulgaris*. Así, se demostró que un precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119* regula a dos mRNAs blanco diferentes, *CSD1* y *ADH1*.

Pvu-*ADH1* (Alcohol Deshidrogenasa 1)

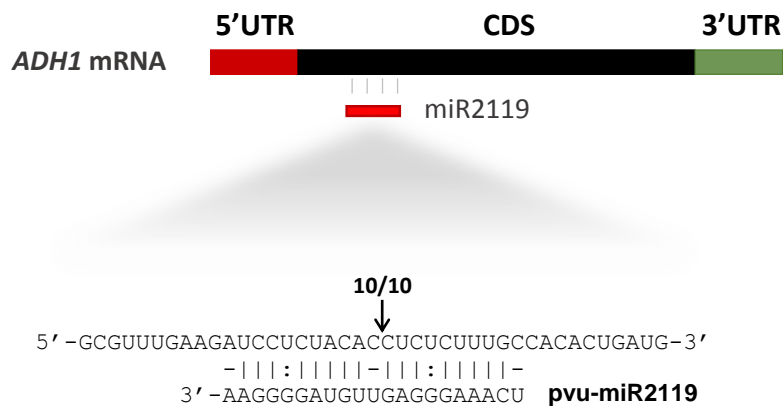


Figura 10. El transcrito de *ADH1* es el mRNA blanco de miR2119. Diagrama de la parte superior muestra la estructura del transcrito de *ADH1* y el sitio de reconocimiento de miR2119. Se indican los sitios 5'-UTR y 3'-UTR en rojo y verde, respectivamente, y CDS en negro. Diagrama de la parte inferior muestra la validación de *ADH1* mediante 5'RACE. Productos de PCR del 5'RACE fueron clonados y secuenciados de manera independiente. La secuencia de cada clona fue mapeada al sitio de corte e indicado con una flecha. El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-".

Con base en trabajo previo durante la maestría, en el proyecto de doctorado se caracterizó la participación de la regulación post-transcripcional de *CSD1* y *ADH1* mediada por miR398 y miR2119 en la respuesta al déficit hídrico en *P. vulgaris*.

VI. HIPÓTESIS

“La regulación coordinada de *CSD1* y *ADH1* a nivel post-transcripcional, mediada por miR398 y miR2119, participa en la respuesta ante el déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*”

VII. OBJETIVOS

- Determinar la participación de miR398 y miR2119 en respuesta a déficit hídrico
- Determinar la participación de *CSD1* y *ADH1* en respuesta a déficit hídrico
- Explorar el efecto en la alteración del equilibrio de miRNAs:mRNAs blanco
- Explorar la regulación de los miRNAs y mRNAs blanco por otras formas de estrés.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.I Crecimiento de plantas y tratamientos aplicados

En nuestro estudio se utilizaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) variedad Negro Jamapa. Se preparó solución para esterilizar semillas con 20 % Hipoclorito de sodio/0.1% de Tween20 en agitación durante 5 min. Después, se lavaron las semillas con H₂O estéril, para eliminar los restos de cloro. Las semillas se colocaron en charolas con toallas de papel húmedas, se cubrieron las charolas con aluminio y se cultivaron en el cuarto de crecimiento de frijol (28 °C) en total oscuridad durante 3 días. Posteriormente, las semillas germinadas se transfirieron a macetas empleando vermiculita como sustrato. Las plantas fueron regadas con solución nutritiva (5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM Fe(EDTA), 0.07 mM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.2 μM Na₂MoO₄, 10 μM NaCl, and 0.01 μM CoCl₂) y crecidas en el invernadero del Instituto de Biotecnología, UNAM campus Morelos, con régimen de luz natural y una temperatura promedio de 25 °C.

Para el tratamiento de déficit hídrico, se crecieron plantas en irrigación óptima durante 28 días y después se le aplicó el tratamiento que se describe a continuación. Primero, se determinó el peso inicial de cada maceta y se calculó la cantidad de agua pérdida por evaporación cada dos días. Las macetas de la condición control fueron restauradas con solución nutritiva al peso del día inicial (día 0) del tratamiento en cada punto. Para las macetas sometidas a déficit hídrico, se le añadió 1/12 de solución nutritiva del peso perdido con referencia a la medición de los dos días previos (Figura S1A). Además, durante el tratamiento se determinó el contenido relativo de agua (CRA) de las hojas (Figura S1B), se tomó como referencia el CRA del folíolo central de cada trifolio de la planta para cada uno de los puntos y se determinó el peso fresco. Después, los folíolos centrales fueron sumergidos en H₂O estéril durante 24 h para calcular el peso turgente. Para obtener el peso seco, los folíolos centrales fueron colocados en pequeños sobres y se incubaron en el horno (80 °C) por 48 h permitiendo la deshidratación total. El CRA se determinó de la siguiente manera: $CRA = [(peso\ fresco - peso\ seco) / (peso\ turgente - peso\ seco)] \times 100$. En cada uno de los puntos a evaluar se tomaron y mezclaron 3 plantas independientes para cada tratamiento. Las muestras de hojas y raíces fueron recolectadas a los 0, 10, 18 y 20 días, congeladas en N₂ líquido y procesadas para extracción de DNA, RNA o proteína. En el caso de las hojas, se utilizó el 3er. trifolio para cada una de las muestras recolectadas en los diferentes puntos del tratamiento, excepto, la muestra inicial (0 día) donde se utilizó el 2do. trifolio.

En el tratamiento de inundación, se germinaron semillas de frijol como se indicó anteriormente. Posteriormente, las plántulas se trasplantaron a macetas con vermiculita de sustrato y se crecieron en irrigación óptima durante 14 días en el invernadero. Posteriormente,

se inició el tratamiento de inundación, en el cual se inundó el sistema radical y parte del tallo donde el nivel del agua se llevó a 1 cm por encima del sustrato de vermiculita contenido en la maceta, esto fue suficiente para simular condición de hipoxia (Kamaluddin and Zwiazek, 2002). Se seleccionó el sistema radicular de 3 plantas independientes para cada tratamiento y se tomaron las muestras a las 0, 24 y 48 h. Las muestras fueron congeladas en N₂ líquido y procesadas para la extracción de RNA y proteína.

VIII.II Extracción de RNA

La obtención de RNA total se realizó usando el protocolo de TRIzol (Invitrogen). Se añadió 1ml de TRIzol a una muestra de tejido vegetal macerado (50-100 mg) en N₂ líquido y se homogenizó utilizando vortex, después se incubó 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añadieron 200 µl de cloroformo por 1ml de TRIzol, se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces y se incubó 2 min a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 12,000 g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa que contiene el RNA se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 0.5 ml de isopropanol para precipitar el RNA durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El RNA precipitado se recuperó, eliminando cuidadosamente el sobrenadante por decantación o pipeteo.

Además, se utilizaron las siguientes dos modificaciones al protocolo original. Para el lavado final de la pastilla de RNA se añadieron 200 µl de 100% etanol y se centrifugó a 12,000 g por 2 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50% formamida. En ocasiones, se puede calentar la muestra a 65°C por 5 min para resuspender y disolver mejor la pastilla e inmediatamente pasar la muestra a hielo.

Para determinar la concentración del RNA se utilizó un Nanodrop y para verificar la integridad del RNA, la muestra se corrió por electroforesis en un gel de agarosa 2 %. El RNA se guardó a -20 °C hasta su uso.

VIII.III Northern blot

Para realizar el Northern blot, se llevó a cabo el protocolo como se describió recientemente (De la Rosa and Reyes, 2019). En breve, las muestras de RNA total (10 µg/carril) se resolvieron por electroforesis en gel de 15 % poliacrilamida/ 8M urea/ 1X TBE a 20 mA durante 2 h. Después, utilizando un aparato de transferencia en semiseco (OWL Scientific), las muestras del RNA del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-N+) por 35 min a 100 mA en Buffer 0.5X TBE. El RNA fue fijado a la membrana con un aparato entrecruzador de

UV (stratalinker UV crosslinker) en dos ocasiones. La membrana se prehibridó con solución Ambion Ultrahyb-Oligo (10 ml para una membrana de 10 x 10cm) al menos 30 min a 42°C con rotación constante. La membrana se hibridó con la sonda de interés marcada con $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$, durante toda la noche a 42 °C con rotación constante. Al día siguiente, la sonda fue retirada y guardada, la membrana fue lavada en dos ocasiones con solución de lavado 2X SSC/ 0.1% SDS por 30 min a 42°C con rotación constante. Después, la membrana se expuso a una pantalla de PhosphorImager y se escaneó en el aparato Typhoon para obtener la imagen del Northern blot. El tiempo de exposición de la membrana dependió de la abundancia del transcrito, del marcaje de la sonda y de la vida media del P^{32} .

Para el marcaje de sonda, el oligonucleótido de interés se fosforiló con $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ en el extremo 5' con la siguiente reacción: 3 a 4 μl de $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ (13 o más pmol de ATP, Perkin-Elmer), 1 μl oligonucleótido (10 pmol), 1 μl de 10X buffer, 1 μl T4 cinasa polinucleótido (PNK, 10 U/ μl , Fermentas), H_2O a un volumen final de 10 μl . La reacción se incubó a 37°C por 1 h. Se purificó el oligonucleótido etiquetado mediante una columna sephadex G25 (Thermo).

VIII.IV Síntesis de DNA complementario (cDNA)

RNA total (1 μg) se trató con DNAsa utilizando 1 μl de 10X Buffer con MgCl_2 (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM de MgCl_2 , 1 mM CaCl_2), 1 μl de DNAsa I (1 U/ μl , Fermentas) más H_2O libre de RNAsas en un volumen final de 10 μl de reacción y se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 1 μl de 50 mM EDTA e incubando a 65 °C por 15 min. Este RNA tratado con DNAsa se utilizó para la síntesis de cDNA que se describe a continuación.

Para realizar la síntesis de cDNA se utilizó el protocolo de la enzima Revert-Aid (Fermentas). Se utilizaron 200 ng de RNA tratado con DNAsa al cual se le añadieron 1 μl de oligonucleótido dT (50 μM) adicionado con H_2O estéril en un volumen de 12 μl y se incubó a 65 °C por 5 min. Después, la muestra se pasó a hielo por 1 min y se le añadieron 4 μl de 5X Buffer first-Strand, 2 μl dNTPs (10mM), 1 μl de inhibidor de RNAsa (RNaseOUT 20 U/ μl , Fermentas) y finalmente, 1 μl de la enzima RT Revert-Aid (200 U/ μl). La reacción con un volumen final de 20 μl se incubó a 42 °C durante 1 h y se detuvo la reacción calentando la muestra a 70 °C por 5 min.

VIII.V PCR cuantitativo (qPCR) para mRNAs y miRNAs

El cDNA utilizado como templado para medir la acumulación de transcritos fue obtenido a partir de RNA total previamente tratado con DNAsa I. Para el caso de los mRNAs blanco, se diseñaron los oligonucleótidos flanqueando el sitio de apareamiento y corte mediado por el miRNA. El ensayo de la curva de desnaturalización (en inglés, *melting curve*) se confirmó la

amplificación de un solo producto para cada transcrito. Además, se procedió a realizar una curva de calibración utilizando diluciones seriales de cDNA, como resultado se espera una regresión lineal que se genera a partir de los resultados de Ct (en inglés, *threshold cycle*) obtenidos para cada uno de los 5 puntos (diluciones seriales de 1:10, 1:100, 1:1000, etc.), obteniendo una eficiencia de la amplificación del par de los oligonucleótidos y un coeficiente de correlación (R^2), que en el mejor de los casos, es cercano a 1. Los resultados de la estandarización de oligonucleótidos para cada mRNA evaluado mediante qPCR se resumen en la Tabla 2 y cada secuencia de oligonucleótido utilizado en este trabajo se encuentra en la Tabla S1.

Tabla 2. Resultados de la estandarización de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qPCR.

Gen	Pendiente (m)	Y-inter	R ²	%Eficiencia
CSD1	-3.114	19.953	0.994	109.464
ADH1.1	-3.318	22.388	0.976	100.156
ADH1.2	-3.302	24.641	0.984	100.834
Actina 11	-3.333	17.809	0.970	
pre-miR398a-2119	-3.433	13.047	0.996	95.568
proc-miR398a-2119	-3.43	18.622	1	95.66
proc-miR398a	-3.369	17.892	0.987	98.084

Por otro lado, para el PCR cuantitativo miRNAs se utilizó el kit de NCode miRNAs First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen). El primer paso fue realizar la poliadenilación de los miRNAs en el extremo 3'. Para esta reacción se mezclaron los siguientes componentes: 500 ng de RNA total, 5 µl de 5X miRNA Reaction Buffer, 2.5 µl de MnCl₂ (25mM), 1 µl ATP diluido 1:25 (0.4mM), 0.5 µl PoliA polimerasa, más H₂O estéril en un volumen final de 25 µl. La reacción de poliadenilación se incubó a 37 °C durante 15 min. Después, se procedió inmediatamente a la obtención de la síntesis de cDNA donde se utilizó el oligonucleótido RT Universal que es complementario a la cola de poliadeninas adicionada en la primera reacción. La reacción de cDNA para miRNAs se preparó a continuación: 4 µl de la reacción de poliadenilación, 1 µl de Annealing Buffer, 3 µl Universal RT primer. Se incubó la reacción cDNA para miRNAs a 65 °C durante 5 min. y después se puso en hielo por 1 min. Después, se añadió lo siguiente a ésta misma reacción: 10 µl de 2X First-strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III RT/RNaseOUT

Enzyme Mix para tener un volumen final de 20 μ l. La reacción de la síntesis de cDNA se incubó a 50°C durante 50 min y después se detuvo la reacción a 85 °C por 5 min. La muestra se pasó a hielo y se almacenó a -20 °C o se procedió directamente a preparar el qPCR.

Una vez obtenida la síntesis de cDNA para evaluar mRNA o miRNA de una condición, se procedió a preparar la reacción de qPCR con la mezcla de The Maxima® SYBR® Green/Flourescein qPCR Master Mix (2X) (Fermentas). Por un lado, para detectar mRNA se añadió a la mezcla de Master Mix (2X), el par de oligonucleótidos (cada uno a 0.04 μ M) que amplifican al transcrito y el cDNA de la condición a evaluar. Por otro lado, para detectar miRNA se añadió a la mezcla de Master Mix (2X), el oligonucleótido (0.04 μ M) de DNA específico para el miRNA, el oligonucleótido Universal qPCR primer que contiene el Kit de NCode y el cDNA (dilución 1:5) de la condición a evaluar. Finalmente, las reacciones y los programas de corrida del qPCR (miRNA o mRNA) fueron realizados en el aparato de Applied Biosystems StepOne Real-time PCR. Estos fueron los detalles de los programas de corrida del qPCR: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58-62 °C por 30 s; 95 °C por 15 s.

Para cada análisis de qPCR realizado, se aplicó estadística mediante una prueba *t-Student* para la acumulación de cada miRNA o mRNA blanco en la muestra del tratamiento (déficit hídrico e inundación) y fue comparada con la acumulación obtenida de la misma muestra de la condición control. Valores de *p-value*: *P < 0.05 **P < 0.01 y ***P < 0.005.

VIII.VI Purificación de DNA genómico

Para extraer DNA genómico de frijol se utilizó el protocolo de extracción rápida de DNA con resina quelante de Chelex 100, el cual consistió en resuspender 10-15 mg de tejido macerado de hojas de frijol en 100-150 μ l de 5 % Chelex 100 (Bio-Rad), el tejido fue mezclado y homogenizado con vortex durante 10 seg y se incubó en baño maria por 5 min. Nuevamente, se utilizó vortex por 10 seg y finalmente, la muestra fue centrifugada a 13,000 rpm por 1 min. Se utilizó de 0.5-2 μ l de sobrenadante como templado de DNA en la reacción de PCR que se describe a continuación.

VIII.VII Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el objetivo de amplificar el producto del gen *MIR398a-MIR2119* se preparó la siguiente reacción de PCR para un volumen de final de 50 μ l: 5 μ l Buffer 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl; pH 8.3), 5 μ l MgCl₂ (25 mM), 1.25 μ l dNTP's (10 mM), 1 μ l de Oligonucleótido CACC-pre398-2119 (25 μ M), 1 μ l de Oligonucleótido pre2119Rev2, 0.25 μ l Taq polimerasa (5U/ μ l) y 1 μ l de DNA extraído por Chelex 100, descrito anteriormente. El programa de PCR fue: 95 °C por 3

min; 35 ciclos de 62 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Al final, extensión de 72 °C por 3 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1.5 %.

VIII.VIII Purificación de fragmentos de DNA a partir de productos de PCR

Una vez corroborada la amplificación del fragmento esperado correspondiente al precursor *MIR398a-MIR2119* en la reacción de PCR, se procedió a purificar el producto de PCR. Para ello, se resolvió la muestra de PCR por electroforesis en un gel de agarosa 1.5 % y se siguió el protocolo de GeneJet Gel extraction kit (Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA fue recolectado, cuantificado en un Nanodrop y se guardó a -20 °C hasta su uso.

VIII.IX Construcciones de vectores

Para sobreexpresar el precursor *MIR398a-MIR2119* se llevó a cabo la clonación del fragmento del PCR y la construcción de vectores a través de la tecnología Gateway (Invitrogen). Los productos purificados de PCR que contienen la secuencia "CACC" en su extremo 5' son incorporados y clonados al vector pENTR-SD/D. Para la construcción de la sobre-expresión de *MIR398a-MIR2119*, el precursor pre-miR398a-miR2119 se obtuvo a partir de la amplificación de un fragmento de 895 nt utilizando DNA genómico de frijol como templado en la reacción de PCR con los oligonucleótidos CACC-pre398-2119 y Pre2119Rev2 (Ver tabla de oligonucleótidos), este fragmento fue purificado, y clonado en el vector pENTR-SD/D con la siguiente reacción: 1 µl PCR purificado de precursor *MIR398a-MIR2119* (10 ng), 1 µl de solución de sales, 1 µl de vector pENTR-SD/D-TOPO adicionado con H₂O estéril en un volumen final de 6 µl. Se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 1 hr. Se tomó 1 µl de la reacción de clonación para transformar bacterias *E. coli* DH5α quimiocompetentes, se dejó incubando 30 min en hielo. Después, las bacterias se congelaron en N₂ líquido por 2 min y se descongelaron a 37 °C por 2 min, esto se repitió en dos ocasiones. Se le añadió 1 ml de medio LB líquido a las bacterias y se recuperaron durante 1 h a 37 °C con agitación constante. Se centrifugaron las bacterias a 14,000 rpm y se eliminó 800 µl de medio LB, el medio LB restante se mezcló la pastilla a través de vortex y se sembraron las bacterias en cajas Petri con medio LB sólido más kanamicina (50 µg/ml). Las bacterias sembradas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las colonias de bacterias fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la clonación del inserto. Se seleccionaron las colonias positivas, se purificó el plásmido y se corroboró la clonación del precursor *MIR398a-MIR2119* en el vector pENTR:pre-miR398a-miR2119 por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt, UNAM.

Posteriormente, la construcción de pENTR:pre-miR398a-miR2119 se utilizó para recombinar con el vector de pBA-DC-TdT (Valdes-Lopez et al., 2008). La reacción de recombinación se mezcló de 50-150 ng pENTR:pre-miR398a-miR2119, 100 ng de pBA-DC-TdT, 1 µl LR clonase II Enzyme Mix y H₂O estéril en un volumen final de 6 µl. Se incubó la reacción de recombinación por 1 h a temperatura ambiente y después se transformó la cepa quimiocompetente de *E. coli* DH5α, el medio LB fue adicionado con espectinomicina (100 µg/ml). El plásmido pBA:pre-miR398a-miR2119-TdT resultante fue verificado por secuenciación.

Para la transformación de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* K599, la cual se incubó con 1 µg de DNA plásmidico pBA:pre-miR398a-miR2119-TdT o de vector vacío (pBA:DC-TdT), se congelaron las células en N₂ líquido por 2 min y después se descongelaron a 37 °C por 5 min. Se recuperaron las bacterias en 1 ml de medio LB líquido y se incubó por 2 h a 28 °C en agitación constante. Se sembraron 100 µl del cultivo de bacterias con espectinomicina (100 µg/ml) y se crecieron a 28 °C por 2 a 3 días. Las colonias resultantes fueron analizadas por PCR de colonia para verificar la incorporación del plásmido.

El vector binario pBA-TdT está diseñado para dirigir la expresión del inserto con el promotor constitutivo de CaMV 35S y el terminador de la nopalina sintetasa (Nos). Además, el vector contiene el gen de selección de bacterias con espectinomicina y el gen que codifica para la proteína roja fluorescente (TdT) que permite monitorear en células vegetales transformadas seleccionando las raíces a través de microscopia de epifluorescencia.

VIII.X Generación de raíces transgénicas, raíces pilosas o *hairy roots*

El método consiste en infiltrar *Agrobacterium rhizogenes*, transformado con la construcción de interés, en plántulas de frijol a través de generar una herida en la zona del cotiledón. Posteriormente, se espera la infección *A. rhizogenes*, la integración y la expresión del T-DNA que induce la transformación y con ello, el crecimiento del callo que desarrollará las raíces transgénicas (Estrada-Navarrete et al., 2007). Brevemente, se germinaron semillas de frijol como se indicó anteriormente, después se inocularon plántulas de frijol de 4-6 días post-germinación con la cepa de *A. rhizogenes* K599. Las plantas fueron crecidas en el cuarto de crecimiento de frijol (28 °C) en condiciones de alta humedad (mayor al 30%), donde se colocaron en charolas cubiertas con domos. Las raíces transformadas fueron verificadas en el microscopio detectando la fluorescencia de la proteína reportera TdT (derivada de DsRed), y recolectadas a los 16 días post-inoculación. Las muestras se congelaron en N₂ líquido para su posterior procesamiento.

VIII.XI 5'RACE

La técnica del 5'RACE (por sus siglas en inglés, *Rapid amplification of cDNA ends*) sirvió para confirmar mRNAs blanco que han sido procesados por miRNAs. Inicialmente, a una muestra de RNA total se realizó la ligación de un oligonucleótido de RNA (Adaptador 5' en Tabla S1) en el extremo 5'. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA (mencionado arriba) y se procedió a realizar reacciones de PCRs anidados, ósea, dos rondas de PCR donde en la primera reacción de PCR, se utiliza como templado cDNA de raíz de plantas adultas de frijol. En la segunda reacción de PCR, se utilizaron diferente par de oligonucleótidos para amplificar nuevamente el mismo transcrito, sólo que ahora, los oligonucleótidos flanquean a una zona más interna, y se utilizó como templado el DNA de la primera reacción de PCR. Los productos de PCR amplificados del 5'RACE fueron clonados en el plásmido pCR2.1 del kit de TOPO-TA (Invitrogen). El fragmento incorporado al plásmido pCR2.1 de cada clona se mandó a secuenciar a la Unidad de secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los oligonucleótidos empleados en esta técnica están indicados en la Tabla S1 y se utilizaron para amplificar el transcrito de *ADH1.2* (Phvul.001G064000).

VIII.XII Extracción de proteínas totales de muestras vegetales y análisis por Western Blot

Para la extracción de proteína total, primero se congeló el tejido en N₂ líquido y se maceró en un mortero hasta convertirlo en polvo fino. El polvo (50-100 mg) se resuspendió en buffer de extracción (100 mM Hepes pH 7.5-8.0, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 50 mM β-glicerofosfato, 10% de glicerol, 7.5% polivinilpolipirrolidona (PVPP), 1 mM PMSF, 10 mM DTT, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml antipain y 5 µg/ml leupeptin) y después se incubó en hielo durante 5 min, se mezcló con vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min, donde la fase acuosa corresponde al extracto de proteína. La concentración de proteína obtenida en cada extracto total fue cuantificada por el ensayo de Bradford. Las muestras fueron resuspendidas en buffer 1X laemmli (31.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 1% SDS, 0.005% azul de bromofenol y 355mM DTT), se incubaron a 95 °C durante 3 min y se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 min. Los extractos de proteína total (40 µg/carril) se separaron en un gel de 12% SDS-PAGE por electroforesis a 30 mA por 2 h. Posteriormente, las proteínas se transfirieron en líquido con el buffer (Tris 25 mM, glicina 0.2 M, metanol 20%) a una membrana de nitrocelulosa (Hybond C⁺, Amersham) a 300 mA por 90 min con el aparato Mini PROTEAN® 3 Cell de Bio-Rad. Se verificó la transferencia de las proteínas a la membrana tiñendo con 0.1% rojo Ponceau (adicionada con 5% de ácido acético) que sirvió de referencia para comparar el contenido del extracto de proteína transferido y cargado en cada carril. Después, se lavó la membrana con buffer 1X PBS (NaCl

0.27M, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 20mM, KH₂PO₃ 3.5mM) y se dejó bloqueando toda la noche con 10 ml de solución 1X PBST (Tween 0.1% adicionada con leche 5%) a 4 °C con agitación constante. Al día siguiente, la membrana se incubó con los anticuerpos de la compañía Agrisera α-ADH (no. de catálogo: AS10 685) y α-SOD (no. de catálogo: AS06 170) por separado, los cuales se añadieron a una dilución de 1:3,000 y 1:2,000, respectivamente, en solución 1X PBST (Tween 0.1% con 5% de leche) y se dejó en agitación constante durante 3 h. Posteriormente, se lavó la membrana con buffer 1X PBST (Tween 0.1%) en tres ocasiones de 5 a 10 min y después, se le añadió el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano con dilución 1:20,000 en buffer 1X PBST (adicionado con 5% leche), en agitación constante durante 1 h. Se lavó la membrana en tres ocasiones con buffer 1X PBST (Tween 0.1%) y se reveló con el kit the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) que contiene los sustratos de la peroxidasa, peróxido y luminol en proporción 1:1. Ambos sustratos se pusieron en contacto con la membrana durante 2 min, para exponerse en un film y por distintos tiempos según fue necesario.

VIII.XIII Análisis bioinformático

Para explorar la distribución de miR2119 en otras leguminosas, se tomó como referencia la secuencia precursora pre-miR398-miR2119 de *P. vulgaris*, para mapear la región donde se posicionan los miRNAs en cada uno de las secuencias de los organismos disponibles en las bases de datos. Para esto, se utilizó el programa BLASTN en las diferentes bases de datos como NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para explorar en diferentes secuencias de EST (*Expressed Sequence Tag*), mRNAs y secuencias genómicas. También, se utilizaron las bases de datos de Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov), Legume Information System (LIS, disponible en <https://legumeinfo.org/>) (Dash et al., 2016) y KnowPulse - pulse crop breeding and genetics (<http://knowpulse.usask.ca/portal/>). Los genomas de leguminosas analizados en la base de datos de NCBI fueron *Phaseolus coccineus*, *Glycine soja*, *Cicer reticulatum*, *Cicer echinospermum*, *Trifolium médium*, *Trifolium subterraneum*, *P. sativum*, *Arachis monticola*, *Nissolia schottii*, *Mimosa púdica* y *Cercis canadensis*. Los genomas disponibles consultados en Phytozome fueron *P. vulgaris*, *G. max*, *M. truncatula* y *T. pratense*. En la base de datos de LIS fueron exploradas las secuencias de los siguientes organismos: *Vigna angularis*, *V. radiata*, *V. unguiculata*, *C. cajan*, *L. japonicus*, *C. arietinum*, *Arachis duranensis*, *Arachis ipaensis*, *Arachis hypogaea* y *Lupinus angustifolius*; así como la secuencia de *L. culinaris* (lenteja) en la base de datos de KnowPulse.

Las secuencias de los genes CSD1 (Phvul.006G09700), CSD2 (Phvul.011G086300), CSS1 (Phvul.003G217000), COX5b (Phvul.010G153300), NOD19 (Phvul.006G127400), ADH1.1

(Phvul.009G134700), ADH1.2 (Phvul.001G064000), ADH1.3 (Phvul.001G06300) y ADH1.4 (Phvul.009G149500); así como la secuencia correspondiente al precursor de *MIR398a-MIR2119* (Cromosoma 2, posición: 9731038 - 9732110) y *MIR398b* (Phvul.008G202400) perteneciente al cultivar G19833 de *P. vulgaris* (Raza de Perú) fueron obtenidas del sitio web de Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). También, se identificaron los genes que codifican para COX5b en las distintas especies como *A. thaliana* (AT3G15640), *M. truncatula* (Medtr4g011340) y *G. max* (Glyma.07G032800) en Phytozome.

La estructura secundaria de RNA fue predicha utilizando el programa mFold (Zuker, 2003), disponible en <http://mfold.rna.albany.edu>. El apareamiento entre miRNA:mRNA blanco fue obtenido mediante el programa RNA Hybrid (Kruger and Rehmsmeier, 2006), en <https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>. El programa Clustal Omega (Clustal-O) fue empleado para el alineamiento de secuencias de nucleótidos, que se encuentra disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Se identificó un árbol filogenético de la familia génica de ADH1 con secuencias pertenecientes a ocho especies de leguminosas y a cinco especies no leguminosas, disponible en la sección de *Gene family and phylogenetic tree* en el sitio web de LIS (Dash et al., 2016). Para ampliar esta información, se obtuvieron todas las secuencias de proteínas de ADH1 disponibles en el sitio LIS (<https://legumeinfo.org/>). Algunas secuencias fueron curadas manualmente para corregir errores de anotación y se descartaron secuencias de ADH1 incompletas (<90% de la secuencia total correspondiente a 380 aa). Las 67 secuencias de proteínas de ADH1 seleccionadas, se alinearon con el programa Muscle V3.8.31. Después, mediante el programa de ProtTest V3.4.2 se realizó un análisis evolutivo del alineamiento donde se determinó que el modelo de sustitución que mejor se ajustó a los datos fue el modelo JTT+G. Se reconstruyó la filogenia con el programa PhyML V3.0 a través del método de Máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML). El árbol filogenético resultante fue visualizado con el programa FigTree V1.4.3.

Para determinar la presencia y conservación del sitio de reconocimiento de miR2119 en la secuencia de ADH1, se utilizó el programa Meme suite 5.0.4 (<http://meme-suite.org>) para obtener la secuencia consenso tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos.

IX. RESULTADOS

CAPÍTULO I

IX.I Identificación y conservación de los mRNAs blanco regulados por miR398 en *P. vulgaris*

Teniendo la disponibilidad del genoma de *P. vulgaris* en la base de datos de Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov), se realizó la identificación de los mRNAs blanco de miR398 que son homólogos en *P. vulgaris* mediante el programa BLASTN y la localización del sitio de unión de miR398 en cada uno de los transcritos mediante el programa de RNA hybrid. En Phytozome, se identificaron los transcritos de *CSD1*, *CSD2*, *CCS1*, *COX5b-1* y *NOD19* de *P. vulgaris* con número de identificador: Phvul.006G09700, Phvul.011G086300, Phvul.003G217000, Phvul.010G153300 y Phvul.006G127400, respectivamente. Los resultados del análisis de secuencia del apareamiento entre miRNA:mRNA blanco muestran que los transcritos de *CSD1* y *CSD2* mantienen conservado el sitio de unión y el apareamiento con miR398 en *P. vulgaris* (Figura 11). Inicialmente, el transcrito de *CCS1* no fue identificado en predicciones computacionales por la presencia de cuatro desapareamientos y un apareamiento wobble (G:U) con miR398 en *A. thaliana*. Sin embargo, en un análisis transcriptómico de plantas mutantes de *A. thaliana* donde se vieron afectados los niveles de acumulación de miR398 encontraron alterados los niveles de acumulación de *CCS1*, al analizar el transcrito de *CCS1* identificaron una región con complementariedad al miRNA, identificándolo como otro mRNA blanco (Beauclair et al., 2010). En *P. vulgaris*, el apareamiento *CCS1*:miR398 es casi idéntico al de *A. thaliana*, sólo existe un desapareamiento adicional entre el mRNA blanco con el miRNA (4U/18C) (Figura 11), sin embargo, no se vió afectado el apareamiento entre *CCS1*:miR398 en la región semilla (2-8 nt del miRNA), lo cual sugiere que el transcrito de *CCS1* conserva el mecanismo de regulación mediado por miR398 en *P. vulgaris*.

CSD1 (Phvul.006G09700)

```
5' UUGGGGUGCCUGAGAUCA 3'
  --|||||---|||||---|||
3' UUCCCCACUGGACUCUUGUGU 5' Pvu-miR398a
```

CCS1 (Phvul.003G217000)

```
5' ACAUGGCGACCUGGGAACACU 3'
  |---||-|||||:|||||---
3' UUCCCCACUGGACUCUUGUGU 5' Pvu-miR398a
```

CSD2 (Phvul.011G086300)

```
5' UGCGGGUGACCUGGAAACAUA 3'
  -:-|||||||:| |||:|
3' UUCCCCACUGGACUC-UUGUGU 5' Pvu-miR398a
```

NOD19 (Phvul.006G127400)

```
5' AUGGGGAACCGAGAACAACA 3'
  |-||||---||||||| |||
3' UUCCCCACUGGACUCUUG-UGU 5' Pvu-miR398a
```

Figura 11. Predicción de los mRNAs blancos de miR398 conservado en *P. vulgaris*. En el genoma de *P. vulgaris* se identificaron los genes homólogos de los transcritos que regula miR398 mediante el programa BLASTN, así como el sitio del apareamiento mRNA blanco:miRNA mediante el programa RNA hybrid. En Phytozome, los genes CSD1, CSD2, CCS1 y NOD19 contienen el número de identificador: Phvul.006G09700, Phvul.011G086300, Phvul.003G217000, Phvul.010G153300 y Phvul.006G127400, respectivamente. El mRNA blanco *NOD19* en *P. vulgaris* fue descrito por (Naya et al., 2014). Cada apareamiento miRNA:mRNA blanco fue obtenido mediante el programa RNA hybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) y se calculó la estabilidad termodinámica del apareamiento entre mRNA blanco::miR398 de *CSD1*, *CSD2*, *CCS1* y *NOD19* donde se obtuvieron los valores de ΔG -35.1, -33.9, -30.4 y -32.2 kcal/mol, respectivamente. El apareamiento de bases es representado por “|”, apareamiento wobble indicado con “:” y desapareamiento indicado por “-”.

Durante el periodo de maestría, se validó experimentalmente mediante la técnica de 5'RACE la regulación de miR398 sobre el transcrito *CSD1* (De la Rosa, 2012). Además, la caracterización y la validación experimental de la regulación de miR398 sobre *NOD19* en *P. vulgaris* fue reportado por (Naya et al., 2014). En contraste, se intentó realizar el ensayo de 5'RACE para verificar el corte de los transcritos *CCS1* y *COX5b-1*, pero no fuimos capaces de amplificar ningún producto de PCR en condiciones de sequía en muestras de hojas y raíces adultas de *P. vulgaris*. Sin embargo, el análisis de comparación de secuencias del sitio de unión de miR398 en el transcrito *COX5b* de *P. vulgaris* con la secuencia homóloga de *A. thaliana* difiere en algunas posiciones (Figura 12A). A pesar de que la secuencia de *P. vulgaris* y de *G. max* tiene diferentes cambios en algunas posiciones con respecto a la secuencia de *A. thaliana*, la predicción del apareamiento *COX5b*:miR398 obtenida con el programa de RNA hybrid no se afectó drásticamente en *P. vulgaris* ni tampoco en soya (*G. max*), sólo se observan dos desapareamientos en la posición 2 y 5 del miRNA con el mRNA blanco en ambas especies. Las dos posiciones desapareadas entre *COX5b*:miR398 de *P. vulgaris* y de *G. max* se encuentran en la región semilla (2-8 nt del miRNA) (Figura 12B), esto podría alterar la regulación de miR398 sobre *COX5b*. Sin embargo, la regulación de miR398 sobre el transcrito de *COX5b* fue validada experimentalmente por 5'RACE en la leguminosa de *M. truncatula* (Trindade et al., 2010). Al comparar las secuencias correspondientes al sitio de unión de miR398 en *COX5b* de *M. truncatula*, *G. max* y *P. vulgaris* (Figura 12A), las tres secuencias muestran alta similitud por lo que no se descarta que se mantenga la regulación por parte de miR398 sobre *COX5b* en *P. vulgaris*.

A

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

                ** * *****
AT3G15640      AAGGTGTGACCTGAGAATCACA
Medtr4g011340 GGGGCGTGACCTGAGATCATAT
Glyma.07G032800 AGGGTGTGACCTGAGATCAAAA
Phvul.010G153300 AGGGTGCGACCTGAGATCAAAC

```

B

Ath-COX5b-1 (AT3G15640)	Gma-COX5b (Glyma.07G032800)
5' AAGGUGUGACCUGAGAAUCACA 3'	5' -AGGGUGUGACCUGAGAUCAAAA 3'
- 3'	3'
3' UUUCCCACUGGACUCUU-GUGU 5' Ath-miR398a	3' UUUCCC-CACUGGACUCUUGUGU 5' Gma-miR398a
Mtr-COX5b (Medtr4g011340)	Pvu-COX5b (Phvul.010G153300)
5' -GGGGCGUGACCUGAGAUCAUUAU 3'	5' -AGGGUGCGACCUGAGAUCAAAC 3'
: 3'	- 3'
3' UUUCCC-CACUGGACUCUUGUGU 5' Mtr-miR398a	3' UUUCCC-CACUGGACUCUUGUGU 5' Pvu-miR398a

Figura 12. Comparación del sitio de unión de miR398 en la secuencia de COX5b-1 de *A. thaliana*, *M. truncatula*, *G. max* y *P. vulgaris*. El sitio de unión de miR398 en COX5b se predijo en el 5'UTR del transcrito. **A)** Alineamiento con Clustal O entre las secuencias del sitio de unión de miR398 en COX5b de los genes de *A. thaliana* (AT3G15640), *M. truncatula* (Medtr4g011340), *G. max* (Glyma.07G032800) y *P. vulgaris* (Phvul.010G153300) identificados en el sitio web de Phytozome. Asterisco (*) indica conservación de la posición y la base sobre representada en gris indica cambio en la posición con respecto a la secuencia de *A. thaliana*. **B)** El apareamiento miRNA:mRNA blanco fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) y se calculó la estabilidad termodinámica del apareamiento entre COX5b::miR398 de *A. thaliana* (Ath), *M. truncatula* (Mtr), *G. max* (Gma) y *P. vulgaris* (Pvu), los cuales tuvieron valores de ΔG de -34.9, -35.6, 33.6 y -28.9 kcal/mol, respectivamente. El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-".

IX.II miR2119 regula a una copia adicional de ADH1 en *P. vulgaris*

Inicialmente, se identificó miR2119 y se analizaron los patrones de acumulación en diferentes tejidos y en respuesta a distintos estreses en *P. vulgaris* (Arenas-Huertero et al., 2009). Además, se reportó en trabajos independientes la identificación de miR2119 utilizando tecnología de secuenciación de siguiente generación en *M. truncatula* y soya (Jagadeeswaran et al., 2009; Lelandais-Briere et al., 2009). Continuando con la caracterización de la función de miR2119, se llevó a cabo la predicción de mRNAs blancos a través de las herramientas bioinformáticas

miRanda y WMD3, entre los cuales, el mejor candidato para ser regulado por miR2119 fue el transcrito de *ADH1* en *P. vulgaris*. Para expandir nuestro conocimiento de ADH1 en frijol, exploramos la secuencia de ADH1 mediante el programa BLASTN en el genoma de *P. vulgaris* en el sitio web Phytozome. De esta forma, se encontraron cuatro genes que codifican para la enzima ADH1, los cuales fueron nombrados como ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4 con número de identificador: Phvul.009G134700, Phvul.001G064000, Phvul.001G067300 y Phvul.009G149500, respectivamente. Se identificó y se localizó el sitio de unión de miR2119 en cada uno de los parálogos de ADH1 y se predijo el apareamiento de ADH1:miR2119. Los resultados mostraron que *ADH1.1*, *ADH1.2* y *ADH1.3* conservan el sitio de apareamiento entre *ADH1*:miR2119 con valores similares de -31.6, -34.6, -34.2 kcal/mol, respectivamente (Figura 13). Sin embargo, el valor obtenido entre el apareamiento de *ADH1.4* y miR2119 fue -15.5 kcal/mol, esto se debió a que *ADH1.4* contiene sustituciones en ciertas posiciones con respecto a *ADH1.1* (Figura 13, posiciones resaltadas en gris), las cuales modifican y cambian la interacción entre *ADH1.4*:miR2119. Por lo tanto, *ADH1.4* no se consideró como un posible mRNA blanco para miR2119 en *P. vulgaris*. (Figura 13).

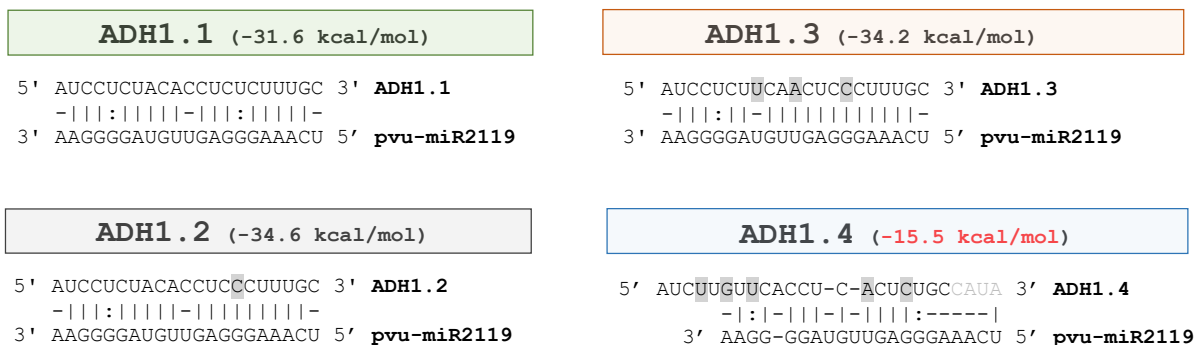


Figura 13. Sitio de reconocimiento de miR2119 en los transcritos que codifican para ADH1 en *P. vulgaris*. Se identificó el sitio de unión de miR2119 en cada parálogo que codifica para ADH1 en *P. vulgaris* y mediante el programa RNA Hybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) se calculó la estabilidad termodinámica del apareamiento (ΔG) entre miR2119 y cada uno de los transcritos de ADH1 provenientes de los genes ADH1.1 (Phvul.009G134700), ADH1.2 (Phvul.001G064000), ADH1.3 (Phvul.001G067300) y ADH1.4 (Phvul.009G149500), como se indica en cada apareamiento. Las bases representadas en gris indican cambios de base con respecto a la secuencia de *ADH1.1*. El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y despareamiento indicado por "-".

Durante la tesis de maestría, se validó experimentalmente por 5'RACE el corte mediado por miR2119 en el transcrito de *ADH1.1* (Phvul.009G134700) (De la Rosa, 2012). Asimismo, se realizó el ensayo 5'RACE y se comprobó que miR2119 también regula el transcrito de *ADH1.2* (Phvul.001G064000) en *P. vulgaris*. Para esto, se mapeó el sitio de corte en *ADH1.2* a través de secuenciar los productos de PCR del 5'RACE de 7 clonas independientes, de las cuales, las siete secuencias de cada clonas coincidieron con el sitio de corte predicho para *ADH1.2* (Figura 14). Adicionalmente, se intentó realizar el experimento 5'RACE para *ADH1.3* en *P. vulgaris* pero no fuimos capaces de amplificar ningún producto de PCR. Los resultados obtenidos confirman que los transcritos de *ADH1.1* y *ADH1.2* son mRNAs blanco de miR2119 en *P. vulgaris*.

Pvu-*ADH1.2* (Alcohol Deshidrogenasa 1.2, Phvul.001G064000)

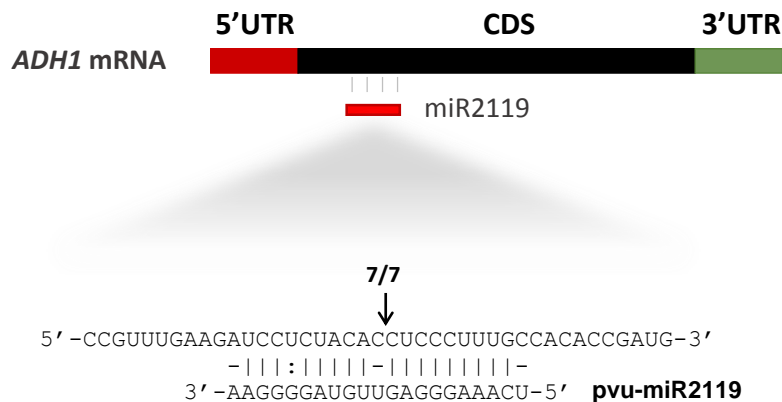


Figura 14. *ADH1.2* es mRNA blanco de miR2119. Diagrama de la parte superior muestra la estructura del transcrito de *ADH1.2* (Phvul.001G064000) y el sitio de reconocimiento de miR2119. Los sitios 5' y 3'-UTR en rojo y verde, respectivamente, y CDS en negro. El diagrama de la parte inferior muestra la validación de *ADH1.2* mediante 5'RACE. Los productos de 5'RACE fueron clonados y secuenciados de manera independiente. La secuencia de cada clona fue mapeada al sitio de apareamiento e indicados con una flecha el sitio de corte. El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-".

IX.III miR398a, miR2119 y miR398b aumentan su acumulación durante el desarrollo de la raíz en *P. vulgaris*

Para estudiar el patrón de expresión de los miRNAs durante el desarrollo de *P. vulgaris*, se extrajo RNA de las raíces recolectadas y se determinó la acumulación de miR2119 mediante

Northern blot (Figura 15A). El resultado mostró un aumento significativo de miR2119 conforme transcurrió el desarrollo de la raíz de *P. vulgaris*, de plántulas de 7 días hacia plantas adultas de 28 días. Asimismo, dado a que el Northern blot no es lo suficientemente sensible para distinguir entre las dos isoformas de miR398 en *P. vulgaris* (Figura 5B, sólo varían en dos nucleótidos), se utilizó la técnica de RT-qPCR para detectar los niveles de acumulación de miR398a y miR398b para analizar la contribución que tienen estos miRNAs durante desarrollo de raíces. El resultado obtenido mostró un aumento significativo en la acumulación de miR398a, miR398b y miR2119 conforme transcurren los días de desarrollo en raíces de *P. vulgaris* en condiciones óptimas de crecimiento (Figura 15B).

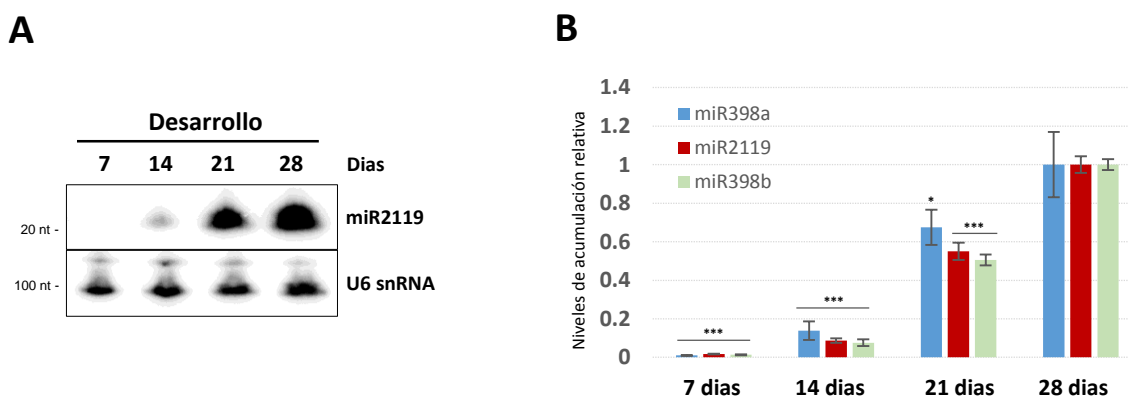


Figura 15. miR398a, miR2119 y miR398b aumentan su acumulación durante el desarrollo de la raíz en *P. vulgaris*. **A)** Acumulación de miR2119 durante el desarrollo en raíces. La señal del miR2119 obtenida por northern blot fue normalizada con el transcrito U6 snRNA, utilizado como control de carga. **B)** RT-qPCR de miR398a, miR2119 y miR398b durante desarrollo en raíces. Se utilizó el nivel de U6 snRNA como control para normalizar las muestras y la acumulación del miRNA obtenida en la muestra de 28 días la utilizamos como referencia (con valor = 1). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada miRNA y fue comparada con la acumulación del mismo miRNA en la muestra de 28 días, * $P < 0.05$ y *** $P < 0.005$. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

En este trabajo, nos enfocamos únicamente en los mRNAs blanco que validamos experimentalmente mediante 5'RACE como *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2*. Por lo tanto, se determinaron los niveles de acumulación de los transcritos respectivos durante el desarrollo de *P. vulgaris* en raíces. Los resultados de RT-qPCR mostraron que el transcrito de *CSD1* disminuyó a los 21 y 28 días de desarrollo con respecto a 7 y 14 días en raíces (Figura 16A). También, se midieron los niveles de acumulación de los transcritos de *ADH1.1* y de *ADH1.2* donde se observó

una disminución de ambos transcritos a los 21 y 28 días con respecto a los 7 y 14 días (Figura 16B, C). Durante el desarrollo de las raíces de *P. vulgaris* en condiciones óptimas de crecimiento, los niveles de los transcritos de *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* mantienen cierto nivel durante los días iniciales, pero disminuyen conforme transcurren los días posteriores del desarrollo, a los 21 y 28 días, esta disminución correlaciona con el aumento significativo de la acumulación de los miRNAs (Figura 15B). Estos datos sugieren que el aumento en la acumulación de miR398a, miR398b y miR2119 contribuye a mantener niveles basales de los transcritos *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* durante la etapa adulta del desarrollo de raíces en *P. vulgaris* en condiciones óptimas de crecimiento.

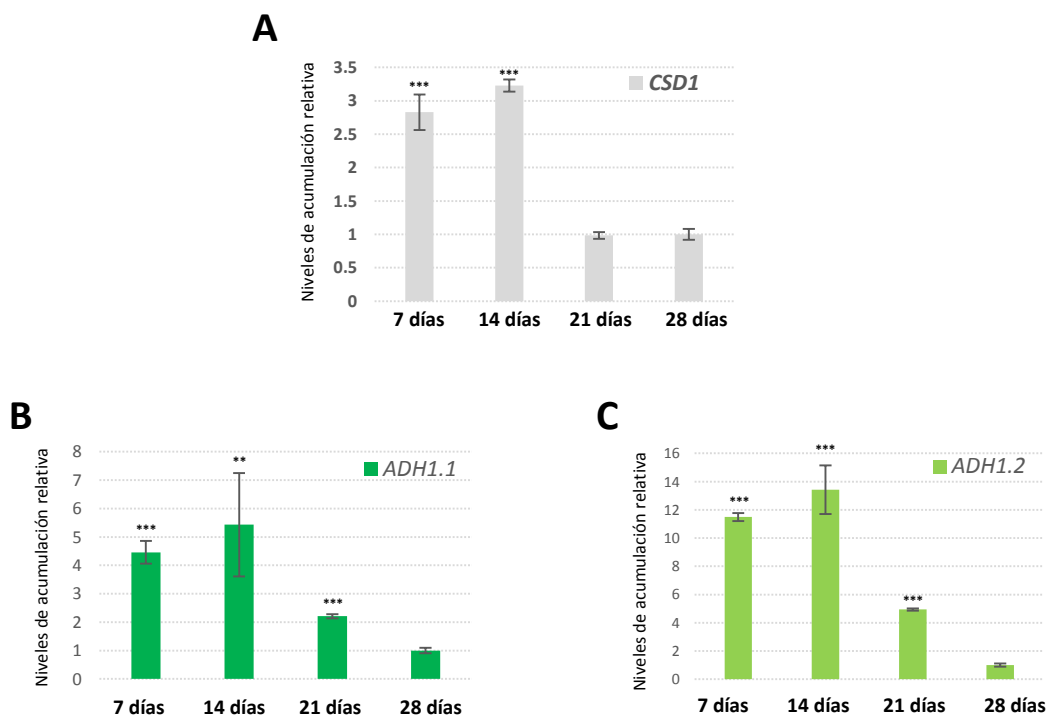


Figura 16. *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* disminuyen su acumulación durante el desarrollo en raíces. Determinación de la acumulación de los transcritos **A) *CSD1***, **B) *ADH1.1*** y **C) *ADH1.2*** mediante RT-qPCR durante el desarrollo de la raíz en *P. vulgaris*, los niveles de acumulación de cada transcrito fueron normalizados con el transcrito *Pvu-Actin 11* y relativos a la condición 28 días con valor de 1. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada mRNA blanco y fue comparada con la acumulación obtenida de la muestra de 28 días, **P < 0.01 y ***P < 0.005. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

IX.IV miR398a, miR2119 y miR398b disminuyen su acumulación ante déficit hídrico

Con el objetivo de estudiar y conocer la contribución de los miRNAs en condiciones estresantes, se realizó un tratamiento de déficit hídrico en plantas adultas de *P. vulgaris* para determinar los patrones de acumulación de los miRNAs (Figura 17). En hojas, la acumulación de miR2119 disminuye en las muestras de déficit hídrico con respecto al control. Sin embargo, se observó una recuperación parcial en la acumulación de miR2119 a los 20 días en comparación a los 10 y 18 días de déficit hídrico, pero sin alcanzar los niveles observados en la muestra control de 20 días (Figura 17A). En raíces, nuevamente se observó la disminución de la acumulación de miR2119 en déficit hídrico con respecto al control (Figura 17B). Los resultados obtenidos muestran que miR2119 disminuye su acumulación en respuesta a déficit hídrico en hojas y raíces.

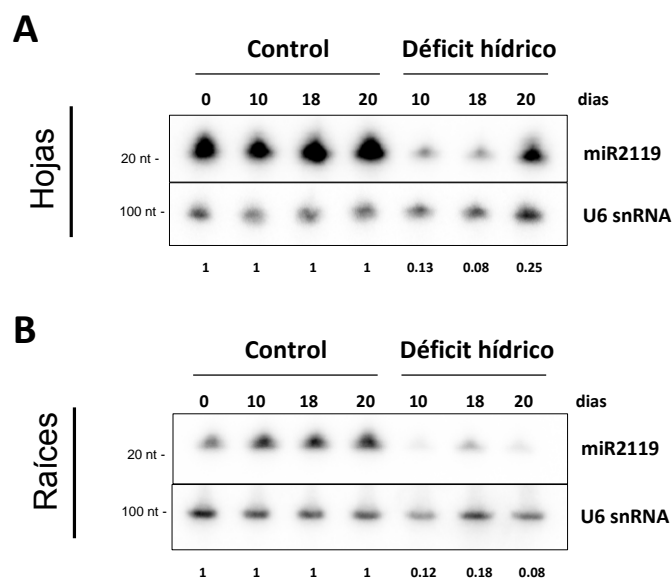


Figura 17. miR2119 disminuye en condiciones de déficit hídrico en plantas adultas de *P. vulgaris*.

Las muestras de RNA total (10 µg) del tratamiento de déficit hídrico y control fueron utilizadas para determinar la acumulación de miR2119 por Northern blot en **A)** hojas y **B)** raíces de 0, 10, 18 y 20 días. La señal de miR2119 fue determinada por análisis de phosphorImager y normalizada con el transcrito U6 snRNA que sirvió como control de carga. En la parte inferior del Northern blot, se muestra el valor cuantificado de la señal de miR2119 y relativo a cada día control, designando con el valor de 1. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

Adicionalmente, se determinaron los niveles de acumulación de miR398a y miR398b para analizar la contribución que tienen estos miRNAs en respuesta a déficit hídrico. En hojas, se observó una disminución de la acumulación de miR398a, miR2119 y miR398b en déficit hídrico

con respecto a las muestras control (Figura 18A). Sin embargo, se observó una parcial recuperación de la acumulación de estos miRNAs a los 20 días de déficit hídrico en comparación a los 18 días de la misma condición. En raíces, la acumulación de miR398a, miR2119 y miR398b también disminuye en el tratamiento de déficit hídrico con respecto al control (Figura 18B). Los resultados del análisis por RT-qPCR mostraron una disminución en la acumulación de miR398a, miR398b y miR2119 en la condición de déficit hídrico en hoja y raíces. En este experimento, la expresión observada de miR2119 es consistente con la acumulación detectada en el análisis tipo Northern blot (Figura 17). Cabe señalar que en ambos órganos (hoja y raíces), la acumulación de los miRNAs disminuye en déficit hídrico; sin embargo, el cambio observado en los niveles de acumulación de estos miRNAs en déficit hídrico con respecto a su control, es mayor en las muestras de raíces que en las muestras de hojas. Además, se sugiere que a pesar de que miR2119 y miR398a provienen del mismo transcrito, presentan distintos cambios de acumulación en las muestras de 10 y 18 días de déficit hídrico con respecto a su control en hojas (Figura 18A). Asimismo, los cambios en los niveles de acumulación tanto de miR398a como de miR398b fueron similares entre las muestras de hoja en condiciones control y déficit hídrico, a pesar de provenir de dos *loci* distintos, excepto en las muestras de raíces. En conclusión, miR398a, miR2119 y miR398b disminuyen su acumulación ante déficit hídrico.

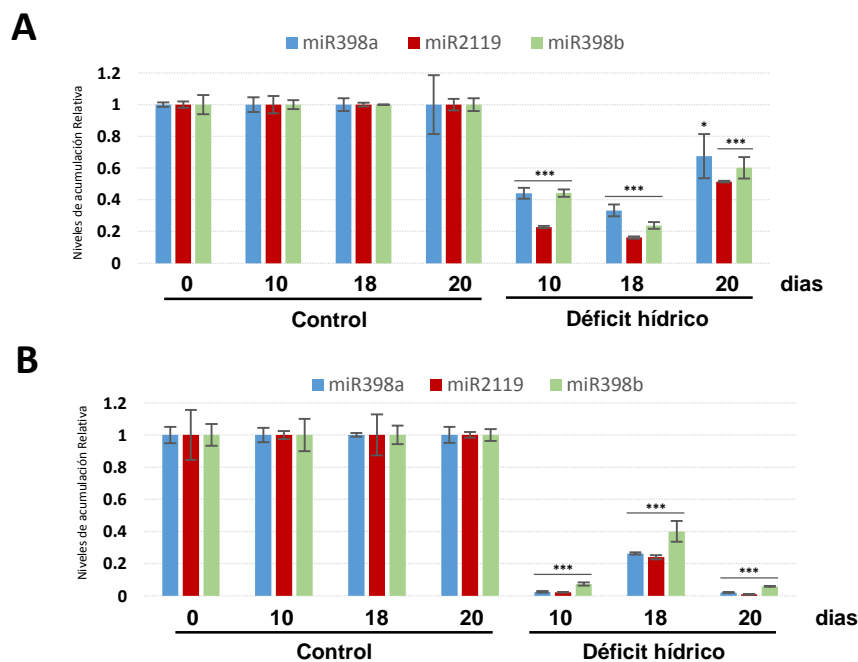


Figura 18. La acumulación de miR398a, miR2119 y miR398 disminuye en condiciones de déficit hídrico. RT-qPCR de miR398a, miR2119 y miR398b en muestras de **A)** hojas y **B)** raíces. El nivel de

acumulación de U6 snRNA se utilizó como control para normalizar las muestras y la acumulación de los miRNAs obtenida en cada una de las muestras control, la utilizamos como referencia (con valor = 1) para ser comparada con el mismo día del tratamiento de déficit hídrico. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada miRNA en déficit hídrico y fue comparada con la acumulación obtenida en el respectivo día de la condición control, *P < 0.05 y ***P < 0.005. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

IX.V Incremento de los niveles de los mRNAs de *CSD1* y *ADH1* en el tratamiento de déficit hídrico

Para estudiar la función biológica de un miRNA es importante conocer la regulación de su mRNA blanco. Se determinaron los niveles de acumulación de *CSD1* y *ADH1* mediante la técnica de RT-qPCR para evaluar la acumulación de los transcritos en las muestras del tratamiento de déficit hídrico. En hojas, los resultados muestran que *CSD1* aumenta a los 10, 18 y 20 días de déficit hídrico con respecto al control, obteniendo una mayor acumulación a los 18 días (Figura 19A). También, se determinó la acumulación del transcrito de *ADH1.1*, se detectó mayor acumulación a los 10, 18 y 20 días de déficit hídrico con respecto al control (Figura 19B). Sin embargo, la expresión del transcrito de *ADH1.2* no fue detectada en las muestras de hojas. Si comparamos los niveles de acumulación de los miRNAs con respecto a sus mRNAs blanco en las muestras de hoja en el tratamiento de déficit hídrico, miR398a y miR398b disminuyen su acumulación en condiciones de déficit hídrico a los 10 días, 18 días y 20 días (Figura 18A), en cambio, *CSD1* aumenta en esas condiciones (Figura 19A). Para el caso de miR2119 se detecta una menor acumulación a los 10 días en el tratamiento de déficit hídrico (Figuras 17A, 18A), donde se obtiene una mayor acumulación de *ADH1.1* (Figura 19B).

Además, se determinaron los niveles de acumulación de los transcritos de los mRNAs blanco en raíces en el tratamiento de déficit hídrico. La acumulación del transcrito *CSD1* aumenta en condiciones de déficit hídrico, teniendo una mayor acumulación a los 18 días con respecto al control (Figura 20A). Se midieron los niveles de los transcritos de *ADH1.1* y *ADH1.2* en las muestras de raíces donde claramente se observa una acumulación significativa de *ADH1.1* y *ADH1.2* en condiciones de déficit hídrico a los 10, 18 y 20 días con respecto a su muestra control, obteniendo una mayor acumulación a los 18 y 20 días de los transcritos *ADH1.1* (~120 veces de incremento) y *ADH1.2* (~1600 veces de incremento), respectivamente (Figura 20B, C). En conclusión, los niveles de los transcritos de *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* aumentan significativamente en condiciones de déficit hídrico y éste incremento correlaciona con la

disminución en la acumulación de los miRNAs en raíces adultas de *P. vulgaris*. Tanto en hojas como en raíces, se observó un patrón de acumulación inversa entre miRNAs y mRNAs blanco, como es de esperarse si existe una regulación mediada por miRNAs. Esto nos sugiere que la participación de miR398a, miR398b y miR2119 consiste en modular la expresión de *CSD1* y las *ADH1* en hojas y raíces para permitir el aumento de los transcritos en respuesta al déficit hídrico.

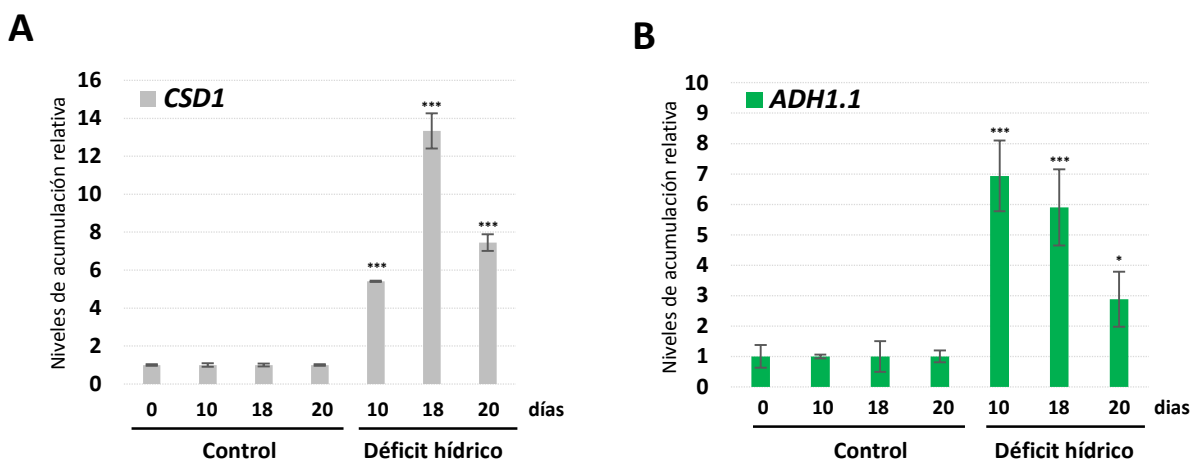


Figura 19. *CSD1* y *ADH1.1* aumentan su acumulación durante el déficit hídrico en hojas. A) Detección de *CSD1* y B) *ADH1.1* por RT-qPCR en las muestras de hojas en el tratamiento de déficit hídrico, los niveles de acumulación fueron normalizados con *Pvu-Actin 11* y comparados con la condición control de cada punto muestreado. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada mRNA blanco en la condición de déficit hídrico y fue comparada con la acumulación del mismo día de la condición control, *P < 0.05 y ***P < 0.005. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

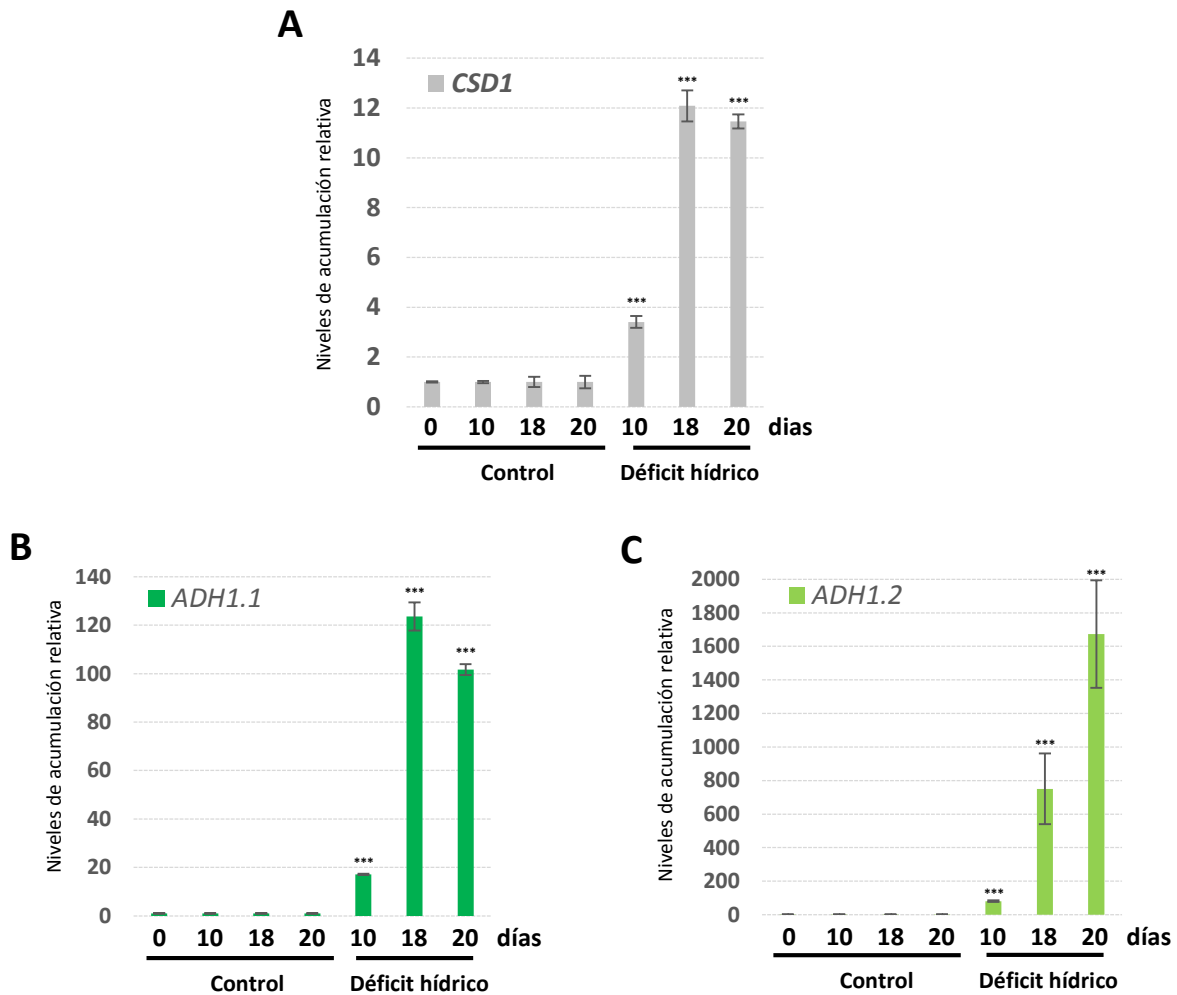


Figura 20. La acumulación de *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* aumenta durante déficit hídrico en raíces adultas de *P. vulgaris*. Determinación de los transcritos de **A)** *CSD1*, **B)** *ADH1.1* y **C)** *ADH1.2* en las muestras de raíces mediante RT-qPCR, los niveles de acumulación de cada transcrito fueron normalizados con *Pvu-Actin 11* y comparados con cada condición control con valor 1. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada mRNA blanco en déficit hídrico y fue comparada con la acumulación del mismo día de la condición control, *** $P < 0.005$. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

IX.VI Los niveles de acumulación de proteína de ADH1 y de CSD1 aumentan en respuesta a déficit hídrico

A continuación, se determinó la acumulación de las proteínas ADH1 y CSD1 mediante el análisis Western blot en las muestras de raíces de *P. vulgaris* del tratamiento de déficit hídrico. Consistente con la acumulación de transcrito observada, los resultados mostraron que durante déficit hídrico aumenta dramáticamente la acumulación de proteína de ADH1 a los 18 y 20 días del tratamiento, en comparación, no se detecta la acumulación de ADH1 en las muestras control (Figura 21A). De igual manera, se determinó la acumulación de proteína de CSD1 mediante Western blot. Los resultados mostraron un aumento en la acumulación de proteína de CSD1 durante en el tratamiento de déficit hídrico en comparación con las muestras control. En el caso de CSD1, las muestras control mostraron una acumulación de proteína similar (Figura 21B).

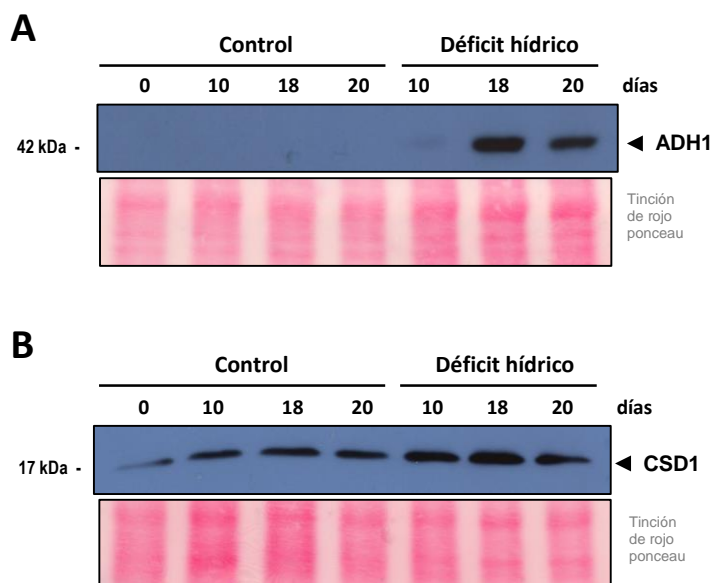


Figura 21. La acumulación de las proteínas ADH1 y CSD1 aumenta durante déficit hídrico. Análisis tipo Western blot para detectar la proteína de **A)** ADH1 y **B)** CSD1 en muestras de tratamiento control y déficit hídrico. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo ponceau para observar la transferencia de proteínas y el cargado equitativo entre cada una de las muestras. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

IX.VII Sobre-expresión de pre-miR398a-2119 regula a *CSD1* y *ADH1* *in vivo*

Con el objetivo de estudiar el efecto directo de los miRNAs sobre sus mRNAs blanco, se realizó la sobreexpresión del precursor “pre-miR398a-2119” en raíces transgénicas de frijol. Los resultados de RT-qPCR mostraron la sobreexpresión de los miRNAs de miR398a y miR2119 maduros en el vector *35S::pre-miR398a-miR2119* con respecto al control, el vector vacío (Figura 22A). Sin embargo, se detectó un aumento significativo en la acumulación de miR398b en las raíces que contenían a *35S::pre-miR398a-miR2119* comparado con el vector vacío. Esto podría deberse a que exista un efecto en la expresión de *MIR398b* ocasionada por la sobreexpresión de *35S::pre-miR398a-miR2119* o alternativamente, una fracción de la señal detectada para miR398b corresponde a la señal de la sobreexpresión de miR398a. Asimismo, se evaluó la acumulación de los mRNAs blanco en la sobreexpresión del precursor comparado con el vector vacío. En las raíces que contenían el vector *35S::pre-miR398a-miR2119*, donde ambos miRNAs aumentan su acumulación, los transcritos de *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* mostraron una disminución significativa en los niveles de acumulación (Figura 22B), lo que refleja el efecto negativo *in vivo* que ejercen los miRNAs sobre sus mRNAs blanco en frijol en estas condiciones.

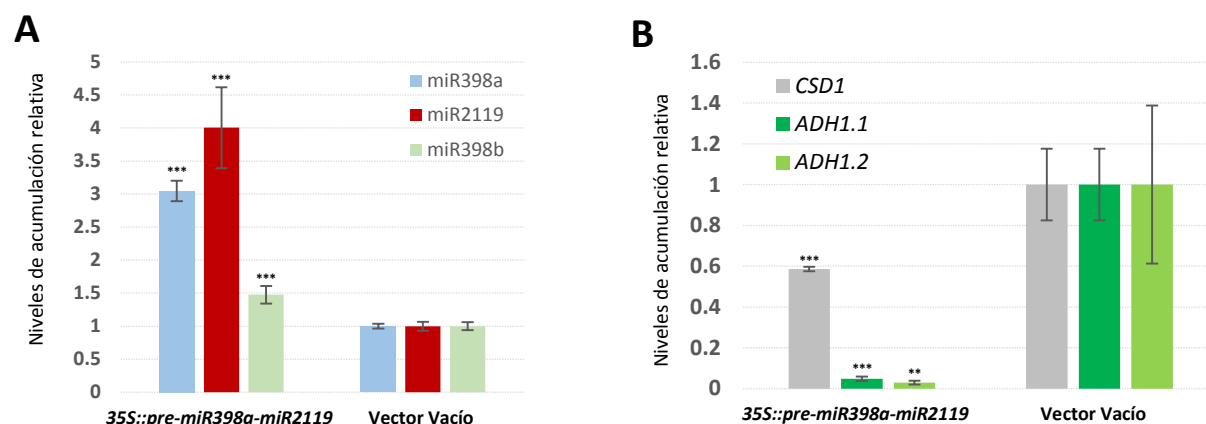


Figura 22. Sobreexpresión del precursor pre-miR398a-miR2119 en raíces transgénicas de *P. vulgaris*. **A)** Detección por RT-qPCR de la acumulación de miRNAs en raíces transformadas de *P. vulgaris* con los vectores *35S::pre-miR398a-miR2119* y el vector vacío (pBA-TdT). Se utilizó U6 snRNA como control para normalizar las muestras con respecto al vector vacío, valor de 1. **B)** Detección por RT-qPCR de los niveles de acumulación de *CSD1*, *ADH1.1* y *ADH1.2* en raíces transformadas de *P. vulgaris* en los vectores *35S::pre-miR398a-miR2119* y el vector vacío (pBA-TdT). Se utilizó la acumulación del transcrito de *Pvu-Actin 11* como control para normalizar las muestras con respecto al vector vacío, con valor de 1. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada miRNA o mRNA blanco en la sobreexpresión del precursor *35S::pre-*

miR398a-miR2119 y fue comparada con la acumulación obtenida en el vector vacío, **P < 0.01 y ***P < 0.005. Este es el resultado representativo de uno de tres experimentos independientes.

IX.VIII Modulación de *ADH1* y *CSD1* mediada por miRNAs en condiciones de inundación

Estudios anteriores han caracterizado la participación de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 durante condiciones de limitación de oxígeno (hipoxia o anoxia). Además, se ha observado la participación de ADH1 como en la respuesta a múltiples estímulos como deshidratación, baja temperatura, estrés salino, tratamiento con ABA e inundación, entre otros (Christie et al., 1991; de Bruxelles et al., 1996; Komatsu et al., 2011; Zabalza et al., 2009).

Con el objetivo de explorar la participación de miR398 y miR2119 en respuesta a otro tipo de estreses, se realizó el tratamiento de inundación para provocar condiciones de limitación de oxígeno en el sistema radical. El experimento consistió en crecer plantas de *P. vulgaris* durante 17 días en irrigación óptima, posteriormente se inundó el sistema radical de las plantas donde el nivel del agua superó un 1 cm por encima del sustrato contenido en la maceta, las muestras de las raíces fueron recolectadas a las 0, 24 y 48 h del tratamiento. Los resultados obtenidos tanto por Northern blot y por RT-qPCR mostraron que miR2119, miR398a y miR398b disminuyen su acumulación durante 24 y 48 h de inundación (Figura 23).

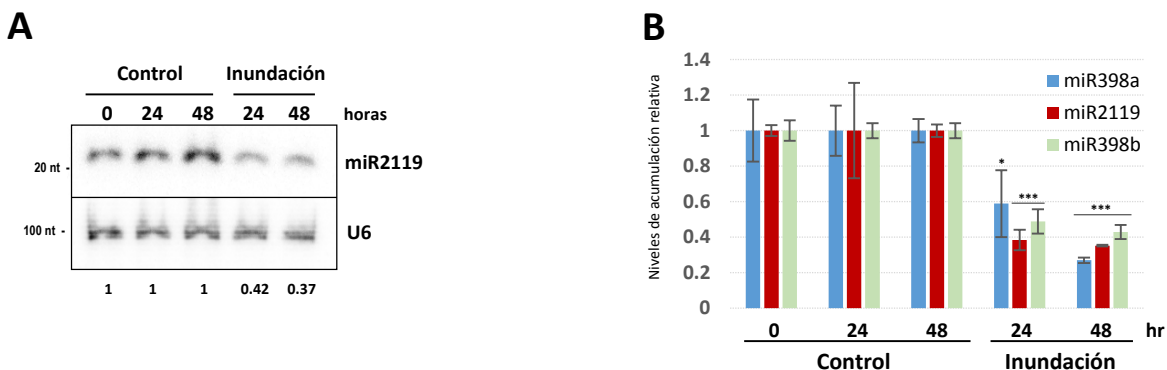


Figura 23. miR398a, miR2119 y miR398b disminuyen su acumulación en tratamiento de inundación.

A) Northern blot de miR2119 en tratamiento de inundación. La señal del miR2119 fue normalizada con U6 snRNA y comparada cada muestra con su muestra control, valor de 1, cuantificada en la parte inferior. **B)** RT-qPCR de miR398a, miR2119 y miR398b en tratamiento de inundación. Se utilizó U6 snRNA como control para normalizar las muestras. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada miRNA en el tratamiento

de inundación y fue comparada con la acumulación obtenida en el mismo día de la condición control, *P < 0.05 y ***P < 0.005. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

Además, se determinó la acumulación de los mRNAs blanco, *ADH1.1* y *ADH1.2*, los cuales aumentan significativamente a las 24 y 48 h de inundación con respecto a los niveles en condiciones control (Figura 24A, B). También, se detectó la acumulación del transcrito de *CSD1*, la cual aumentó durante el tratamiento de inundación, mostrando a las 48 h la mayor acumulación (Figura 24C). Asimismo, se realizó un ensayo tipo Western blot para determinar la acumulación de las proteínas correspondiente a ADH1 y CSD1. Los niveles de acumulación de la proteína ADH1 aumentan dramáticamente a las 24 y 48 h del tratamiento de inundación, en cambio, no se detectó señal en las muestras de condición control (Figura 24D). También, se determinó la acumulación de la proteína de CSD1 y se observó un ligero aumento en las muestras de inundación a los 24 y 48 hr con respecto a las muestras control (Figura 24D). Nuevamente, observamos una relación inversa entre la acumulación de los miRNAs con sus mRNAs blanco en condiciones estresantes, ahora durante el tratamiento de inundación. Observamos que los miRNAs disminuyeron su acumulación y permitieron el aumento de los niveles de los mRNAs blanco y los niveles correspondientes de proteína durante el tratamiento de inundación en raíces de plantas adultas de *P. vulgaris*.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la regulación mediada por miR398 en conjunto con miR2119 podría estar involucrada en coordinar la actividad de CSD1 y ADH1 en respuesta a distintas formas de estrés y no solamente a déficit hídrico. Falta aún por explorar si las actividades de CSD1 y ADH1 están coordinadas a diferente nivel que el identificado por miRNAs en este trabajo.

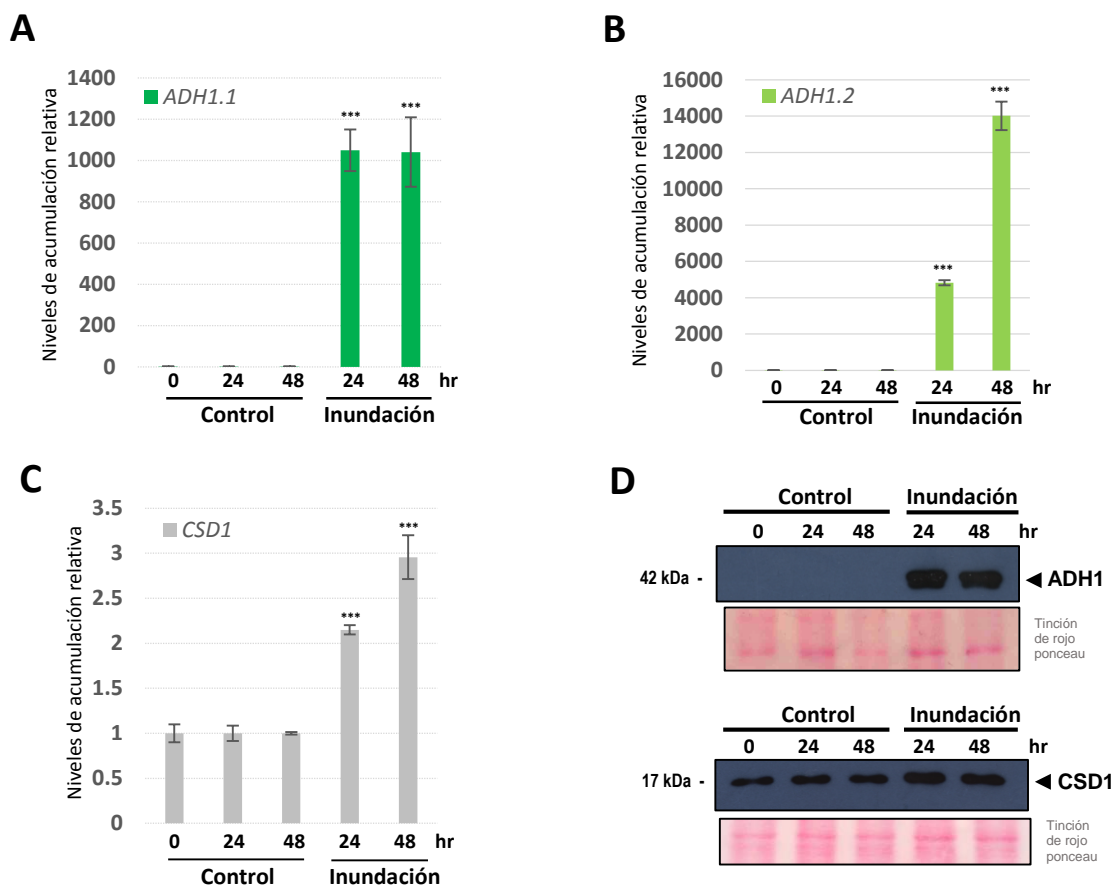


Figura 24. Modulación de los niveles de acumulación de los mRNAs blanco y sus proteínas en el tratamiento de inundación. Detección de los transcritos de **A) ADH1.1**, **B) ADH1.2** y **C) CSD1** por RT-qPCR. Se utilizó la acumulación del transcrito de *Pvu-Actin 11* como control para normalización. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Se realizó una prueba *t-Student* para la acumulación de cada mRNA blanco en el tratamiento de inundación y fue comparada con la acumulación obtenida en el mismo día de la condición control, *** $P < 0.005$. **D)** Análisis tipo Western blot de ADH1 y CSD1 en el tratamiento de inundación. Se utilizó la tinción de proteínas con rojo ponceau como referencia del cargado en cada carril. Este es el resultado representativo de uno de dos experimentos independientes.

CAPÍTULO II

IX.IX Estudio de la conservación del precursor pre-miR398a-miR2119 en un subgrupo de las leguminosas

(En colaboración con Luis Lozano y Santiago Castillo del CCG-UNAM)

Con el objetivo de elucidar los eventos evolutivos que dieron origen a la presencia de miR2119 dentro de la familia de las leguminosas, decidimos explorar la presencia de esta secuencia en el número más amplio posible de especies, tomando en cuenta el contexto de miR398 en el se encuentra en frijol, como se ha visto a lo largo de este trabajo. Por ello, primero describiré las relaciones filogenéticas de las leguminosas como se entienden actualmente. Después, pasaré a describir la distribución y la organización tanto de los genes de *MIR2119* como de los genes de *ADH1*.

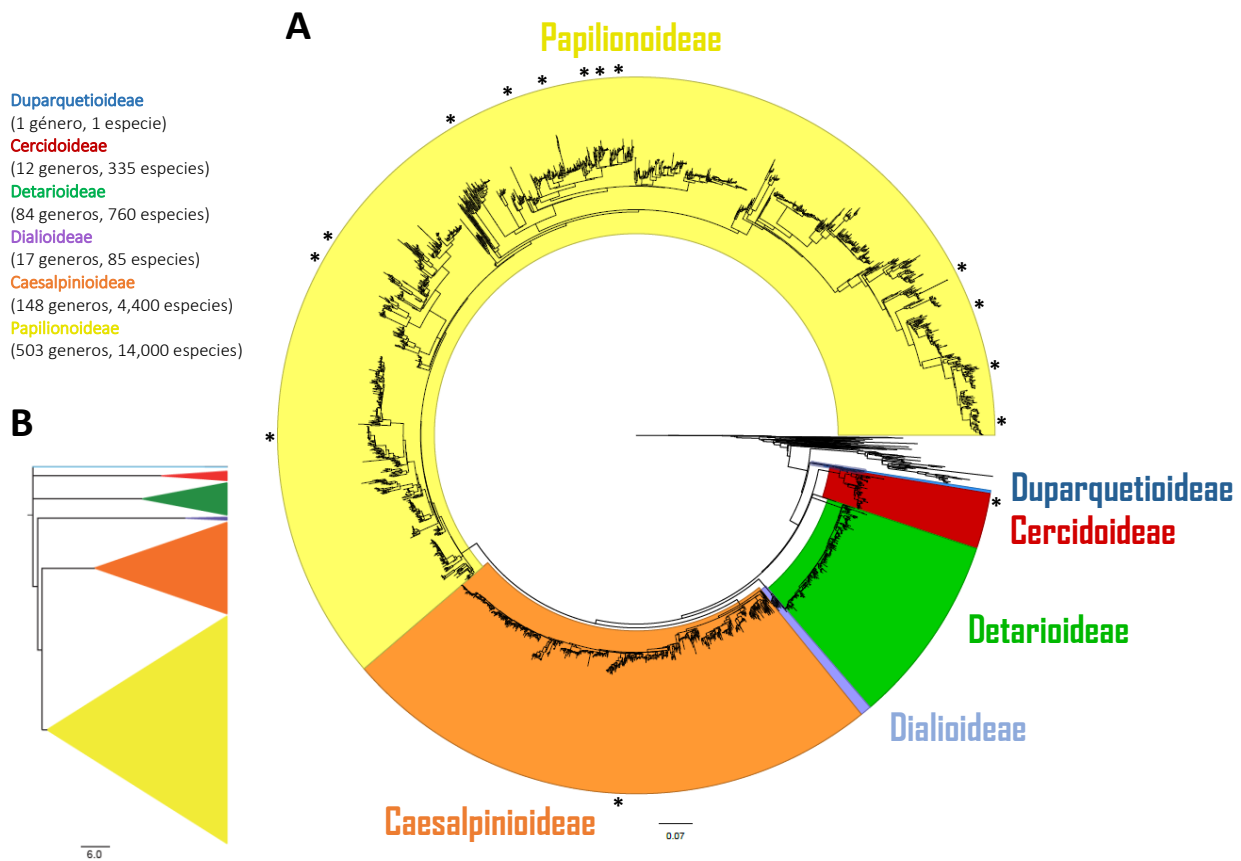


Figura 25. Árbol filogenético de la familia de las leguminosas. Las seis subfamilias de leguminosas: Caesalpinioideae, Dialioideae, Detarioideae, Cercidoideae, Duparquetioideae y Papilionoideae. **A)**

Reconstrucción de árbol filogenético por método Bayesiano de 3,842 secuencias del gen plastídico *matK* representa 3,696 de las 19,500 especies y 698 de los 765 géneros de las leguminosas. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de sustituciones de *matK*. Se identificaron los géneros utilizados en este análisis y se indican con asterisco en la parte exterior. **B)** Esquema basado en la filogenia de *matK* mediante análisis Bayesiano que muestra la clasificación de las Leguminosas, el tamaño de los clados es proporcional al número de especies. Imagen tomada y modificada del artículo (Azani et al., 2017).

Recientemente, una comunidad internacional de sistemáticos en leguminosas clasificó a esta familia en seis subfamilias: Caesalpinioideae (148 géneros y 4,400 especies), Cercidoideae (12 géneros y 335 especies), Detarioideae (84 géneros y 760 especies), Dialioideae (17 géneros y 85 especies), Duparquetioideae (1 género y 1 especie) y Papilionoideae (503 géneros y 14,000 especies, donde se encuentra frijol). El estudio se basó en el análisis filogenético de la secuencia del gen plástidico *matK*, y se incluyeron casi todos los géneros (698 de los 765 géneros que actualmente se reconocen) correspondiente a ~20% de las especies (3696) conocidas (Figura 25), ésta nueva clasificación es el estudio evolutivo de leguminosas más completo que se tienen hasta el día de hoy (Azani et al., 2017).

En particular, la subfamilia Papilionoideae contiene a las leguminosas que proveen de alimento y son económicamente importantes para el ser humano (Doyle and Luckow, 2003). Dentro de la subfamilia Papilionoideae, se encuentran cuatro clados importantes como Genistoides, Dalbergioides, Hologaleginas y Millettioides (Figura 26). El clado Genistoide incluye al género *Lupinus* y el clado Dalbergioide contiene al género *Arachis* y *Nissolia* donde están presente las especies de *Arachis hypogaea* (cacahuate) y de *Nissolia schottii*, respectivamente. El clado Hologalegina se divide en dos subclados; el subclado Robinioides, en el cual se encuentra la especie representativa de *Lotus japonicus*; otro subclado llamado IRLC (por sus siglas en inglés, *Inverted Repeat Loss Clade*) donde se incluye a las especies que se caracterizan por la pérdida de una copia de un inverso repetido en el DNA del cloroplasto encontrado en la mayoría de las plantas angiospermas. Éste subclado IRLC incluye a especies con adaptación a climas templados o también llamadas leguminosas de temporada fría tales como *Medicago sativa* (la alfalfa), *Cicer arietinum* (el garbanzo), *Vicia faba* (el haba), *Lens culinaris* (la lenteja) y *Pisum sativum* (el chicharo). Por último, el clado Millettioide incluye varias leguminosas que están mejor adaptadas a climas tropicales, también nombradas como leguminosas de temporada cálida entre las que destacan *P. vulgaris* (frijol), *Vigna unguiculata* (caupí), *Cajanus cajan* (frijol chicharo o guandú) y *Glycine max* (la soya) (Doyle and Luckow, 2003; Gepts et al., 2005).

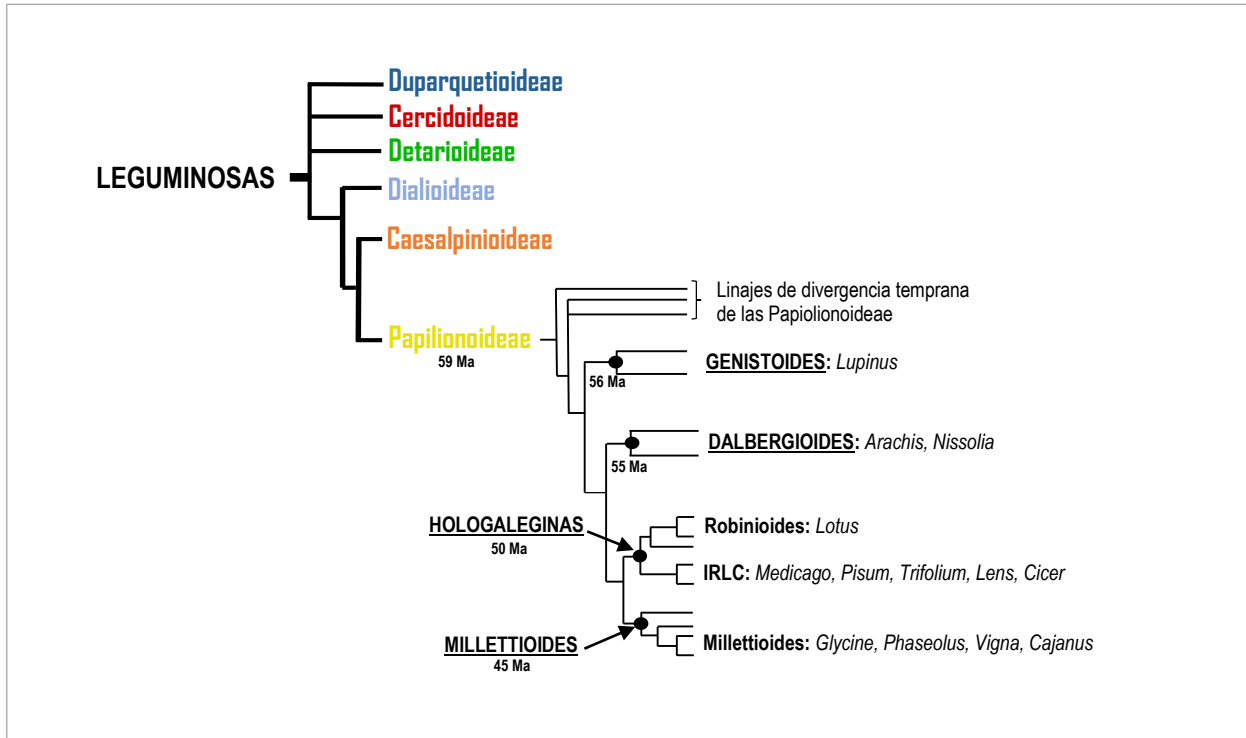


Figura 26. Árbol filogenético simplificado de la familia de las leguminosas. Las seis subfamilias de leguminosas: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae. Los cuatro clados importantes en la subfamilia de las Papilionoideae: Genistoides, Dalbergioides, Hologaleginas y Millettioides, los cuales están subrayados y se referencia en el árbol filogenético con punto. Los clados Hologaleginas y Millettioides están señalados con flecha. Además, se indica el posible surgimiento de cada clado en millones de años “Ma”. Esta imagen fue tomada, modificada y actualizada del artículo de (Gepts et al., 2005).

IX.X Surgimiento de miR2119 y la adquisición del un precursor dicistrónico en la subfamilia de las Papilionoideae

Para conocer la distribución del gen *MIR398-MIR2119* y estudiar la conservación de dicho precursor dicistrónico en leguminosas, se realizó una exploración en las distintas bases de datos. El análisis se llevó a cabo con los genomas secuenciados de 26 especies de leguminosas disponibles en base de datos públicas como NCBI, Phytozome, LIS y KnowPulse. Con estas 26 especies analizadas obtuvimos representantes de tres subfamilias de las leguminosas, Cercidoideae, Caesalpinioideae y Papilionoideae (los géneros de las especies empleadas están indicadas con asterisco en la Figura 25A).

Los resultados obtenidos de la búsqueda de secuencias de miR398 y miR2119 en leguminosas se resumen en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente. Además, cada una de las secuencias identificadas de miRNAs fueron sujetas a predicción de estructura secundaria *in silico* por plegamiento de RNA mediante el programa Mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>) y fueron corroboradas como secuencias maduras localizadas en el tallo del precursor de miRNA, con excepción de las isoformas de miR398b en *A. duranensis* y *A. ipaensis*; miR398d y miR398e en *A. hypogaea*; miR398c y miR398d en *A. monticola*. La estructura secundaria predicha de precursores de estas isoformas no presenta complementariedad en el tallo debido a la presencia de nueve posiciones consecutivas de adeninas curso arriba de miRNA maduro que desestabiliza la estructura; es probable que sea consecuencia de un error de secuenciación. Sin embargo, las secuencias de estas isoformas fueron consideradas positivas por su alta identidad y homología a la secuencia de miR398a del género de *Arachis*.

Previamente, nuestro análisis en los genomas de *P. vulgaris*, *G. max* y *M. truncatula* disponibles en Phytozome, reveló que existen dos tipos de *loci* que codifican para miR398, uno donde el transcrito contiene a los precursores para *MIR398* y *MIR2119*, y otro donde *MIR398* permanece como unidad transcripcional independiente y es similar a los *loci* encontrados en especies no leguminosas. En *A. thaliana* existen tres *loci* para la familia de *MIR398*: *MIR398a*, *MIR398b* y *MIR398c*. Las secuencias maduras de miR398b y miR398c son idénticas, mientras que miR398a difiere en una sola base en el extremo 3' (Jones-Rhoades and Bartel, 2004). En cambio, *O. sativa* presenta dos *loci* para miR398a y miR398b, los cuales difieren en dos posiciones (Sunkar and Zhu, 2004). Nuestra búsqueda de nuevas secuencias disponibles en las distintas bases de datos reveló que en las leguminosas consultadas existen al menos dos *loci* que codifican para *MIR398*, mientras que los genomas de *G. max* y de *A. hypogaea* contienen seis y cinco *loci* para *MIR398*, respectivamente. Además, para *P. vulgaris* se identificó un *locus* adicional de *MIR398* localizado en el cromosoma 6, denominado *MIR398c*, cuyo miRNA maduro

difiere en cuatro y dos posiciones con miR398a y miR398b, respectivamente (Tabla 3) y no se encontró ningún RNA pequeño en su cercanía al igual que el gen *MIR398b*. En este trabajo no abordamos la caracterización del *MIR398c* en *P. vulgaris*, ya que sólo recientemente se identificó este *locus* gracias a la disponibilidad y el análisis realizado con un mayor número de genomas de especies de leguminosas. Sin embargo, las posiciones distintas en miR398c con respecto a miR398a y miR398b, no reducen el número de apareamientos entre miR398c y sus mRNAs blanco, por lo que no esperamos que miR398c tenga un papel distinto a miR398a y miR398b. Dado que miR398 es un miRNA conservado en espermatofitas (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Sunkar and Zhu, 2004), en particular, la secuencia de miR398a está altamente conservada y fue idéntica en cada una de las especies de las leguminosas analizadas, excepto, por miR398a de *M. púdica* perteneciente a la subfamilia de Caesalpinioideae que muestra dos posiciones distintas (ver Tabla 3).

Por otro lado, hemos caracterizado a miR2119 como un miRNA específico de leguminosas (Arenas-Huertero et al., 2009; De la Rosa, 2012). Los resultados obtenidos de la búsqueda de secuencias de miR2119 en los genomas disponibles de la subfamilia de las Papilionoideae se resume en la Tabla 4. Se identificó la secuencia de miR2119 en los clados de Millettioideae, Hologaleginas y Dalbergioideae, pero ausente en las Genistioideae. El clado Millettioideae se encuentra representado por las especies de *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *V. radiata*, *V. angularis*, *V. unguiculata*, *G. max* y *G. soja* que conservan la identidad de secuencia de miR2119, excepto, por *C. cajan* que difiere en la primera posición (1C) y en *V. unguiculata* que contiene una copia adicional (miR2119b) con tres sustituciones (6A, 14C y 17U), ambas secuencias en comparación con la secuencia de *P. vulgaris*. En el clado Hologalegina, por un lado, tenemos a las especies pertenecientes al subclado de IRLC como *M. truncatula*, *T. pratense*, *T. médium*, *T. subterraneum*, *P. sativum* y *L. culinaris*, las cuales, comparten la misma secuencia de miR2119, excepto, en *C. arietinum* y *C. reticulatum*, que muestran dos bases distintas en las posiciones 9G y 14A. Por otro lado, en *L. japonicus*, perteneciente al subclado Robinioideae, la secuencia de miR2119 sólo difiere en una base (2A) con respecto a *M. truncatula*. Además, en el clado Dalbergioideae las especies del género *Arachis* contiene la secuencia de miR2119 idéntica, las cuales son *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. hypogaea* y *A. monticola*, estas dos última, con una copia adicional de miR2119. Cabe resaltar, que el género *Arachis* es endémico de América del Sur y está conformado en su mayoría por especies diploides. En el caso particular de *A. hypogaea* tiene un genoma alotetraploide (tipo AABB) derivado de un evento reciente de hibridación entre las dos especies diploides, *A. duranensis* y *A. ipaensis* (Bertioli et al., 2016). Otra especie perteneciente al clado Dalbergioideae es *Nissolia schottii*, la cual presenta

una secuencia de miR2119 similar al género de *Arachis*, distinta en una sola posición (2C). Sorpresivamente, no fuimos capaces de identificar la secuencia de miR2119 en *L. angustifolius*, especie representante del clado Genistoide de la subfamilia de las Papilionoideae, así como tampoco en especies representativas de las subfamilias Caesalpinioideae y Cercidoideae (*M. púdica* y *C. canadensis*, respectivamente). Por lo tanto, los datos indican que miR2119 es un miRNA específico de leguminosa que sólo se encuentra en la subfamilia de las Papilionoideae y dentro de ésta, sólo en los clados de Millettioide, Hologalegina y Dalbergioide.

Tabla 3. Secuencias de la familia de miR398 identificadas en leguminosas.

Organismo	miRNA	Secuencia	Mapeo	Posición	Base de datos
<i>Phaseolus vulgaris</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Chr02	9731143..9731163	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Chr08	54890009..54890029 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGUUCUG	Chr06	29983237..29983257 (-)	
<i>Phaseolus coccineus</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	QBDZ01159137	1394..1414 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QBDZ01190595	19025-19045 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGUCCUC	QBDZ01192480	2117..2137	
<i>Phaseolus acutifolius</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	EST: HO796397	1043..1063 (-)	NCBI
<i>Vigna radiata</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	scaffold_100	976412..976432	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Vr06	2914498..2914518 (-)	
<i>Vigna angularis</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	vigan.scaffold_5	327943..327963	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Va01	5116345..511636	
<i>Vigna unguiculata</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Vu02	19512207..19512227	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAUGACUUUU	Vu02	19522073..19522093	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Vu08	35309954..35309974	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Vu06	33097218..33097238 (-)	
<i>Glycine max</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Chr02	11081015..11081035 (-)	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Chr01	7214768..7214768 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Chr08	14229989..14230009 (-)	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Chr02	46102437..46102457	
	miR398e	UGUGUUUUCAGGUCACCAUG	Chr14	2694696..2694716 (-)	
	miR398f	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Chr15	4337756..4337776	
<i>Glycine soja</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	CM009366	7311716..7311736 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	CM009367	11364601..11364621 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM009373	14536894..14536914 (-)	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM009367	48771094..48771114	
	miR398e	UGUGUUUUCAGGUCACCAUG	CM009379	2816972..2816992 (-)	
	miR398f	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM009380	4356798..4356818	
<i>Cajanus cajan</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Cc06	7041889..7041909	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Cc02	12942141..12942161	
<i>Lotus japonicus</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Lj0	55824356..55824376 (-)	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Lj0	93079050..93079070	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Lj3	16549333..16549353 (-)	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Lj2	38990632..38990652	
<i>Cicer arietinum</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Ca2	22138145..22138165	LIS

	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Ca2	4829006..4829026 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Ca2	4880660..4880680 (-)	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Ca2	4742878..4742898	
<i>Cicer reticulatum</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	CM010872	22687187..22687207	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM010872	4053621..4053641	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM010872	4137572..4137592 (-)	
<i>Cicer echinospermum</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	PGTU01016578	14915..14935 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	PGTU01018136	238749..238769	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	PGTU01018136	321878..321898 (-)	
<i>Medicago truncatula</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	chr5	19181153..19181173 (-)	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	chr5	38762041..38762061	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	chr7	3768799..3768819 (-)	
<i>Trifolium pratense</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Tp57577_LG2	8753507..8753527	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Tp57577_LG2	18586621..18586641	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Tp57577_LG4	2422070..2422090 (-)	
<i>Trifolium medium</i>	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	LXQA011140102	148..168 (-)	NCBI
<i>Trifolium subterraneum</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	DF973777	105122..105142	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	DF973242	64770..64790	
<i>Pisum sativum</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	PUCA013739517	14511..14531	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	PUCA012795113	19254..19274 (-)	
<i>Lens culinaris</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	LcChr5	55469814..55469834 (-)	KnowPulse
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	LcContig611472	11320..11340	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGUUCCUG	LcChr3	173110615..173110635 (-)	
<i>Arachis duranensis</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Aradu.A09	104766867..104766887	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Aradu.A07	4959034..4959054	
<i>Arachis ipaensis</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Araip.B09	127447277..127447297 (-)	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Araip.B03	5114128..5114148	
<i>Arachis hypogaea</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Arahy.07	57200647..57200667 (-)	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Arahy.09	105785997..105786017 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	Arahy.19	137958044..137958064 (-)	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Arahy.07	4028484..4028504 (-)	
	miR398e	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Arahy.13	5221799..5221819	
<i>Arachis monticola</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	CM009791	13457618..134576838 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	CM009781	104209227..104209247 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QBTX01000189	114738..114758	
	miR398d	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	CM009785	6526804..6526824	
<i>Nissolia schottii</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	QANU01088005	166936..166956	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	QANU01070409	10590..10610 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QANU01029087	10731..10751	
<i>Lupinus angustifolius</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	NLL-11	7727180..7727200	LIS
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	NLL-09	21047182..21047202 (-)	
<i>Mimosa pudica</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUA	QANV01072731	137075..137095 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUA	QANV01054059	5580..5600	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QANV01051282	29875..29895	
<i>Cercis Canadensis</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU	QAOA01003368	343714..343734 (-)	NCBI
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QAOA01003028	484703..484723 (-)	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	QAOA01002999	272469..272489	

<i>Arabidopsis thaliana</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Chr2	1041012..1041032	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUCACCCU G	Chr5	4691107..4691127	
	miR398c	UGUGUUCUCAGGUCACCCU G	Chr5	4694778..4694798	
<i>Oryza sativa</i>	miR398a	UGUGUUCUCAGGUCACCCUU	Chr10	9216260..9216280 (-)	Phytozome
	miR398b	UGUGUUCUCAGGUC G CCCU G	Chr7	14598627..14598647 (-)	

Se describe el nombre de la especie, las isoformas identificadas para miR398, el mapeo o el fragmento donde se localizó la secuencia mostrada, la posición donde se encuentra dicha secuencia y, por último, la fuente o base de datos donde fue recolectada la información (NCBI, Phytozome, Legume Information System (LIS) y KnowPulse). En las secuencias, la base en gris resalta el cambio de base con respecto a la secuencia de *P. vulgaris*. En mapeo, EST (*Expressed Sequence Tag*), Chr: Chromosome, contig, scaffold o número de identificador indica secuencias o fragmentos ensamblados del genoma. En posición, (-) indica que la secuencia se encuentra en sentido de la cadena opuesta. Las secuencias de miR398 de *A. thaliana* y de *Oryza sativa* (arroz) fueron obtenidas de (Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Sunkar and Zhu, 2004) respectivamente, y localizadas en la base de datos de Phytozome.

Tabla 4. Secuencias de miR2119 identificadas en leguminosas.

Organismo	Secuencia	Mapeo	Posición	Base de datos	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	miR2119	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	Chr02	9731434..9731454	Phytozome
<i>Phaseolus coccineus</i>	miR2119	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	QBDZ01159137	1123..1143 (-)	NCBI
<i>Phaseolus acutifolius</i>	miR2119	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	HO796397	845..865 (-)	NCBI
<i>Vigna radiata</i>	miR2119	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	scaffold_100	976653..976673	LIS
<i>Vigna angularis</i>	miR2119	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	vigan.scaffold_5	328184..328204	LIS
<i>Vigna unguiculata</i>	miR2119a	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	Vu02	19512408..19512428	LIS
	miR2119b	UCAA A AGGAGUUGCAGU G GA A	Vu02	19522269..19522289	
<i>Glycine max</i>	miR2119a	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	Chr02	11080751..11080771 (-)	Phytozome
	miR2119b	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	Chr01	7214498..7214518 (-)	
<i>Glycine soja</i>	miR2119a	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	CM009366	7311446..7311466 (-)	NCBI
miR2119b	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	CM009367	11364337..11364357(-)		
<i>Cajanus cajan</i>	miR2119	C CAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	Cc06	7042140..7042160	LIS
<i>Lotus japonicus</i>	miR2119	U A AAAGGGAG G UGUG G AG U AG	Lj0	55824002..55824022 (-)	LIS
<i>Cicer arietinum</i>	miR2119	UCAAAGGGGG G UGAG G AG U AG	Ca2	22138566..22138586	LIS
<i>Cicer reticulatum</i>	miR2119	UCAAAGGGGG G UGAG G AG U AG	CM010872	22687608..22687628	NCBI
<i>Cicer echinospermum</i>	miR2119	UCAAAGGGGG G UGAG G AG U AAA	PGTU01016578	14495..14516 (-)	NCBI
<i>Medicago truncatula</i>	miR2119	UCAAAGGGAG G UGUG G AG U AG	chr5	19180857..19180877 (-)	Phytozome

<i>Trifolium pratense</i>	miR2119a	UCAAAGGGAGGUGUGGAGUAG	Tp57577_LG2	8753814..8753834	Phytozome
	miR2119b	UCAAAGGGAGGUGUGGAGUAG	Tp57577_LG2	18586895..18586915	
<i>Trifolium subterraneum</i>	miR2119	UCAAAGGGAGGUGUGGAGUAG	DF973777	105429..105449	NCBI
<i>Pisum sativum</i>	miR2119	UCAAAGGGAGGUGUGGAGUAG	PUCA013739517	14784..14804	NCBI
<i>Lens culinaris</i>	miR2119	UCAAAGGGAGGUGUGGAGUAG	LcChr5	55469494..55469514 (-)	KnowPulse
<i>Arachis duranensis</i>	miR2119	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	Aradu.A05	99398826..99398846	LIS
<i>Arachis ipaensis</i>	miR2119	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	Araip.B05	125440050..125440070 (-)	LIS
<i>Arachis hypogaea</i>	miR2119a	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	Arahy.05	105338161..105338181	LIS
	miR2119b	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	Arahy.15	135468696..135468716 (-)	
<i>Arachis monticola</i>	miR2119a	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	CM009777	16950280..16950300 (-)	NCBI
	miR2119b	UAAAAGUGAGGUGUAGAGUAA	CM009774	7666305..7666325 (-)	
<i>Nissolia schottii</i>	miR2119	UCAAAGAGAGUGUGUAGAGUAA	QANU01002159	196694..196714	NCBI

Se describe el nombre de la especie, las isoformas identificadas para miR2119, el mapeo o el fragmento donde se localizó la secuencia mostrada, la posición donde se encuentra dicha secuencia y, por último, la fuente o base de datos donde fue recolectada la información (NCBI, Phytozome, Legume Information System (LIS) y KnowPulse). En gris, se resalta el cambio de base con respecto a la secuencia de *P. vulgaris*. En mapeo, EST (*Expressed Sequence Tag*), Chr: Chromosome, contig, scaffold o número de identificador indica secuencias o fragmentos ensamblados del genoma. En posición, (-) indica que la secuencia se encuentra en sentido de la cadena opuesta.

Como se había descrito anteriormente, al analizar en conjunto las secuencias de miR398 y miR2119 en los genomas de la subfamilia de las Papilionoideae, encontramos que existen dos versiones que codifican para miR398. En particular, en los clados Millettioide y Hologalegina, la secuencia de miR398a siempre está ligada a miR2119, y en aquellas especies que tiene una copia adicional de miR2119 como *V. unguiculata*, *G. max* y *T. pratense*, encontramos siempre una isoforma miR398a asociada. Sin embargo, cuando analizamos la secuencia de miR398a y miR2119 en las especies del clado Dalbergioide (*A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. hypogaea*, *A. monticola* y *N. schottii*), estos dos miRNAs se encuentran localizados en regiones separadas. Estos resultados indican que existen dos *loci*, un *locus* que codifica para *MIR398a* y otro *locus* que codifica para *MIR2119*, que se encuentran como unidades de transcripción independientes.

Con base a la presencia de miR398 y miR2119 en los distintos clados de la subfamilia de las Papilionoideae se sugiere dos posibles eventos evolutivos que ocurrieron en este grupo. Como primer evento proponemos el surgimiento de miR2119 como *locus* independiente y como segundo evento, la conjunción de un precursor de miR398a con el precursor de miR2119 en un

mismo *locus* como un solo transcrito, es decir, la adquisición de un precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119, que en consecuencia coordina la expresión de estos miRNAs y a su vez, regula simultáneamente la expresión de sus mRNA blancos, *CSD1* y *ADH1*.

Evolutivamente, miR2119 probablemente haya emergido después de la separación del clado de Genistoide, en el ancestro común que dió lugar a los clados Dalbergioide y Hologalegina-Millettioide hace ~55-56 Millones de años (Ma) (Figura 27). De acuerdo con esta idea, no se identificó la secuencia de miR2119 en la especie *L. angustifolius*, representante del clado Genistoide de la subfamilia de las Papilionoideae, y tampoco en las especies más alejadas en términos evolutivos como *M. púdica* y *C. canadensis*, las cuales pertenecen a las subfamilias Caesalpinioideae y Cercidoideae, respectivamente. Sin embargo, no podemos descartar que *L. angustifolius*, *M. pudica* y *C. canadensis* hayan sufrido la pérdida de la secuencia de miR2119 ó que existan errores de secuenciación en la primera versión de ensamble y anotación de estos genomas, que impida su identificación. Finalmente, otra opción es que la secuencia de miR2119 en estas especies sea distinta a las secuencias identificadas en los clados de Dalbergioide, Hologalegina y Millettioide, lo cual nos impediría reconocerla.

El segundo proceso evolutivo que es interesante de analizar es la unión de los precursores pre-miR398 y pre-miR2119, con ello la adquisición de un precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119 en los clados de Hologalegina y Millettioide de la subfamilia de las Papilionoideae. Este evento probablemente surgió en el ancestro común de los clados Millettioide y Hologalegina entre ~50-55 Ma, después de su separación de los Dalbergioide (Figura 27). Sin duda, la selección de este proceso podría representar una estrategia ventajosa para las especies pertenecientes a los clados Hologalegina y Millettioide para coordinar la función de los miRNAs, ya que están siendo regulados por el mismo promotor. La adquisición del precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119 sugiere fuertemente estar ligado al metabolismo, probablemente para coordinar la actividad de las enzimas que codifican sus mRNA blancos, *CSD1* y *ADH1*, involucradas en la regulación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y la participación en la vía de la fermentación, respectivamente.

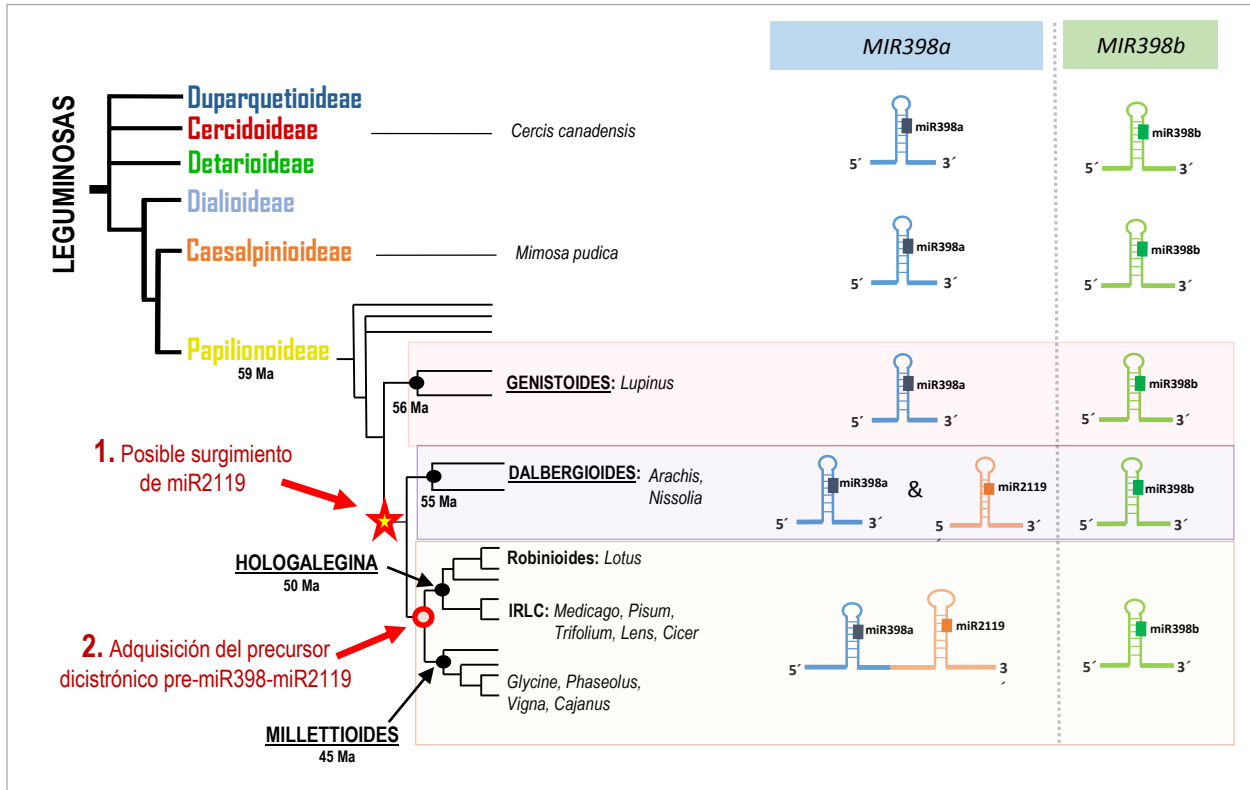


Figura 27. Posible surgimiento de miR2119 y la adquisición del precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119* en la subfamilia de las Papilionoideae. En la subfamilia de la Papilionoideae se encuentran cuatro clados importantes Genistoides, Dalbergioideae, Hologalegina y Millettioideae. La estrella señalada con la flecha (en color rojo) indica el probable punto de surgimiento de miR2119 entre el ancestro común de los clados Dalbergioideae y Hologalegina-Millettioideae. El círculo en rojo indica la adquisición del precursor pre-miR398a-miR2119, el cual probablemente surgió en el ancestro común de los clados Hologalegina y Millettioideae. El diagrama de árbol de la familia de las leguminosas fue tomado, modificado y actualizado de la revisión de (Gepts et al., 2005).

IX.XI Eventos de duplicación del gen ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae

Previamente, la predicción de mRNAs blancos de miR2119 en *P. vulgaris* arrojó como a mejor candidato el transcrito que codifica para enzima ADH1. Además, ADH1 fue también el mejor candidato para ser blanco de miR2119 en *P. acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *A. hypogaea* y *L. japonicus*. Sin embargo, las leguminosas poseen más de una copia del gen que codifica para ADH1, probablemente debido a eventos de duplicación génica. En el genoma de *P. vulgaris* se encontraron cuatro genes que codifican para la enzima de ADH1, los cuales fueron nombrados como ADH1.1 (Phvul.009G134700), ADH1.2 (Phvul.001G064000), ADH1.3 (Phvul.001G067300) y ADH1.4 (Phvul.009G149500). Nuestros datos muestran que *ADH1.1*, *ADH1.2* y *ADH1.3* conservan el sitio de apareamiento entre ADH1:miR2119 con valores similares de estabilidad termodinámica de -31.6 kcal/mol, -34.6 kcal/mol, -34.2 kcal/mol, respectivamente (Figura 13). Aunado a esto, *ADH1.1* y *ADH1.2* fueron validadas experimentalmente como mRNAs blanco de miR2119 (resultados mostrados en antecedentes y en el capítulo anterior, respectivamente). En cambio, *ADH1.4* se descartó como posible mRNA blanco por su bajo valor de estabilidad termodinámica (-15.5 kcal/mol), reflejado en su débil interacción con miR2119 (Figura 13).

Para complementar nuestro análisis, exploramos la historia evolutiva de los genes que codifican para ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae. Para esto, se extrajeron las secuencias de proteína de los genes homólogos que están anotados como ADH1 en los genomas disponibles de especies representantes de los clados Millettioide (*P. vulgaris*, *V. unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata* y *C. cajan*), Hologalegina (IRLC: *M. truncatula*, *T. pratense* y *C. arietinum*; Robinioides: *L. japonicus*), Dalbergioide (*A. duranensis*, *A. ipaensis* y *A. hypogaea*) y Genistoide (*L. angustifolius*). Las bases de datos utilizadas para extraer las secuencias de aminoácidos de cada proteína homóloga de ADH1 fueron LIS y Phytozome.

El estudio filogenético de ADH1 se realizó utilizando un total de 67 secuencias de proteína, entre las cuales también se incluyeron cinco secuencias de ADH1 de especies que se encuentran fuera del grupo de las leguminosas como *A. thaliana*, *Prunus pérsica* (durazno), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Cucumis sativus* (pepino) y *Vitis vinifera* (uva), así como inclusión de la secuencia de la proteína de ADH2 (AT5G43940.1) de *A. thaliana* como grupo externo. Con base en el análisis filogenético, hemos definido cuatro clados referentes ADH1 en la subfamilia de la Papilionoideae de las leguminosas. Cada uno de estos clados incluían uno de los cuatro genes de *P. vulgaris* (Figura 28, resaltado en azul, verde, gris y anaranjado en cada clado indica ADH1.4, ADH1.1, ADH1.2 y ADH1.3, respectivamente). Denominamos estos clados como ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4, según la terminología de los genes correspondientes de *P. vulgaris*.

En conjunto con el análisis de los clados obtenidos, para cada secuencia de ADH1 de la subfamilia de las Papilionoideae utilizada en el árbol filogenético, se analizó el potencial sitio de apareamiento entre ADH1:miR2119 en secuencia nucleotídica y se calculó su estabilidad termodinámica mediante el programa RNA hybrid, excepto, para las secuencias de ADH1 de *L. angustifolius* por carecer de la secuencia de miR2119.

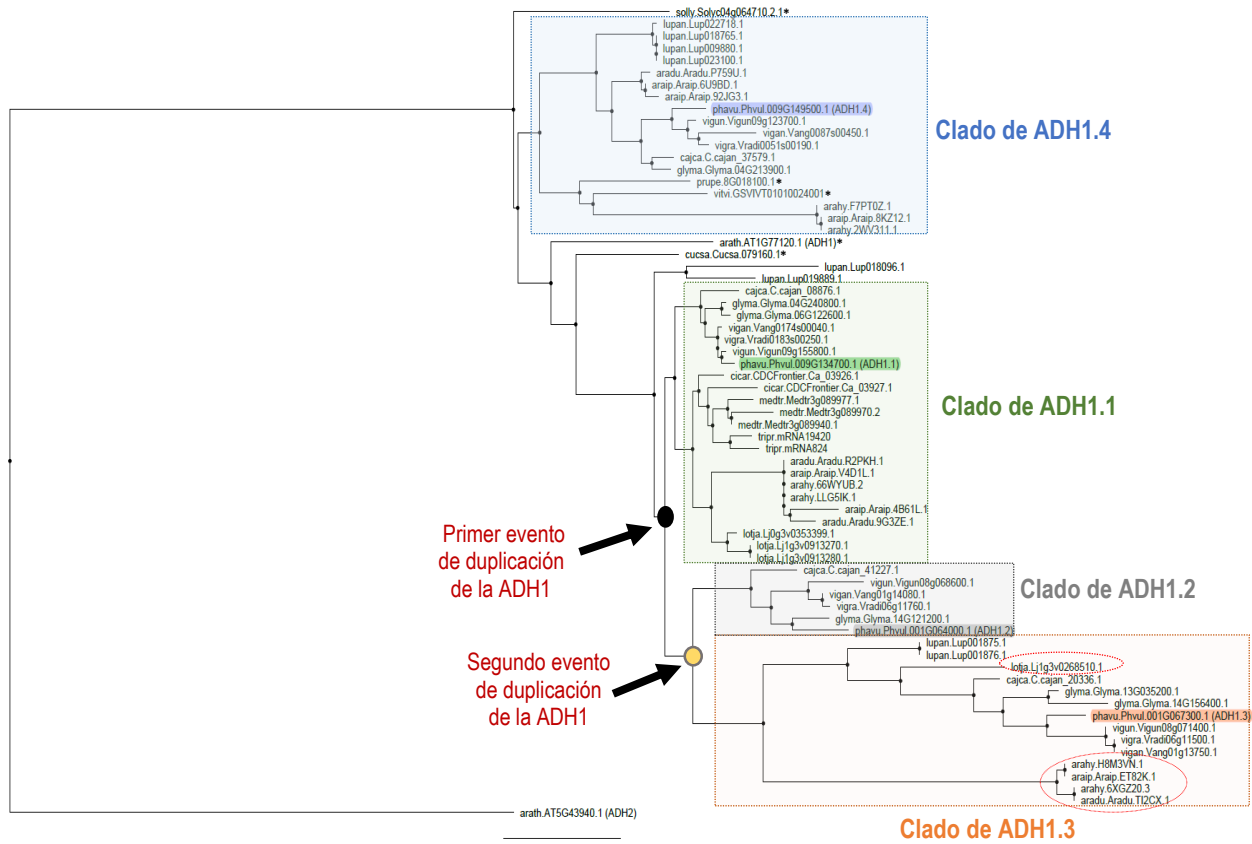


Figura 28. Análisis filogenético de ADH1 en la subfamilia de la Papilionoideae. El árbol filogenético se realizó con 67 secuencias de proteína de ADH1, las cuales se alinearon con el programa Muscle v3.8.31. Después, se empleó el programa de ProtTest 3.4.2 y se obtuvo el modelo JTT+G. Se reconstruyó la filogenia con el programa PhyML 3.0 mediante el método de Máxima verosimilitud (ML). El árbol filogenético fue visualizado con el programa FigTree v1.4.3. Los nodos negro y amarillo señalados con una flecha indican eventos de duplicación de ADH1. Los clados de ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4 están señalados con el rectángulo de color verde, gris, anaranjado y azul, respectivamente. Además, se incluyeron cinco secuencias de ADH1 de las especies fuera del grupo de las leguminosas como *A. thaliana* (arath.AT1G77120.1), *P. pérsica* (prupe.8G018100.1), *S. lycopersicum* (solly.Solyc04g064710.2.1), *C. sativus* (cucsa.Cucsa.079160.1) y *V. vinifera* (vitvi.GSVIVT01010024001) indicadas con asterisco, así como la inclusión de la secuencia de la proteína de ADH2 (arath.AT5G43940.1) de *A. thaliana* como grupo

externo. La línea horizontal y el número indicado en la parte inferior del árbol, representan una escala que muestra el promedio del número de sustituciones de aminoácidos por sitio en la filogenia.

La secuencia basal (o ancestral) del árbol filogenético de ADH1 es la de *S. lycopersicum* (tomate). El clado denominado ADH1.4 incluye secuencias de las especies del clado Millettioide y Dalbergioide, así como cuatro copias de ADH1.4 pertenecientes a la especie de *L. angustifolius* del clado Genistoide (Figura 28, indicado en el rectángulo azul). Otras secuencias que se agrupan dentro del clado ADH1.4, provienen de *A. hypogaea* y de *A. ipaensi*, y también se asocian las secuencias de las especies más alejadas evolutivamente como *P. pérsica* (durazno) y *V. vinifera* (uva). Es importante notar que todas las secuencias del clado ADH1.4 tienen un apareamiento de bases ADH1.4:miR2119 deficiente debido a múltiples desapareamientos y presentan un valor de estabilidad termodinámica ≥ -22.6 Kcal/mol, por lo que no se predicen como mRNAs blanco de miR2119 (Figura 29). A partir de estas observaciones, sugerimos que el clado de ADH1.4 representa la ADH1 ancestral en la subfamilia de las Papilionoideae.

Interesantemente, en el árbol filogenético podemos definir dos nodos donde se sugiere dos eventos de duplicación de ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae. El primer evento de duplicación ocurrió a partir de ADH1.4, que generó los clados ADH1.1 y el probable ancestro común entre los clados ADH1.2 y ADH1.3 (se indica el nodo de color negro en la Figura 28).

El grupo de ADH1.1 fue donde obtuvimos el mayor número de secuencias de ADH1 pertenecientes a las especies de los clados Millettioide, Hologalegina, Dalbergioide (Figura 28, clado ADH1.1 está señalado con el rectángulo de color verde). Para cada secuencia del clado ADH1.1 se evaluó el apareamiento con miR2119 mediante el programa RNAhybrid. Los resultados mostraron que el apareamiento fue energéticamente favorable para todos los pares ADH1.1:miR2119 (Figuras 30, 31 y 32 clados Hologalegina, Millettioide y Dalbergioide, respectivamente). Por ejemplo, en el clado Hologalegina, *M. truncatula* contiene tres copias que codifican para ADH1 que se agrupan en el clado ADH1.1 y conservan el sitio de unión con miR2119, al igual que las dos copias ADH1.1 que se encuentran en *T. pratense* y en *C. arietinum* (Figura 30). Casos similares se presentaron para los clados Millettioide y Dalbergioide (Figuras 31 y 32, respectivamente).

Adicionalmente, en el árbol filogenético existe un nodo donde se sugiere un segundo evento de duplicación que generó los clados de ADH1.2 y de ADH1.3 (circulo de color amarillo en la Figura 28). Por un lado, el clado ADH1.2 contiene secuencias exclusivamente de las Millettioide (*P. vulgaris*, *V. unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata* y *C. cajan*), donde sólo se encuentra un parólogo que codifica para ADH1.2 en cada especie que mantienen el sitio de

(Phvul.009G149500.1), *V. unguiculata* (Vigun09g123700.1), *V. radiata* (Vradi0051s00190.1), *V. angularis* (Vang0087s00450.1), *G. max* (Glyma.04G213900.1), *C. cajan* (C.cajan_37579.1), *A. duranensis* (Aradu.P759U.1), *A. ipaensis* (Araip.6U9BD.1, Araip.92JG3.1 y Araip.8KZ12.1) y *A. hypogaea* (Arahy.F7PT0Z y Arahy.2WV311.1). El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-". La estabilidad termodinámica del apareamiento miRNA:mRNA fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) representado en unidades kcal/mol (ΔG).

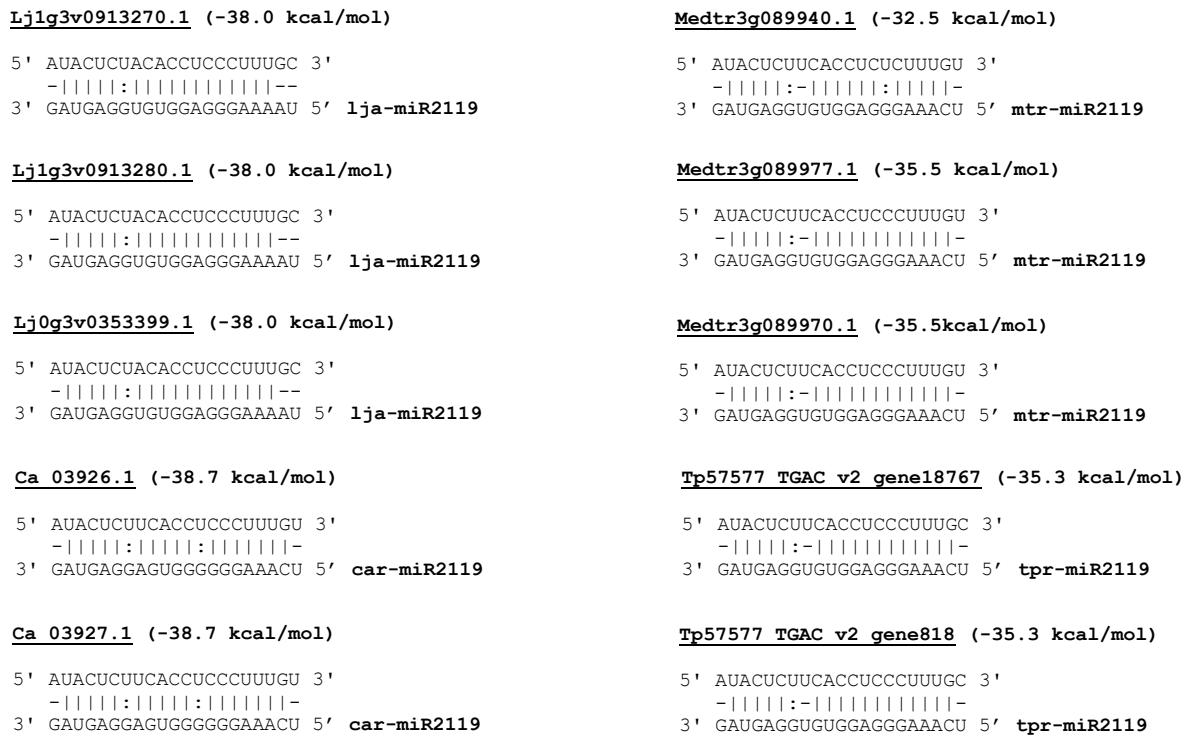


Figura 30. Conservación del sitio de apareamiento de miR2119 en los transcritos de ADH1.1 en el clado de Hologalegina. Conservación del sitio de unión de miR2119 en ADH1 de leguminosas como *L. japonicus* (Lj1g3v0913270.1, Lj1g3v0913280.1 y Lj0g3v0353399.1), *M. truncatula* (Medtr3g089940.1, Medtr3g089977.1 y Medtr3g089970.1), *C. arietinum* (Ca_03926.1 y Ca_03927.1), *T. pratense* (Tp57577_TGAC_v2_gene18767 y Tp57577_TGAC_v2_gene818). El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-". La estabilidad termodinámica del apareamiento entre miRNA:mRNA fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid, representado en unidades kcal/mol (ΔG).

Phvul.009G134700.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3' ADH1.1
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' pvu-miR2119

Vigun09g155800.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' vun-miR2119

Vang0174s00040.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' van-miR2119

Vradi0183s00250.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' vra-miR2119

Glyma.06G122600.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' gma-miR2119a/b

Glyma.04G240800.1 (-31.6 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' gma-miR2119a/b

C.cajan_08876.1 (-34.8 kcal/mol)

5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
-|||:||||-|||||||
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACC 5' cca-miR2119

Figura 31. Conservación del sitio de apareamiento de miR2119 en los transcritos de ADH1.1 en el clado de Millettioide. Conservación del sitio de miR2119 en el clado de *ADH1.1* de *P. vulgaris* (Phvul.009G134700.1), *V. unguiculata* (Vigun09g155800.1), *V. angularis* (Vang0174s00040.1), *V. radiata* (Vradi0183s00250.1), *G. max* (Glyma.06G122600.1 y Glyma.04G240800.1) y *C. cajan* (C.cajan_08876.1). El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y despareamiento indicado por "-". La estabilidad termodinámica del apareamiento entre miRNA:mRNA blanco fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid, representado en unidades kcal/mol (ΔG).

Aradu.R2PKH (-32.3 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Adu-miR2119
```

Araip.V4D1L (-32.1 kcal/mol)

```
5' AUUCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Aip-miR2119
```

Aradu.9G3ZE (-32.1 kcal/mol)

```
5' AUUCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Adu-miR2119
```

Araip.4B61L (-32.1 kcal/mol)

```
5' AUUCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Aip-miR2119
```

Arahy.66WYUB.2 (-32.1 kcal/mol)

```
5' AUUCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Ahy-miR2119
```

Arahy.LLG5IK.1 (-32.1 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCACUUUGC 3'
  -|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
3' AAUGAGAUGUGGAGUGAAAAU 5' Ahy-miR2119
```

Figura 32. Conservación del sitio de apareamiento de miR2119 en los transcritos de ADH1.1 en el clado Dalbergioide. Conservación del sitio de unión de miR2119 en ADH1 de *A. duranensis* (Aradu.R2PKH y Aradu.9G3ZE), *A. ipaensis* (Araip.V4D1L y Araip.4B61L) y *A. hypogaea* (Arahy.66WYUB.2 y Arahy.LLG5IK.1). El apareamiento de bases es representado por “|”, apareamiento wobble indicado con “.” y desapareamiento indicado por “-”. La estabilidad termodinámica del apareamiento entre miRNA:mRNA fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid, representado en unidades kcal/mol (ΔG).

Phvul.001G064000.1 (-34.6 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3' ADH1.2
  -|||:||||-|-----|-----|-----|-----|
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' pvu-miR2119
```

Vang01g14080.1 (-34.6 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
  -|||:||||-|-----|-----|-----|-----|
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' van-miR2119
```

Glyma.14G121200.1 (-31.6 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
  -|||:||||-|||:||||-
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' gma-miR2119a/b
```

Vigun08g068600.1 (-30.6 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
  -|||:||||-|-----|-----|-----|-----|
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' vun-miR2119
```

Vradi06g11760.1 (-34.6 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
  -|||:||||-|-----|-----|-----|-----|
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' vra-miR2119
```

C.cajan 41227.1 (-31.8 kcal/mol)

```
5' AUCCUCUACACCUCUUUGC 3'
  -|||:||||-|-----|-----|-----|-----|
3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACC 5' cca-miR2119
```

Figura 33. Conservación del sitio de apareamiento de miR2119 en los transcritos de ADH1.2 en el clado de Millettioide. Conservación del sitio de miR2119 en el clado de *ADH1.2* de *P. vulgaris* (Phvul.001G064000.1), *G. max* (Glyma.14G121200.1), *V. radiata* (Vradi06g11760.1), *V. angularis* (Vang01g14080.1), *V. unguiculata* (Vigun08g068600.1) y *C. cajan* (C.cajan_41227.1). El apareamiento de bases es representado por “|”, apareamiento wobble indicado con “.” y desapareamiento indicado por “-”. La estabilidad termodinámica del apareamiento miRNA:mRNA fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid, representado en unidades kcal/mol (ΔG).



Figura 34. Predicción del sitio de apareamiento de miR2119 en los transcritos de ADH1.3 en los clados de Millettioide, Hologalegina y Dalbergioide. Conservación del sitio de miR2119 en el clado de *ADH1.3* de *P. vulgaris* (Phvul.001G067300.1), *V. unguiculata* (Vigun08g071400.1), *V. angularis* (Vang01g13750.1), *V. radiata* (Vradi06g11500.1), *G. max* (Glyma.13G035200.1 y Glyma.14G156400.1) y *C. cajan* (C.cajan_20336.1). Además, secuencias de *ADH1.3* de los clados Hologalegina perteneciente a *L. japonicus* (Lj1g3v0268510.1) y del clado Dalbergioide como *A. ipaensis* (Araip.ET82K.1), *A. duranensis* (Aradu.TI2CX.1) y *A. hypogaea* (Arahy.6XGZ20.3 y Arahy.H8M3VN.1). El apareamiento de bases es representado por "|", apareamiento wobble indicado con ":" y desapareamiento indicado por "-". La estabilidad termodinámica del apareamiento miRNA:mRNA fue obtenido utilizando el programa RNA hybrid, representado en unidades kcal/mol (ΔG).

Dentro del clado *ADH1.3*, en la especie de *L. angustifolius* del clado Genistoide se encuentran dos parálogos de *ADH1* (Lup001875.1 y Lup001876.1). Sorpresivamente, ambas secuencias conservan el sitio de unión de miR2119 (Figura 35), a pesar de que no fuimos

capaces de identificar a miR2119 en este genoma. No podemos descartar la posibilidad de que estos dos parálogos de la ADH1.3 pudieran ser reconocidas y reguladas por miR2119 que aún no ha sido anotado en *L. angustifolius*.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

          **  ***  *  *****
Phvul.001G067300.1  ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Vigun08g071400.1  ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Vradi06g11500.1   ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Vang01g13750.1   ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Glyma.13G035200.1 ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Glyma.14G156400.1 ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
C.cajan_20336.1   ATCCTCTCAACTCCCTTTGC
Ljl1g3v0268510.1  ATACTCTCAACTCTCTTTGC
Lup001875.1       ATCCTCTACAATTCTTTGC
Lup001876.1       ATCCTCTACAATTCTTTGC
Arahy.H8M3VN.1    ATCCTCTACACTAGTCTTGT
Arahy.6XGZ20.3    ATCCTCTACACTAGTCTTGT
Araip.ET82K.1     ATCCTCTACACTAGTCTTGT
Aradu.TI2CX.1     ATCCTCTACACTAGTCTTGT

```

Figura 35. Análisis comparativo del sitio de unión de miR2119 en las secuencias del clado de ADH1.3. Alineamiento con clustal O de las secuencias en el sitio de unión de miR2119 en ADH1.3 en los clados de Millettioide, Hologalegina, Dalbergioide y Genistoide de la subfamilia de las Papilionoideae indicados con el rectángulo naranja, amarillo, verde y azul, respectivamente. Los cambios en la posición son resaltados en gris con respecto a las secuencias del clado Millettioide.

Podemos resumir el análisis de secuencia de ADH1 con base a la presencia o ausencia de los parálogos de ADH1 identificados en los clados de la subfamilia de las Papilionoideae. En el clado Genistoide se encontraron parálogos de la posible ADH1 (Lup018096 y Lup019889 en *L. angustifolius*) que dió origen a los clados ADH1.1 y ADH1.3, así como los parálogos de ADH1.3 y ADH1.4. El clado de Dalbergioide mantiene las secuencias del clado ADH1.1, ADH1.3 y ADH1.4. En las Hologaleginas, *L. japonicus* especies del subclado Robinioide, presenta los clados ADH1.1 y ADH1.3, con la posible pérdida de ADH1.4; mientras que las especies del subclado IRLC sólo contiene parálogos de ADH1.1 y se sugiere la posible pérdida de ADH1.3 y ADH1.4. Por último, los Millettioides contiene secuencias de los clados ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4. Interesantemente, en éste grupo se encuentra el surgimiento del clado ADH1.2 que es exclusivo de los Millettioides. En conjunto, cada especie de los clados de Dalbergioide, Hologalegina y Millettioide, comparten al menos el parálogo de ADH1.1 y esto correlaciona con la identificación de miR2119 en la subfamilia de las Papilionoideae.

IX.XII Análisis del sitio de unión de miR2119 consenso en los clados de ADH1 de la subfamilia de las Papilionoideae

En plantas, el sitio de apareamiento de un miRNA se puede localizar a lo largo del mRNA blanco, ya sea en las regiones 5'UTR, región codificante o en el 3' UTR (Brodersen et al., 2008). El sitio de unión de miR2119 en ADH1 se encuentra localizado en la región codificante, por lo que la conservación de la secuencia blanco puede estar determinada por la presión de selección tanto a nivel nucleotídico por mantener el reconocimiento por miR2119, así como por la identidad de aminoácidos en la secuencia de la proteína. Para tratar de analizar estos dos factores, se evaluó la conservación de la secuencia de ADH1 a niveles nucleotídico y proteico en la subfamilia de la Papilionoideae. Para esto, se tomaron las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para cada uno de los clados ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4. Se utilizó el programa Meme suite 5.0.4 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) para determinar la secuencia consenso del apareamiento de miR2119 en el transcrito de ADH1, así como el consenso de la secuencia codificante de este fragmento de 21 nt que coincide con el marco abierto de lectura +1 de la traducción de la proteína.

Las secuencias consenso muestran una alta similitud y conservación entre los clados ADH1.1 y ADH1.2 a nivel nucleotídico (Figura 36A), ambos mRNAs blanco validados experimentalmente en *P. vulgaris*. Además, se ha corroborado el corte de ADH1 mediada por miR2119 en otras especies como *M. truncatula* y *G. max* a través de la estrategia de degradoma o PARE (*Parallel analysis of RNA ends*) (Devers et al., 2011; Shamimuzzaman and Vodkin, 2012). La secuencia consenso del clado ADH1.3 mantiene cierta similitud con la de los clados ADH1.1 y ADH1.2, sólo que muestra variación en las posiciones 11-15 de nucleótidos y estas variaciones coinciden con los cambios que existen entre las secuencias de ADH1.3 en las especies *A. hypogaea*, *A. ipaensis* y *A. duranensis* mostradas en la Figura 35, lo cual provoca una burbujan en el apareamiento ADH1.3:miR2119 en la región semilla (Figura 34, panel derecho). Sin embargo, el consenso de nucleótidos en el clado ADH1.4 contiene un mayor número de variaciones en su secuencia con respecto a los otros consensos de las ADH1: muestra poca conservación en las posiciones 3-6 y 8-9, y contiene al menos cuatro posiciones (4, 6, 15 y 18, Figura 36A, posiciones señaladas con flechas en rojo) distintas en comparación con los clados de ADH1.1, ADH1.2 y ADH1.3. Esto se puede deber a que ADH1.4 no está sujeta a la regulación por miR2119, similar a los genes ADH1 de las especies no leguminosas. Como consecuencia de los cambios observados en los clados de ADH1, la región semilla de miR2119 es perfectamente complementaria a *ADH1.1*, *ADH1.2* y *ADH1.3* en *P. vulgaris*, la cual es

importante para mantener la regulación por parte del miRNA. En contraste, como ya se había mostrado, la secuencia de *ADH1.4* no es un buen blanco de miR2119 (Figura 36B).

A pesar de las diferencias mostradas en la secuencia reconocida por miR2119 a nivel de nucleótidos, las secuencias consenso de aminoácidos correspondientes en los clados *ADH1.1*, *ADH1.2*, *ADH1.3* y *ADH1.4* muestran alto grado de similitud entre sí (Figura 36A). La secuencia de siete aminoácidos se localiza en el dominio catalítico de la proteína y el residuo de cisteína (posición 7) es importante para la unión de ion Zinc, que es utilizado como cofactor por la enzima ADH1 (Strommer, 2011). Los aminoácidos correspondientes a las posiciones 5, 6 y 7 que codifican para serina, leucina y cisteína, respectivamente, están conservados y son idénticos en los cuatro clados de ADH1 de la subfamilia de las Papilionoideae. Sin embargo, el consenso de nucleótidos de *ADH1.4* muestra sustituciones sinónimas en la tercera posición de los codones 5 y 6, que son incompatibles con la regulación por miR2119, pero mantienen la identidad de los aminoácidos codificados. Por el contrario, estas mismas posiciones permanecen invariables en *ADH1.1*, *ADH1.2* y *ADH1.3*, sugiriendo una presión de selección adicional en estas secuencias para mantener la regulación por miR2119 (Figura 36A).

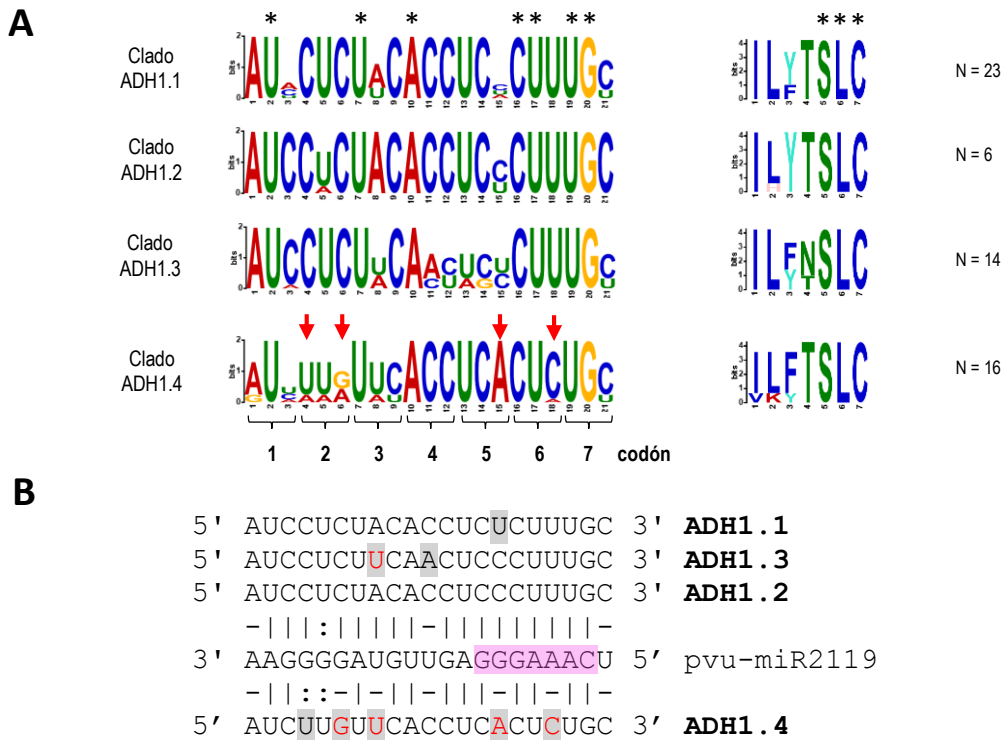


Figura 36. Secuencias consenso del sitio de reconocimiento de miR2119 en los cuatro clados de ADH1. A) Sitios consensos de los clados de ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4. Panel izquierdo muestra el sitio de apareamiento de miR2119 consenso de cada clado de ADH1 en nucleótidos y panel derecho muestra sitio consenso en aminoácidos. “N”: el número de secuencias utilizadas para realizar cada consenso y las llaves con número del 1-7 indica los codones que codifican para aminoácidos en la secuencia de ADH1 correspondiente al sitio de apareamiento con miR2119. Asterisco (*) indica la posición que se comparte entre las cuatro secuencias consenso, en nucleótidos y aminoácidos. Flechas rojas indican la posición de la secuencia consenso del clado ADH1.4 diferente al resto de los clados. **B)** Apareamiento de ADH1.1, ADH1.2, ADH1.3 y ADH1.4 con miR2119 de *P. vulgaris*. El apareamiento entre bases es representado por “|”, apareamiento wobble indicado con “:” y desapareamiento indicado por “-”. ADH1.2 muestra el mejor apareamiento con miR2119, en gris se indica el cambio de posición y aquellas posiciones en rojo indica sustitución de nucleótido que provoca un desapareamiento entre ADH1 con miR2119, en comparación con la secuencia de ADH1.2. Secuencia semilla (2-8 nt) del miR2119 es resaltada en rosa.

IX.XIII Posible origen de miR2119 a través de los eventos de duplicación de la ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae

Hay distintos modelos para explicar el origen de nuevos miRNAs en plantas. Un modelo considera la duplicación en tandem del gen que codifica el mRNA blanco en orientación opuesta. El transcrito de este nuevo gen adopta una estructura secundaria perfectamente complementaria, la cual es sustrato de DCL4 o DCL3 para generar múltiples RNAs pequeños (siRNA, *small interfering RNA*) y éstos a su vez, regular la expresión de genes homólogos, así como del transcrito de origen. Con el tiempo, la estructura secundaria acumula mutaciones que le permiten ser reconocido como un precursor de miRNA y ser procesado por DCL1, dando origen a un nuevo miRNA (Allen et al., 2004).

El modelo de duplicación del gen que produce el mRNA blanco en tándem como generador de nuevos miRNAs ha sido poco estudiado. Un ejemplo, es el estudio de la extensa familia de receptores NBS-LRR (Nucleotide-binding site Leucine rich repeat) asociada a la respuesta de defensa ante patógenos y ampliamente distribuida en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Se han descrito al menos ocho familias de miRNAs que regulan a los genes de NBS-LRR y un atributo en común es la conservación de la secuencia que sirve como sitio de unión en los mRNAs blanco, permitiendo la regulación de múltiples genes mediante un solo miRNA (Fei et al., 2016). Por ejemplo, los miembros de la familia miR482/2118 reconocen el sitio que codifica para el motivo conservado P-loop en los NBS-LRR (Shivaprasad et al., 2012). Recientemente, se identificó una alta frecuencia de duplicación en las diferentes familias de genes NBS-LRR y se asoció con la emergencia de un nuevo miRNA. Esto correlacionó con la extensa similitud que existe entre la secuencia precursora del miRNA y la secuencia de sus genes que producen los mRNAs blanco de NBS-LRR. Más aún, miRNAs que comparten alta similitud de la secuencia de su precursor con los genes de sus mRNAs blanco han emergido recientemente en linajes específicos como *MIR472*, *MIR825* y *MIR1885* en Brassicaceae; *MIR1510* y *MIR2089* en Fabaceae; *MIR6025* en Solanaceae, *MIR5163* y *MIR9863* en Poaceae (Zhang et al., 2016).

En nuestro estudio, se corroboró que miR2119 es un miRNA que sólo se encuentra en las especies de los clados Millettioide, Hologalegina y Dalbergioide de la subfamilia de las Papilionoideae. Asimismo, en conjunto con el análisis filogenético de ADH1 nos lleva a proponer que el surgimiento de miR2119 probablemente haya ocurrido durante los procesos de duplicación de la ADH1 en la subfamilia de las Papilionoideae. Dado que ADH1.1 se comparte en las especies que contienen miR2119, es probable que miR2119 haya emergido con base al modelo de duplicación del gen en tandem (orientación opuesta) por la duplicación del gen ADH1.1 o

posterior, a la divergencia entre ADH1.1 y ADH1.3 (Figura 37). Sin embargo, mediante comparación de secuencias no pudimos encontrar ninguna similitud entre el precursor de miR2119 y alguno de los genes de ADH1, esto se podría deber a las mutaciones acumuladas en el precursor durante el tiempo transcurrido desde su origen.

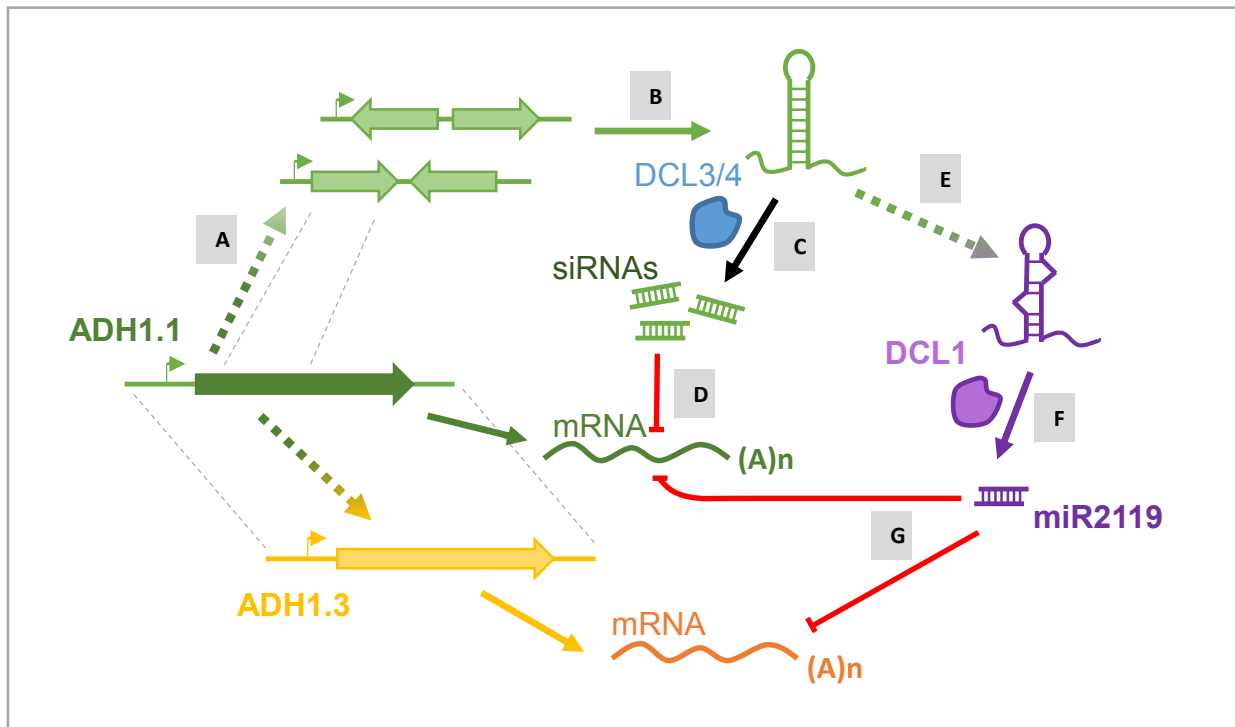


Figura 37. Origen y evolución de un nuevo miRNA, modelo de la duplicación del gen invertido. **A)** Duplicación del gen (en este caso ADH1.1) en tándem en sentido convergente o divergente. **B)** Transcripción del gen duplicado invertido y formación de una estructura secundaria perfectamente complementaria. **C)** Estructura secundaria reconocida por DCL3 o DCL4 para la generación de múltiples RNAs pequeños interferentes (siRNAs). **D)** siRNAs pueden inhibir la expresión del transcrito del gen de origen. **E)** La acumulación de mutaciones en la estructura secundaria genera complementariedad imperfecta y un nuevo precursor de miRNA (miR2119). **F)** Reconocimiento y procesamiento del precursor de miRNA por DCL1. **G)** Generación de un nuevo miRNA maduro y funcional puede inhibir al transcrito proveniente del gen duplicado (ADH1.1) o a una secuencia similar (tal como ADH1.3).

La formación de precursores de miRNAs policistrónicos en plantas puede tener distintos orígenes evolutivos. En el caso de miR395 se ha descrito múltiples miRNAs homólogos en el mismo transcrito en distintas especies, que pudieron originarse por eventos reiterados de

duplicación. Este arreglo resulta en una mayor acumulación del miRNA y consecuentemente en un mayor efecto de dosis sobre la represión de su mRNA blanco (Guddeti et al., 2005). Un caso diferente se ha descrito para precursores policistrónicos que contienen miRNAs no homólogos. Se ha propuesto que estos precursores policistrónicos se originaron a partir de un evento de duplicación del gen blanco, pero ésta duplicación generaría dos nuevos miRNAs con secuencia diferente que regularía a transcritos similares (Merchan et al., 2009). Durante nuestro estudio de *MIR398* y *MIR2119* nos percamos que en las especies pertenecientes al clado de Dalbergioide se encontraron separados los precursores de miR398 y de miR2119. En cambio, el precursor dicistrónico de pre-miR398-miR2119 se encontró en los clados Hologalegina y Millettioide, donde probablemente se formó a través de un proceso de recombinación o rearreglo que permitió la fusión de dos genes inicialmente separados para permitir la co-transcripción de ambos miRNAs, mostrando un nuevo mecanismo de generación de genes policistrónicos de miRNAs. Este rearreglo originó además nuevas oportunidades para la coordinación espacio/temporal de la expresión de sus mRNAs blanco, CSD1 y ADH1.

Sin duda, el análisis de los genomas disponibles de leguminosas nos permitió identificar elementos que nos ayudan a ligar el requerimiento de los procesos metabólicos en estas especies, en particular las especies de los clados Hologalegina y Millettioide de la subfamilia de las Papilionoideae, las cuales incursionaron en seleccionar un precursor policistrónico para coordinar la expresión de miR398 y miR2119, eliminando la necesidad de tener promotores individuales y factores de regulación adicionales para la expresión de ambos miRNAs, así ofreciendo una ventaja en coordinar simultáneamente la regulación de las Especies Reactivas de Oxígeno y la vía de la fermentación en este grupo particular de leguminosas.

CAPÍTULO III

IX.XIV Splicing alternativo del precursor pre-miR398a-miR2119 en *P. vulgaris*

Previamente, durante la tesis de maestría se confirmó que miR398a y miR2119 están contenidos en el mismo transcrito en *P. vulgaris*. Para esto, se realizó RT-PCR y se clonó la secuencia del precursor dicistrónico de pre-miR398a-miR2119, el cual proviene de un cDNA (482 nt) de hojas de plantas adultas de frijol. Además, se predijo su estructura secundaria mediante mFold (Figura 38). Interesantemente, se encontró un fragmento de 76 nt en la región espaciadora entre los precursores pre-miR398 y pre-miR2119 que cuenta con las características necesarias para ser considerado un intrón (De la Rosa, 2012).

Con el objetivo de elucidar y caracterizar el locus que produce el precursor pre-miR398a-miR2119 en el genoma de *P. vulgaris*, decidimos explorar la presencia del intrón y su posible papel en el proceso de splicing. Por ello, primero describiré una breve introducción de splicing en plantas y los pocos reportes que existen de splicing en genes *MIR*. Posteriormente, describiré la conservación de los sitios de splicing del precursor pre-miR398a-miR2119 en las leguminosas que contiene dicho precursor.

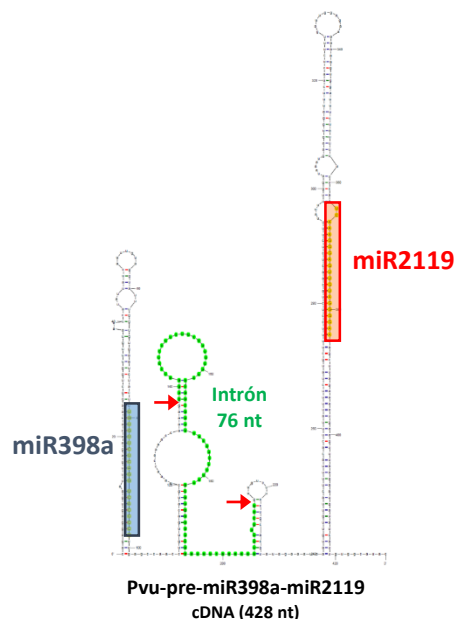


Figura 38. Estructura secundaria del precursor pre-miR398a-miR2119 de *P. vulgaris*. Predicción de estructura secundaria del precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119 determinada con el programa mFold. En rectángulo de color azul y rojo se muestra la secuencia madura de miR398a y miR2119,

respectivamente. En verde se resalta la secuencia del intrón predicho de 76 nt y las flechas en rojo indican los bordes de dicha secuencia.

El splicing es un proceso fundamental que regula la expresión génica en los eucariontes. Durante el splicing de transcritos que codifican para proteína, los intrones presentes en el transcrito primario (pre-mRNA) deben ser removidos y los exones adyacentes se unen para producir el mRNA que será traducido, este tipo de splicing es llamado splicing constitutivo (Lorkovic et al., 2000). La reacción está mediada por el spliceosoma, un complejo ribonucleoproteico (RNP) que reconoce secuencias en el pre-mRNA, llamados sitios de splicing (SS). El *core* del spliceosoma consiste en cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) y numerosas proteínas que se asocian y se ensamblan en la secuencia del intrón en un orden preciso. La selección del sitio de splicing es determinada no sólo por el *core* del spliceosoma, sino también por las distintas proteínas que se unen a RNA como las proteínas ricas en Serina y Arginina (SR) y ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs), las cuales se unen a elementos regulatorios localizados tanto en intrones como exones, ya sea para activar o reprimir el splicing (Laloum et al., 2018).

En plantas, la mayoría de los genes están interrumpidos por intrones, casi el 90%. Generalmente, los intrones de plantas son relativamente pequeños, su tamaño en promedio es de ~ 160 nt de longitud en comparación con intrones de animales ~ 5 kb, como el ser humano (Iwata and Gotoh, 2011; Marquez et al., 2012; Sakharkar et al., 2004). Sin embargo, las secuencias consenso de los sitios de splicing 5' y 3' (AG/GUAAGU y UGCAG/G, respectivamente), son muy similares entre los dos reinos (Lorkovic et al., 2000). Los bordes del intrón son comúnmente identificados como 5'-GU y AG-3', los cuales están altamente conservados y también son llamados sitio donador y sitio aceptor, respectivamente. En plantas, así como en otros organismos, el splicing es un proceso de dos pasos que involucra dos reacciones de trans-esterificación y la formación de un lazo. En el primer paso catalítico, el intrón es cortado en su extremo 5' y es unido covalentemente a la adenosina del sitio llamado punto de ramificación. Después, en el segundo paso catalítico, los exones aledaños son ligados y el intrón es removido en forma de un lazo (Sheth et al., 2006).

El splicing alternativo (AS) ocurre cuando los sitios de splicing son reconocidos de manera diferencial y se puede generar más de un transcrito distinto proveniente del mismo pre-mRNA. Los eventos de AS incluyen la selección distinta por el sitio de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS, respectivamente), retención de intrón (IR) y salto u omisión de exón (ES, por sus siglas en inglés, *exon skipping*) (Syed et al., 2012) (Figura 39). La inserción o eliminación de un fragmento alterno

en el mRNA puede generar cambios en los dominios de la proteína y así como, afectar su actividad enzimática, localización subcelular, interferir con la unión de cierta molécula o evitar modificaciones post-traduccionales importantes para su función (Laloum et al., 2018). En ocasiones, cuando el splicing alternativo causa cambio en el marco abierto de lectura (ORF), es posible que un codón de término prematuro (PTC) sea introducido en el mRNA. Proteínas específicas reconocen el PTC durante la primera ronda de la traducción y el transcrito es degradado a través de un sistema conocido como “*nonsense-mediated decay*” (NMD), el cual también controla la calidad de los transcritos normales y truncos (McGlincy and Smith, 2008; Nicholson and Muhlemann, 2010; Shaul, 2015).

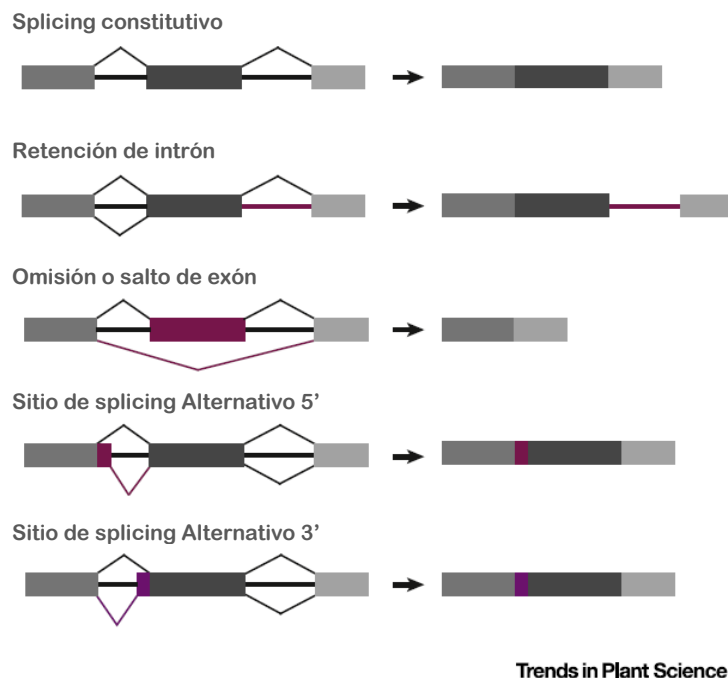


Figura 39. Tipos de splicing alternativo en plantas. Splicing constitutivo (CS) y distintos tipos de Splicing Alternativo como: Retención de intrón (IR), Omisión o salto de exón (ES), Sitio de splicing Alternativo 5' y 3' (Alt 5'SS y Alt 3'SS, respectivamente). Imagen tomada de (Laloum et al., 2018).

Recientemente, un análisis de RNA-seq mostró un incremento significativo en la frecuencia de splicing alternativo en *A. thaliana* donde más del 61% de los genes que contienen intrón presenta splicing alternativo, esto durante óptimas condiciones de crecimiento de la planta. Se predice que el número de eventos de AS aumente conforme se analicen diferentes tejidos en diferentes etapas de desarrollo y condiciones de crecimiento (Marquez et al., 2012).

A la fecha, existen pocos trabajos donde se han descrito que algunos genes *MIRNA* son regulados a nivel post-transcripcional a través de splicing alternativo como son *MIR400*, *MIR842* y *MIR846* (Jia and Rock, 2013; Yan et al., 2012b). En *Arabidopsis*, *MIR400* se encuentra localizado en un intrón del gen At1g32853 que codifica para una proteína. En condiciones de estrés por calor, el intrón es regulado por AS y resulta en el incremento del transcrito primario pri-miR400 pero disminuye la secuencia madura de miR400 (Yan et al., 2012b). La regulación de miR400 por AS parece ser importante para la tolerancia a estrés por calor debido a que mutantes sobre-expresoras de miR400 muestran disminución en la germinación y en el crecimiento de las plántulas durante dicho tratamiento (Yan et al., 2012b). Interesantemente, existe reporte de precursor policistrónico de *MIR842* y *MIR846* contenidos en el mismo transcrito que tiene procesamiento por AS y genera tres diferentes isoformas (Jia and Rock, 2013). Por un lado, miR846 resulta sólo en la isoforma 1 (Figura 40). La isoforma 2 e isoforma 3 no producen a miR846 debido a que la parte del precursor pre-miR846 que contiene la secuencia del miRNA estrella (miRNA*) es incluida en el intrón que es removido durante el splicing, evitando la formación de la estructura secundaria tipo tallo-asa. Por otro lado, miR842 se produce a partir de la isoforma 2 o posiblemente del intrón removido de la isoforma 1 e isoforma 3 (Figura 40). El AS de la isoforma 3 (isoforma no funcional) se genera un transcrito donde no contiene ningún miRNA. Durante el tratamiento con ABA exógeno en plántulas de *A. thaliana*, se ve afectado el pri-miRNA por AS donde se incrementa ligeramente la expresión de la isoforma 3 y disminuye la acumulación de la isoforma 1, como resultado se reprime la acumulación de los miRNAs. La predicción del mRNA blanco de miR842 y miR846, indica que ambos miRNAs reconocen al mismo transcrito, pero en distinta posición del gen AT5G28520 que codifica para una Lectina Jacalina, el cual fue validado experimentalmente por corte sólo para el sitio de unión de miR846. Además, los niveles de acumulación del transcrito de Jacalina incrementan en condiciones del tratamiento de ABA exógeno y correlacionan con la disminución de la acumulación de los miRNAs (Jia and Rock, 2013).

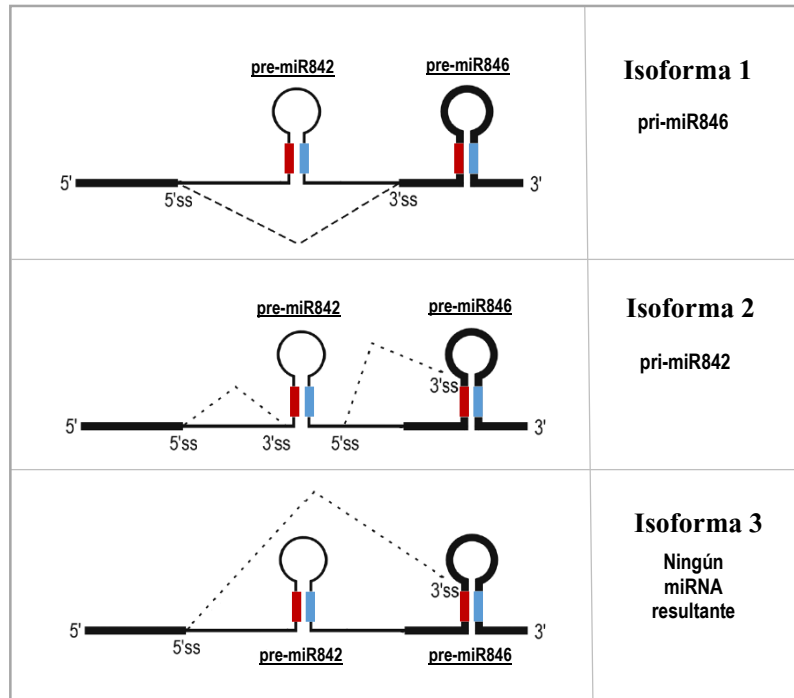


Figura 40. Splicing alternativo del policistrón *MIR842-MIR846*. En Arabidopsis, miR842 y miR846 se generan a partir de diferentes productos de splicing del mismo transcrito. Línea gruesa y delgada representa los exones y el intrón de la isoforma 1, respectivamente. Se representa el precursor de miR842 y miR846, miRNA maduro en rojo y miRNA* en azul. Los eventos de splicing se indican en línea discontinua para cada isoforma, así como sus sitios (5'SS y 3'SS). Al lado derecho, se muestra la isoforma generada por el splicing y el transcrito resultante. Imagen elaborada con referencia a las revisiones (Stepien et al., 2017; Szweykowska-Kulinska et al., 2013).

IX.XV Caracterización de los sitios de splicing alternativo del precursor pre-miR398a-miR2119 en *P. vulgaris*

Inicialmente, caracterizamos el gen *MIR398a-MIR2119* de *P. vulgaris*. Para buscar este gen en el genoma de *P. vulgaris*, disponible en la base de datos Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov), con programa BLASTN se utilizó como “query” la secuencia del precursor de pre-miR398a-miR2119 (428 nt de longitud) que fue obtenido a partir de un fragmento amplificado, el cual fue clonado y secuenciado (Figura 38). Se encontró que la secuencia del precursor pre-miR398a-miR2119 está localizada en el cromosoma 2 del genoma de *P. vulgaris* y la secuencia “query” correspondió a las coordenadas 8,673,939 - 8,674,367 (en la cadena positiva), indicada como “match:BLAST” en flecha de color turquesa con los recuadros representando a la secuencia madura de miR398a y miR2119 (Figura 41, color azul marino y rojo, respectivamente). Además, se cuenta con el análisis de los datos de “RNA-seq” donde se tiene lecturas de secuencias mapeadas al genoma de *P. vulgaris* y disponibles en el sitio de Phytozome, indicado con color verde en la parte inferior. Utilizando esta información, podemos definir el sitio del inicio y de término de la transcripción (SIT y STT, respectivamente) del locus *MIR398a-MIR2119* (posición: 8,673,910- 8,674,983) que da como resultado un transcrito de 1,073 nt de longitud (Figura 41). Sorpresivamente, nos percatamos de la existencia de secuencias de *EST's* (*Expressed Sequence Tag*) que se encuentran ensamblados y anotados en la región correspondiente al locus de *MIR398a-MIR2119*. En esta zona encontramos un ensamble de *EST* que no incluye a la secuencia de miR2119 (“asembl_1153.beanv10_pasa1”, en la Figura 41), lo cual nos sugirió la existencia de un procesamiento alternativo del transcrito del gen *MIR398a-MIR2119*. Para corroborarlo, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan la región de *MIR398a-MIR2119*, donde se espera la amplificación de un producto de PCR de 895 pb con base a la secuencia genómica (Figura 41).

Para confirmar la presencia de isoformas de transcritos del gen *MIR398a-MIR2119* en *P. vulgaris*, se realizó RT-PCR y se utilizaron las mismas muestras del tratamiento de déficit hídrico en plantas adultas de *P. vulgaris* evaluadas anteriormente (Figuras 17-21). En este análisis se obtuvieron tres fragmentos de PCR amplificados en las muestras de hoja y raíces (Figura 42). Los tres productos de PCR obtenidos fueron clonados y secuenciados.

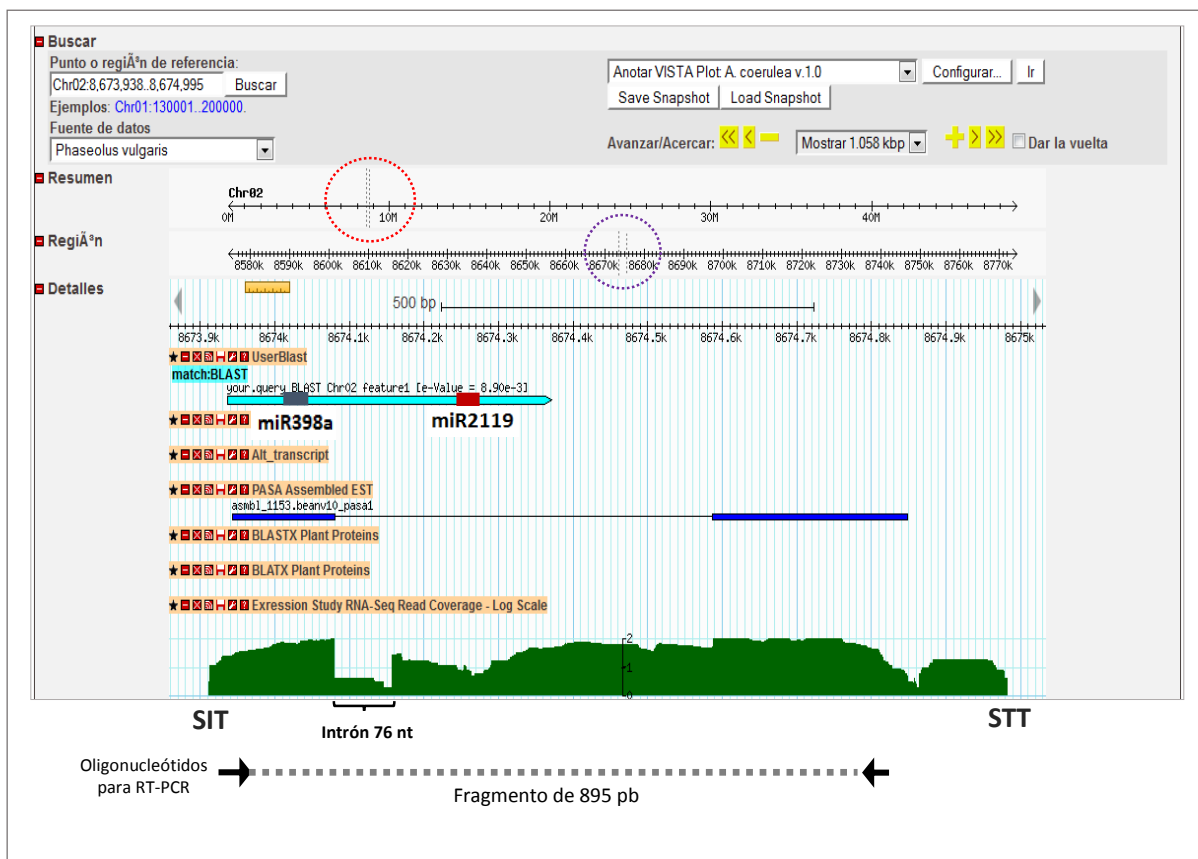


Figura 41. Localización del precursor pre-miR398a-miR2119 en el cromosoma 2 de *P. vulgaris*. Se utilizó la secuencia del precursor pre-miR398a-miR2119 (428 nt) y con el programa BLASTN se localizó el locus de *MIR398a-MIR2119* en el genoma de *P. vulgaris* disponible en Phytozome (phytozome.jgi.doe.gov). La secuencia “query” (rectángulo en color turquesa) mostró similitud en una región del cromosoma 2, indicado como “match:BLAST”; la secuencia madura de miR398a y miR2119 se indica en los recuadros azul marino y rojo, respectivamente. El EST ensamblado y localizado en el locus del gen *MIR398a-MIR2119* está representado en azul. En el análisis de expresión de RNA-seq (representado en verde), se indica con una llave horizontal un espacio que se predice el intrón de 76 nt. Además, se señala el Sitio de Inicio y Sitio de Término de la Transcripción (SIT y STT, respectivamente). En la parte inferior, se indica el diseño de oligonucleótidos (flechas) para realizar RT-PCR y se espera la amplificación de un fragmento de 895 pb representado en la línea discontinua.

Los análisis de las secuencias mostraron que el fragmento de mayor tamaño (895 pb) corresponde exactamente a la secuencia genómica donde se incluye a ambos precursores pre-miR398a y pre-miR2119, este transcrito se sugiere como el transcrito primario de *MIR398a*-

MIR2119 o *pri-miR398a-miR2119*. El segundo producto de PCR amplificado de 819 pb también contiene a *pre-miR398a* y a *pre-miR2119*, pero carece de la secuencia de 76 nt, la cual incluye los sitios consenso característicos de un intrón requeridos para el procesamiento por splicing. Este precursor procesado de *miR398a-miR2119* lo hemos denominado “*proc-miR398a-miR2119*” (Figura 43). Interesantemente, la secuencia del fragmento de PCR de menor tamaño (388 pb), sólo incluye el precursor *pre-miR398a*, el cual carece de un fragmento de 507 nt. Este intrón predicho que se elimina por el procesamiento de splicing, incluye a la secuencia de *miR2119*. El precursor procesado, que solo incluye *miR398a* lo hemos denominado “*proc-miR398a*”. Los dos transcritos que sufren procesamiento por splicing, *proc-miR398a-miR2119* y *proc-miR398a*, utilizan el mismo sitio de reconocimiento en el extremo 5' (5'SS) para el splicing; mientras que la selección del sitio de reconocimiento del splicing en el extremo 3' (3'SS) es diferentes para estos dos transcritos (Figura 43).

Con base a nuestros resultados, sugerimos que el gen *MIR398a-MIR2119* de *P. vulgaris* genera el *pri-miR398a-miR2119* y éste sufre eventos de splicing alternativo, dando lugar a dos transcritos distintos: uno donde es removido un intrón de 76 nt y permanecen ambos precursores *pre-miR398a* y *pre-miR2119*; y otro donde sólo permanece el precursor *pre-miR398a*, debido al procesamiento por AS que utiliza un sitio de splicing 3' alternativo (Alt 3'SS) y resulta en la eliminación de un intrón de 507 nt que incluye al *miR2119*.

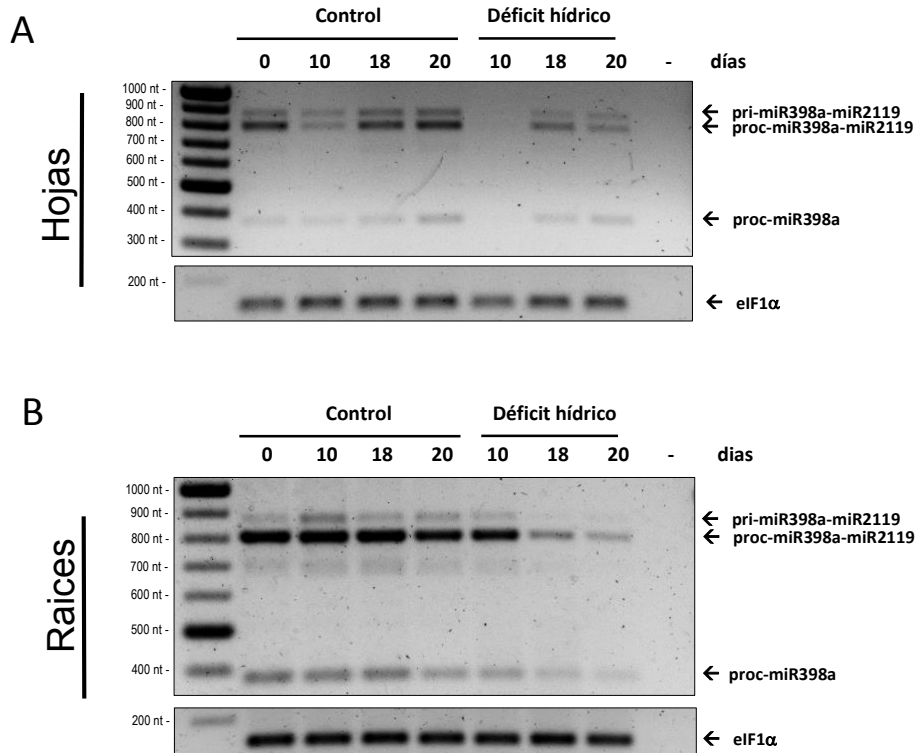


Figura 42. Expresión y procesamiento del precursor pre-miR398a-miR2119. Análisis de RT-PCR para detectar la presencia del transcrito que contiene ambos precursores de pre-miR398a y de pre-miR2119 en las muestras de plantas cultivadas en condiciones de déficit hídrico en **A)** hojas y **B)** raíces de *P. vulgaris*. Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y se utilizó la amplificación del transcrito eIF1 α como gen de referencia. El signo “-” indica la ausencia de cDNA en la reacción. La posición de los tres transcritos como pri-miR398a-miR2119 (primario), proc-miR398a-miR2119 (procesado) y proc-miR398a (procesado) son indicados por una flecha (←).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

pri-miR398a-miR2119	CAGAGGAGUGAAUUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUUGUAAUUCUAUUUAUCAUUUUGUUGGUA	60
proc-miR398a-miR2119	CAGAGGAGUGAAUUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUUGUAAUUCUAUUUAUCAUUUUGUUGGUA	60
proc-miR398a	CAGAGGAGUGAAUUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUUGUAAUUCUAUUUAUCAUUUUGUUGGUA	60

	miR398a	
pri-miR398a-miR2119	UUUGGUGUGAAUCUACUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAACCGUUGACAUGC	120
proc-miR398a-miR2119	UUUGGUGUGAAUCUACUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAACCGUUGACAUGC	120
proc-miR398a	UUUGGUGUGAAUCUACUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAACCGUUGACAUGC	120

	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> Sitio de splicing 5' Punto de Ramificación </div>	
pri-miR398a-miR2119	UAAACCUAAACCAAAACCAAAGUGAAUUCUUCUUCUUCUUCUUUCUCUUCUUUUUCUUCUUUUUAC	180
proc-miR398a-miR2119	UAAACCUAAACCAAAACCAAAG-----	143
proc-miR398a	UAAACCUAAACCAAAACCAAAG-----	143

	<div style="display: flex; justify-content: center;"> Sitio de splicing 3' </div>	
pri-miR398a-miR2119	AUCCUUUUGCAUGUUUCAGAUUUCAGAAAAUGUUGCAGGUUGUCUUUCUGCAGCUAUAG	240
proc-miR398a-miR2119	-----GUUGUCUUUCUGCAGCUAUAG	164
proc-miR398a	-----	143
pri-miR398a-miR2119	AAAUCAUGUUGUACUUUUACACUUUAUUUUUAUGCUUUUCCUCUACAACUCUCUUUU	300
proc-miR398a-miR2119	AAAUCAUGUUGUACUUUUACACUUUAUUUUUAUGCUUUUCCUCUACAACUCUCUUUU	224
proc-miR398a	-----	143
pri-miR398a-miR2119	AUUUUGGAGAAAUGAAGUGGAUUUCACUCUUUGAUUGGAGAAAAAAGUGGAUUUCUAU	360
proc-miR398a-miR2119	AUUUUGGAGAAAUGAAGUGGAUUUCACUCUUUGAUUGGAGAAAAAAGUGGAUUUCUAU	284
proc-miR398a	-----	143
	miR2119	
pri-miR398a-miR2119	UUUUUUCAAUCAAGGGAGUUGUAGGGGAAAGCUUAGAAAUGAAGUUUAAGAAUGAUA	420
proc-miR398a-miR2119	UUUUUUCAAUCAAGGGAGUUGUAGGGGAAAGCUUAGAAAUGAAGUUUAAGAAUGAUA	344
proc-miR398a	-----	143
pri-miR398a-miR2119	UCAUUGUGGCAUACUAGUGCCUGUGGUUGCAGCCAUUUUGUACAGUUUUUGAAGAGAAAAU	480
proc-miR398a-miR2119	UCAUUGUGGCAUACUAGUGCCUGUGGUUGCAGCCAUUUUGUACAGUUUUUGAAGAGAAAAU	404
proc-miR398a	-----	143
pri-miR398a-miR2119	GACCCUAUUUGUGUGAGUGCCUAAAUAUCAUCAGAUUAGGAACACAAAAGUAGAAGAUUC	540
proc-miR398a-miR2119	GACCCUAUUUGUGUGAGUGCCUAAAUAUCAUCAGAUUAGGAACACAAAAGUAGAAGAUUC	464
proc-miR398a	-----	143
pri-miR398a-miR2119	UCCAUUGGCAAGAUAGACUCACCGUCUUCUUUUUCUUUUUAGUUGAUGAUUUUAACUA	600
proc-miR398a-miR2119	UCCAUUGGCAAGAUAGACUCACCGUCUUCUUUUUCUUUUUAGUUGAUGAUUUUAACUA	524
proc-miR398a	-----	143
	<div style="display: flex; justify-content: center;"> Sitio de splicing alternativo 3' </div>	
pri-miR398a-miR2119	UGGUUUUAGUUUUGGGAGUUUCUUUAUUUGUGUGUAAUUUGAUGCAGGAAAAUGAAG	660
proc-miR398a-miR2119	UGGUUUUAGUUUUGGGAGUUUCUUUAUUUGUGUGUAAUUUGAUGCAGGAAAAUGAAG	584
proc-miR398a	-----GAAAAUGAAG	153

pri-miR398a-miR2119	GAUUGUUAGAGCAGAUUUGUAAAGUCUUUGAGUUUCAUACAAAGUAAUGUUGCAAGUUCU	720
proc-miR398a-miR2119	GAUUGUUAGAGCAGAUUUGUAAAGUCUUUGAGUUUCAUACAAAGUAAUGUUGCAAGUUCU	644
proc-miR398a	GAUUGUUAGAGCAGAUUUGUAAAGUCUUUGAGUUUCAUACAAAGUAAUGUUGCAAGUUCU	213

pri-miR398a-miR2119	AUAUGUUGCUCUUGUGGAAAAGCAAAGUGUGGAAGCAAUUUAAGUUGUCUCAUUUCU	780
proc-miR398a-miR2119	AUAUGUUGCUCUUGUGGAAAAGCAAAGUGUGGAAGCAAUUUAAGUUGUCUCAUUUCU	704
proc-miR398a	AUAUGUUGCUCUUGUGGAAAAGCAAAGUGUGGAAGCAAUUUAAGUUGUCUCAUUUCU	273

pri-miR398a-miR2119	CAAACUACAGUGCCUAAUAAUUGAUGUGGCAGUUGGUGGAAGGCAUUUCAAGUACAAU	840
proc-miR398a-miR2119	CAAACUACAGUGCCUAAUAAUUGAUGUGGCAGUUGGUGGAAGGCAUUUCAAGUACAAU	764
proc-miR398a	CAAACUACAGUGCCUAAUAAUUGAUGUGGCAGUUGGUGGAAGGCAUUUCAAGUACAAU	333

pri-miR398a-miR2119	GAAAGCAUAAAAUUGAAGACCAAUUGUUUUUCACGGUGUCUUGAUCAAGUUUC	895
proc-miR398a-miR2119	GAAAGCAUAAAAUUGAAGACCAAUUGUUUUUCACGGUGUCUUGAUCAAGUUUC	819
proc-miR398a	GAAAGCAUAAAAUUGAAGACCAAUUGUUUUUCACGGUGUCUUGAUCAAGUUUC	388

Figura 43. Comparación de los transcritos provenientes del locus *MIR398a-MIR2119*. Alineamiento de las secuencias precursoras clonadas correspondiente al transcrito primario pri-miRNA (pri-miR398a-miR2119) y los precursores procesados (proc-miR398a-miR2119 y el proc-miR398a) mediante el programa Clustal O. Las secuencias maduras de miR398a y miR2119 se muestran en cajas de color azul y rojo, respectivamente. La posición de los sitios de splicing 5´ y 3´ es indicada en colores azul y rojo. Estos sitios incluyen las secuencias consenso (AG/GUAAGU y UGCAG/G), el sitio del punto de ramificación predicho (CURAY, donde R es purina, Y pirimidina) conforme a lo reportado en plantas (Lorkovic et al., 2000) se muestra en color verde.

IX.XVI Expresión diferencial de los precursores pre-miR398a-miR2119 en el desarrollo de vainas de *P. vulgaris*

Con el objetivo de explorar condiciones donde se observe la regulación del precursor pre-miR398a-miR2119 por AS en *P. vulgaris*, establecimos una colaboración con el Dr. Luis P. Iñiguez y la Dra. Georgina Hernández del Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM). En el análisis de 54 muestras biológicas de “RNA-seq” de diferentes tejidos y condiciones de crecimiento de *P. vulgaris*, se encontró que durante el desarrollo de las vainas existe una acumulación diferencial de los transcritos provenientes del gen *MIR398a-MIR2119*. Para corroborar dicha predicción, se exploró la acumulación de los precursores de pri-miR398a-miR2119, proc-miR398a-2119 y proc-miR398a en vainas. Para esto, se realizó la extracción de RNA en vainas de distintos tamaños (5 cm, 9 cm y 11 cm) como reflejo del tiempo de desarrollo, y se realizó RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que permiten la amplificación de los distintos productos de AS del transcrito *MIR398a-MIR2119*. Conforme transcurre el desarrollo y el crecimiento de las vainas, observamos que existe una mayor acumulación diferencial de los precursores proc-miR398a-miR2119 y proc-miR398a, obteniendo una mayor acumulación de ambos transcritos en vainas de 11cm (Figura 44). Por lo tanto, durante etapas de desarrollo de vainas existe una acumulación diferencial y procesamiento del transcrito proveniente del gen *MIR398a-MIR2119* a través del splicing, lo que sugiere la participación de estos miRNAs durante la maduración y la desecación de las vainas.

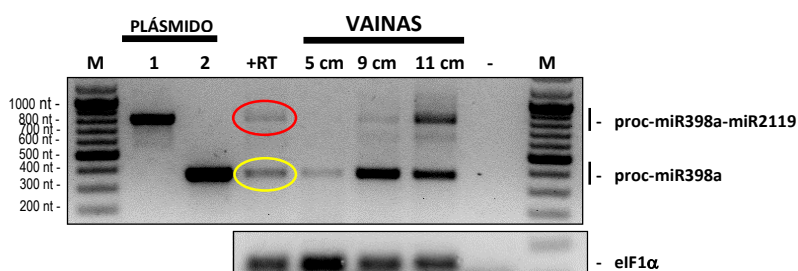


Figura 44. Expresión diferencial de los precursores provenientes del locus *MIR398a-MIR2119*. Productos de PCR separados por tamaño en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio y amplificados a partir de: los plásmidos que contienen el fragmento clonado en los vectores pCR::proc-miR398a-2119 y pCR::proc-miR398a, respectivamente (carriles 1 y 2); el carril de “+RT” indica que se utilizó cDNA (de hojas adultas de *P. vulgaris*) como templado en la reacción de PCR y el carril “-” indica la ausencia de cDNA en la reacción. Se incluyeron las muestras de vainas de *P. vulgaris* de la variedad Negro jamapa de 5 cm, 9 cm y 11 cm de longitud. “M” indica marcador de peso molecular de DNA. En la parte inferior, se muestran las reacciones de RT-PCR para el transcrito eIF1 α como control de carga.

Para determinar la acumulación de las diferentes isoformas del precursor pre-miR398a-miR2119 de forma más precisa, se analizó la acumulación de los transcritos mediante RT-qPCR o PCR cuantitativo. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los precursores pri-miR398a-miR2119, proc-miR398a-2119 y proc-miR398a con el objetivo de amplificar y detectar cada una de las distintas isoformas. Una ventaja que ofrece el tener disponible los fragmentos clonados, es poder cuantificar de manera absoluta la acumulación de cada transcrito en cierta condición y determinar con precisión las moléculas del transcrito por μg de RNA. Para esto, se optimizaron las condiciones de amplificación cada par de oligonucleótidos para cada una de las isoformas que genera el procesamiento de pre-miR398a-miR2119.

Para evaluar la acumulación de los diferentes precursores provenientes del locus *MIR398a-MIR2119* se extrajo RNA en muestras independientes (distintas a las utilizadas en la Figura 44) de vainas de 5 cm, 8 cm y 11cm para su posterior análisis por RT-qPCR. Los resultados obtenidos muestran un aumento de los transcritos provenientes de los precursores procesados proc-miR398a-miR2119 y proc-miR398a durante el desarrollo de vainas ($\sim 12 \times 10^4$ y $\sim 5.5 \times 10^4$ moléculas por μg de RNA, respectivamente), nuevamente teniendo una mayor acumulación de ambos precursores en vainas de 11cm (Figura 45A). La detección del transcrito primario de pri-miR398a-miR2119 en muestras de vainas mostró una acumulación baja con respecto a los precursores procesados, lo que sugiere que durante el desarrollo de vainas se promueve el procesamiento por splicing del precursor pri-miR398a-miR2119, como resultado se obtiene aproximadamente una proporción 2:1 del proc-miR398a-miR2119 con respecto al proc-miR398a, lo cual podría desencadenar cambios en la acumulación de los miRNAs maduros y por consecuencia repercutir en la acumulación de los mRNAs blanco.

En conjunto, podemos definir los eventos de procesamiento que sufre el precursor pre-miR398a-miR2119 mediante el splicing. Los resultados obtenidos permiten concluir, que el precursor proc-miR398a-miR2119 se genera del procesamiento y la eliminación de un intrón de 76 nt, este precursor procesado fue el transcrito más abundante en los tejidos evaluados, lo que sugiere que este transcrito forma parte del Splicing Constitutivo (CS) del transcrito proveniente del locus *MIR398a-MIR2119* en *P. vulgaris*. En cambio, el precursor proc-miR398a es el resultado del reconocimiento de un Sitio de Splicing 3' alternativo (Alt 3'SS) por el cual se elimina un intrón de 507 nt. Sin embargo, existe la acumulación del transcrito primario pri-miR398a-miR2119 en ciertos tejidos como en hojas (Figura 42A), lo cual sugiere un evento de splicing alternativo como es la retención de intrón (IR) en el transcrito pri-miR398a-miR2119 (Figura 45B).

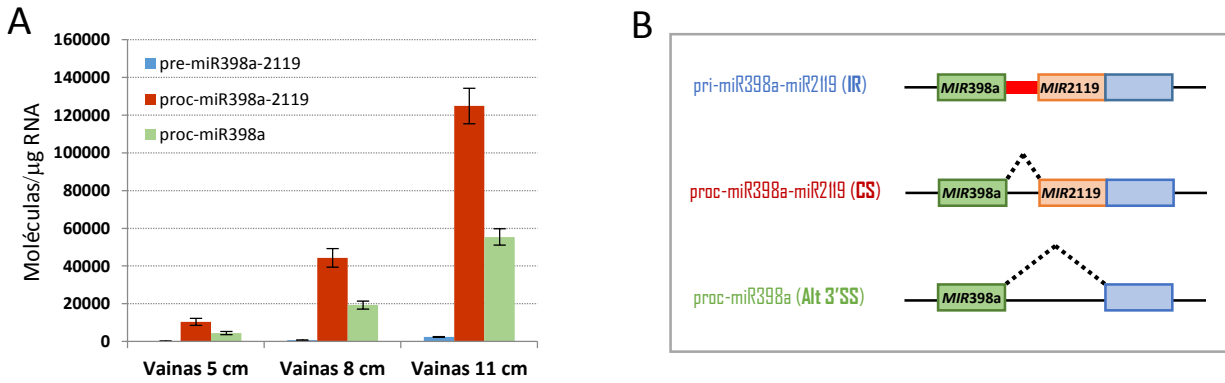


Figura 45. Procesamiento y acumulación de los precursores de pre-miR398a-miR2119 en el desarrollo de vainas. A) Detección de los niveles de acumulación de los precursores pri-miR398a-miR2119, proc-miR398a-2119 y proc-miR398a por RT-qPCR en vainas de 5 cm, 8 cm y 11 cm de *P. vulgaris*. Se utilizó el transcrito de *Pvu-Actin 11* como normalizador. **B)** Evento de splicing de los precursores clasificados como: pri-miR398a-miR2119 (IR, Retención de intrón), proc-miR398a-miR2119 (CS, Splicing constitutivo), y proc-miR398a (Alt 3'SS, sitio de splicing alternativo 3').

IX.XVII Conservación de los sitios de splicing en los géneros *Phaseolus* y *Vigna*

Con el objetivo de ampliar nuestro estudio del proceso de splicing en el precursor pre-miR398a-miR2119 caracterizado en *P. vulgaris*, decidimos explorar la conservación de los sitios de splicing en aquellas especies que cuentan con el precursor dicistrónico, las especies de los clados Hologaleginas y Millettioideas de la subfamilia de las Papilionoideae de las leguminosas, descrito previamente en el Capítulo II. Cada una de las secuencias se analizó y se trató de identificar los Sitios de Splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS), y el sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3'SS), en comparación con la secuencia de *P. vulgaris*. Particularmente, se analizaron los sitios canónicos de reconocimiento por splicing en la secuencia del intrón que son comúnmente identificados en los bordes como 5'-GU y AG-3'.

Primero, se compararon entre sí las secuencias del género *Phaseolus* que son: *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. acutifolius*. Se alinearon las secuencias de los precursores pre-miR398a-miR2119 mediante el programa Clustal O (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). En el alineamiento se muestra que los precursores de *P. vulgaris*, *P. coccineus* y *P. acutifolius* comparten alto porcentaje de nucleótidos en la secuencia. Además, se identificaron las secuencias de miRNA/miRNA* de miR398 y de miR2119, así como los sitios de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS), y el sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3'SS) en referencia a la secuencia de *P. vulgaris*, descritas previamente. Los precursores de *P. coccineus* y de *P. acutifolius* conservan los sitios de splicing 5'SS, 3'SS y Alt 3'SS, lo que sugiere que el transcrito proveniente del locus *MIR398a-MIR2119* de estas especies puede sufrir procesamiento por splicing (Figura 46). Interesantemente, la secuencia perteneciente a *P. acutifolius* es un EST obtenido de NCBI (ID: HO796397), el cual correspondió al precursor procesado proc-miR398a-miR2119, ya que carece de la secuencia que se elimina en el procesamiento de splicing constitutivo de *P. vulgaris* (intrón de 76 nt) y coincide con la unión de los bordes localizados en la unión exón-exón (Figura 46, posiciones resaltadas en rojo). La identificación y la conservación de los sitios de splicing sugieren que los precursores de pre-miR398a-miR2119 en *P. coccineus* y *P. acutifolius* pueden ser procesados por splicing, para generar los precursores proc-miR398a-miR2119 y el proc-miR398a, éste último, a través de splicing alternativo.

Después, se compararon las secuencias de los precursores de *V. radiata*, *V. angularis* y de dos parálogos de *V. unguiculata*. El alineamiento muestra la conservación de los sitios de splicing 5'SS, 3'SS y Alt 3'SS del precursor pre-miR398a-miR2119 en las especies de *V. radiata* y *V. angularis* con respecto al precursor de *P. vulgaris*, lo que sugiere que el precursor pre-miR398a-miR2119 también puede ser procesado por splicing en *V. radiata* y *V. angularis* (Figura 47). En cambio, los dos parálogos de *V. unguiculata* sólo conservan los sitios 3'SS y Alt 3'SS del

precursor pre-miR398a-miR2119 y aparentemente carecen del sitio 5´SS, probablemente por una delección de la secuencia (~ 40 nt), lo que sugiere que los dos precursores serían incapaces de procesarse por splicing.

Adicionalmente, se alinearon y se analizaron las secuencias de los precursores pre-miR398a-miR2119 de *G. max* (posee dos parálogos) y *C. cajan*, pertenecientes al clado de los Millettiodes. En comparación con *P. vulgaris*, los dos parálogos de *G. max* conservan el sitio 3´SS y Alt 3´SS (Figura 48); mientras que el sitio 5´SS contiene una sustitución de una base en el sitio canónico reconocido por el splicing (GU es sustituido por AU) en ambos parálogos (Figura 48). Es posible que la maquinaria de splicing no reconozca el sitio 5´SS debido a la sustitución de GU/AU y en consecuencia no se elimine el intrón, otra opción es que exista un sitio alternativo de procesamiento no identificado aún. En el caso particular del precursor de *C. cajan*, las secuencias canónicas del reconocimiento por splicing, en cada uno de los sitios 5´SS, 3´SS y Alt 3´SS presentan una sustitución como GU/AU, AG/AU y AG/AU, respectivamente, interfieren con el procesamiento por splicing de este precursor de *C. cajan* (Figura 48). Estos análisis sugieren que los precursores de pre-miR398a-miR2119 de *G. max* (dos parálogos) y *C. cajan* no son procesados por splicing canónico.

Por último, se compararon y se analizaron entre sí las secuencias del precursor dicistrónico de las especies pertenecientes al clado de las Hologaleginas: *L. japonicus*, *L. culinaris*, *M. truncatula*, *C. arietinum* y *T. pratense* (dos parálogos). El alineamiento mostró sólo la conservación del sitio 3´SS entre las especies de las Hologaleginas (Figura 49). En contraste, no existen conservación en el sitio 5´SS y el sitio Alt 3´SS. A lo largo del alineamiento, se puede observar que lo único que se conserva entre los precursores de las Hologaleginas son los miRNAs maduros miR398 y miR2119 y sus respectivos miRNAs estrella (Figura 49). Un estudio reciente de genómica comparativa donde se analizaron sitios de splicing en plantas (121 especies en total), mostró que en promedio los sitios splicing son: 98.7% GU-AG, 1.2% GC-AG, 0.06% AU-AC y 0.09% para los sitios no canónicos (Pucker and Brockington, 2018). Sin embargo, no se encontraron posibles sitios potenciales de splicing, incluso también para los sitios de menor frecuencia, en las secuencias de los precursores del clado de las Hologaleginas. Los datos sugieren que los precursores de pre-miR398a-miR2119 en el clado de las Hologaleginas son incapaces de realizar procesamiento por splicing o que los sitios de splicing están en otro contexto, no compartido con *P. vulgaris*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

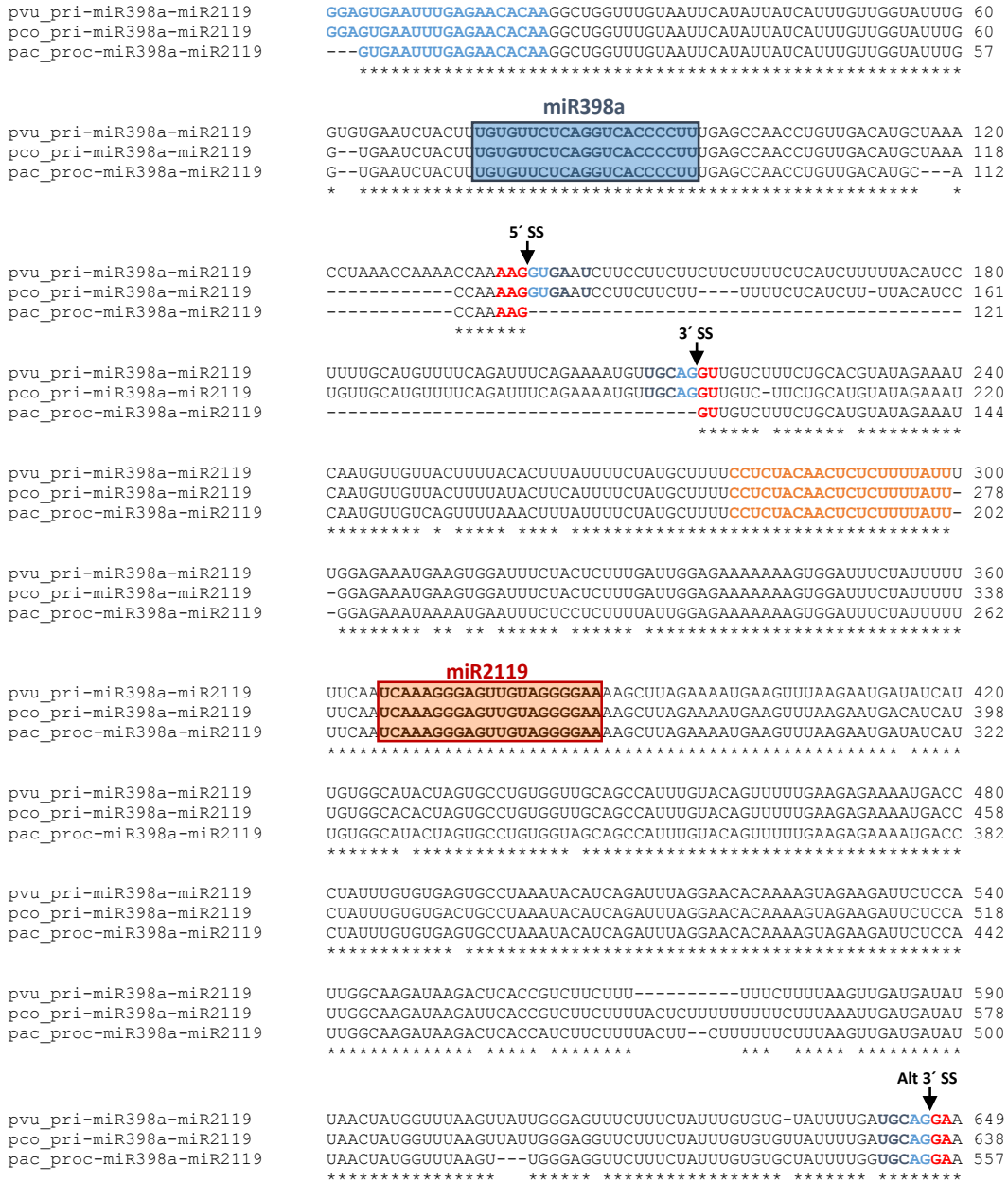


Figura 46. Conservación de los sitios de splicing del precursor pre-miR398a-miR2119 en el género *Phaseolus*. Alineamiento de los precursores pri-miR398a-miR2119 de *P. vulgaris* (pvu) y *P. coccineus* (pco), y el precursor procesado de proc-miR398a-miR2119 de *P. acutifolius* (pac) mediante el programa Clustal O. Los sitios de splicing 5' y 3' (5' SS y 3' SS) se señalan con flecha, así como también el sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3' SS). Las secuencias de los bordes de exones e intrónes son resaltadas en color rojo y azul, respectivamente. Las secuencias de miR398a* y miR2119* se indican de color azul y naranja, respectivamente. La secuencia de los miRNAs maduros está señalada con un rectángulo del mismo color utilizado para la secuencia de miRNA*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

pvu_pri-miR398a-2119      AAGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUUUGAGAACACAAGGCUGGUUUUGUAAUUCUAUUUUC      60
vra_pri-miR398a-2119      AAGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUCUGAGAACACAAGGCUGGUUUUGCAAUUCUAUUAUC      60
van_pri-miR398a-2119      AAGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUCUGAGAACACAAGGCUGGUUUUGCAGUUCUAUUAUC      60
vun_pri-miR398a-2119a     AGGGUUUUAUCUCAGAGGAGUGAAUCUGAGAACACAAGGCUGGUUUUGCAGUUCUAUUAUC      60
vun_pri-miR398b-2119b     AAGGUUUAAUUCAGAGGAGUGAAUUUGACAACACAAGGCUGAAUUUGUGGUUUCUAUUAUC      60
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

                                miR398
pvu_pri-miR398a-2119      AUU-UGUUGGUUUUUGGUGUGAAUCUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAAC      119
vra_pri-miR398a-2119      AUU-UGUUGGUUUUUG-GUGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAAC      118
van_pri-miR398a-2119      AUU-UGUUGGUUUUUG-GUGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAAC      118
vun_pri-miR398a-2119a     AUUCUGUUGGUUUUUG-GUGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAAC      119
vun_pri-miR398b-2119b     AUU-UGUUGGUUUUUG-GUGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAGCCAAC      118
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

                                5'SS
pvu_pri-miR398a-2119      CUGUUGAC---AUGCUAAACCUAAACCAAAACCAAAAGGUGAAUCCUCCUUCUUCUUUU      176
vra_pri-miR398a-2119      CUGUUGAC---AUUC-----ACCAAAGGUGAAUCCUUCUUCUCC--UAAGU      158
van_pri-miR398a-2119      CUGUUGAC---AUUC-----ACCAAAGGUGAAUCCUUCUUCUCC--UAAGU      158
vun_pri-miR398a-2119a     AUGAUGAC---AUUC-----ACCAACCA-----              139
vun_pri-miR398b-2119b     AUGUUAAACGACAUUC-----ACCAAAA-----              140
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

                                3'SS
pvu_pri-miR398a-2119      UUCUCAUCUUUUUACAUCUUUUUGCAUGUUUCAGAUUUCAGAAAAGUUGC--AGGUUG      234
vra_pri-miR398a-2119      UUCUCAUCUU--UUACAACCUUUCAGUUUUUCAGAUUUCGGAGAAUUGUGCUGAGGUUG      217
van_pri-miR398a-2119      UUCUCAUCUU--UUACAACCUUUCAGAUUUCGGGAAAAGUUGCAGAGGUUG      217
vun_pri-miR398a-2119a     -----AGACAUGUUUCUAGAUUUCAGGAAAAGUUGCAGAGGUUG      178
vun_pri-miR398b-2119b     -----CAUGUUUUC-AAUUUAAGGAAAAGUUGCAGAGGUUG      175
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      UCUUUUCGCAC-GUAUAGAAAUCAAGUUGUUACUUUUCACUUUUAUUUUCUAUGCUUUU      293
vra_pri-miR398a-2119      CCUUUUUGUAUGGUUAUGAUUAGCAUGUUGUUUUUUUGCAUUUUAUUUUGUAUGUUUUU      277
van_pri-miR398a-2119      UCUUUUCGUAUGGUUAUGAAAUCAAGUUGUUCACUUUUGCAUUUUAUUUUGUAUGUUUUU      277
vun_pri-miR398a-2119a     CCUUUUUCAUGGUUAUGAAAUCAAGUUGUUUUUUUUUGCACUUUUAUUUUCUAUGUUUUU      238
vun_pri-miR398b-2119b     CCUUUUUAUCAUGGUUAUGAAAUCAAGUUGUUACUUUUGCACUUUUAUUUUCUAUGUUUUU      235
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      CCUCUACAACUCUCUUUUUUUUGGAGAAAUGAAGUGGAUUUCUACUCUUUGAUUGGAGA      353
vra_pri-miR398a-2119      CCUCUACAGCUCUCUUUUUUU-----GGAGA      303
van_pri-miR398a-2119      CUUCUACAGCUCUCUUUUUUU-----GGAGA      303
vun_pri-miR398a-2119a     CCUCUACAGCUCUCUUUUUUU-----GGAGA      264
vun_pri-miR398b-2119b     CCUCUACAGCUCUCUUUUU-----GGGGA      258
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

                                miR2119
pvu_pri-miR398a-2119      AAAAAAGUGGAUUUCUAUUUUUUUCAUCAAAAGGGAGUUGUAGGGGAAAGACUUAGAAAA      413
vra_pri-miR398a-2119      AAAAAAGUGGAU-UAUGUUCUUUUUCAUCAAAAGGGAGUUGUAGGGGAAAUUAUAGAAAA      362
van_pri-miR398a-2119      AAAAAAGUGGAU-UCUGUUCUUUGCAUCAAAAGGGAGUUGUAGGGGAAAUACAAGAAAA      362
vun_pri-miR398a-2119a     AAAAAAGUGGAU-UCUGUUCUUUGCAUCAAAAGGGAGUUGUAGGGGAAAGAACAUAAAAA      323
vun_pri-miR398b-2119b     AAAAAAUUGGAU-UCUGUUCUUUGCAUCAAAAGGGAGUUGCAGUGGAAAGACCAUAAAAA      317
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      UGAGUUUAAGAAUGAUUAUCAUUGUGGCAUACUAGUGCCUGUGGUUGCAGCAUUGUUC      473
vra_pri-miR398a-2119      UACAGUUAUAAAAUGAUUAUCAUUGUGGUUAUACAAGUGCCUUGUGGUUGCAGCUUUGCAG      422
van_pri-miR398a-2119      UGCAGAGUAAAAAUGAUUAUCAUUGUGAUUAUAGAAGUGCUUGUGGUUGCAGCUUAUUACAC      422
vun_pri-miR398a-2119a     UGCAGUUAAGAAUGAUUAUCAUUGUGGCAUACAAGUGUUUCUAGUUGCAGACAU-----      377
vun_pri-miR398b-2119b     UGUAGUUAAGAAUGAUACACUAGUGCAGAA--UUUCC-----AUU-----      357
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      AGUUUUUGAAGAGAAAAUGACCCUUAUUUGUGAGUGCCUAAAUAUCAUCAGAU--UUAGG      531
vra_pri-miR398a-2119      AGUUUUUGAAGAGAAAAUGGCCUUUAU-UGUGUGAAUUCUUAUUAUGCAUCAGUU--UUAGG      479
van_pri-miR398a-2119      AGUUUUUGAAGAGAAAAUGACCCUUAU-UGUGUGAAUUCUUAUUAUCAUCAGUU--UUAGG      479
vun_pri-miR398a-2119a     -----UAGAAAAUGACCAUGU-UUUUGAGUUUAUUACAUCAGUU--UUAGG      424
vun_pri-miR398b-2119b     -----UACCUCG-----CCUUUAUUGCCUGGUUGGUCAGG      388
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      AACACAAA-----AGUAGAAGAUUCUCAUUGGCAAGAUAAAGACUCACCGU--CUUCU      582
vra_pri-miR398a-2119      AACGCAAA-----AUGUAGAAGAUU--CCAUUGGCAAGAUAAAGACUCACCGUUCUUCU      531
van_pri-miR398a-2119      AACGCAAA-----AAGUAGAAGAUU--CCAUUGGCAAGAUAAAGACUCACCGUUCUUCU      531
vun_pri-miR398a-2119a     AACGC-----UU--CCAUUGGCAAGAUAAAGACUCACCGUUCUUCU      463
vun_pri-miR398b-2119b     AACCGAAGCAUUAUAAUGGCGCGGUG--ACAUUUUUGCAUUUAGAA--CCAAGUUU--      439
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

pvu_pri-miR398a-2119      UU-----UUUCUUUAAGUUGAUGAUUAU-----ACUAUGGUUUAAU      621

```

vra_pri-miR398a-2119	UUUACUUCUUUU-UUUUCUUUAAGUUGAUGGUACUAAUUGUGUUUAACUAUGGUUAUAAA	590
van_pri-miR398a-2119	-----UUU-UUUUCUUCAGUUGAUGGUACUGAUUGUGUUUAACUAUGGUUAUAAA	581
vun_pri-miR398a-2119a	GUUAUUUCUUUUUUUUUCUUCAGUUGAUGGUAAUAAUUGUGUUUAACUAUGGUUAUAAA	523
vun_pri-miR398b-2119b	--UAGGCC--UCGGUUCUCUAAAUACCCGGAACCAA-----AGAGGGGUUAGG-	484
	* * * * * * * * * *	
		Alt 3'SS ↓
pvu_pri-miR398a-2119	UAUUGGGAGUUUCUUUCUAAUUU--GUGUGUA-----UUUUGAUGCAGGAAAA	666
vra_pri-miR398a-2119	----UGGAGGUUCUGUCUAAUUUUUGUGUUUA-----UUUUGGUGCAGGAAAA	633
van_pri-miR398a-2119	----UGGAGGUUCUUUCUAAUUUUUGUGUUUA-----UUUUGGUGCAGGAAAA	624
vun_pri-miR398a-2119a	----UGAAAGUUUUUUUCUAAUUUUUGUGUUUG-----UUUUGAUGCAGGAAGA	566
vun_pri-miR398b-2119b	----CCCGGUUCGCUCUAAAACCCGGUGUCAAAAGAGGGGUUAGGCCACGGUCAGUAGGA	540
	** * * * * * * * * * *	

Figura 47. Conservación de los sitios de splicing en los precursores pre-miR398a-miR2119 de *V. radiata* y *V. angularis*. Alineamiento de los precursores pri-miR398a-miR2119 de *P. vulgaris* (pvu) y *V. radiata* (vra), *V. angularis* (van) y *V. unguiculata* (vun) mediante el programa Clustal O. Los sitios de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS) se señalan con flecha, así como también el sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3'SS). Las secuencias de los bordes de exones e intrónes son resaltadas en color rojo y azul, respectivamente. Las secuencias de miR398a* y miR2119* se indican de color azul y naranja, respectivamente. La secuencia de los miRNAs maduros está señalada con un rectángulo del mismo color utilizado para la secuencia de miRNA*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

pvu_pri-miR398a-2119      GUGUAUAGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUUGUAAUU-CAU   59
gma_pri-miR398a-2119a    UCCAUAUGGUUUUUCUCAGGAGUGAAUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUUGCAGUCGUU   60
gma_pri-miR398b-2119b    UCCAAAUGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUUGAGAACAACAAGGCUGGUUUGCAGUCU   60
cca_pri-miR398a-2119     AACAAAUGGUUUUUCUCAGAGGAGUGAAUUGAGAACAACAAGGCUGAUUUCCACUGCCAU  60
                          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                               miR398
pvu_pri-miR398a-2119     AUUAUCAUUUGUUGUAUUUGGUGAAUUCACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAG   119
gma_pri-miR398a-2119a    AU---CAUCUAUUGGUUAUAAGG--UGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAG  115
gma_pri-miR398b-2119b    AUUAUGAUCGAUUGGUUAUAAGG--UGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAG  118
cca_pri-miR398a-2119     AUGA---UAUA-UGUUAUAAGG--UGAAUUUACUUUGUGUUCUCAGGUCACCCUUUGAG   114
                          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                               5'SS
                               ↓
pvu_pri-miR398a-2119     CCAACCGUUGAGCAUGC UAAACCUAACC AAAACCAAAAGGUGAAUCUUCUUCUUCUUC   179
gma_pri-miR398a-2119a    CCAACCGUUGAGCAU-----AUACCAAACAUGAAUCCUUCUUCACU--UU   158
gma_pri-miR398b-2119b    CCAACCGUUGAGCAU-----AUACCAAACAUGAAUUA-----U   153
cca_pri-miR398a-2119     CCAACCGUUGUGUC-----AAA-AAUAUUGAA-----C   143
                          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119     UUUUCUCAUCUUUUU-----ACAUCUUU-UGCAUGUUUUCAGAUUUCAGAAAAUGU   230
gma_pri-miR398a-2119a    GCUUCUCAUCUUUUUUUACACCACAUUCUGUUAUAUAGUCUUCAGAUUUCAGGAAAUGU   218
gma_pri-miR398b-2119b    CCUUCUCAUCUU-UUUUUACACCACAUUCUGUUAUAUAGUUUUCAGAUUUCAGGAAAUGU   212
cca_pri-miR398a-2119     CCUUUUCAU---AUUUUACACCACAUUCUGUUAUAUUCUCACAUUUCAGGAAAAGU   200
                          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                               3'SS
                               ↓
pvu_pri-miR398a-2119     UGCAGGUUGUCUUUCUGCA-CGUUAUGAAAUCAUUGUUGUAC-UUUUACACUUUUUUU   288
gma_pri-miR398a-2119a    UGCAGGUCUGGAUUUGUGAUGGUUAUGACAUCAUUGUUGUUAU-UUUUUAUCUUCAUUUU  277
gma_pri-miR398b-2119b    UGCAGGCAAGAUUUUGGGAUAGUAUAGAAAUCAUUGCUGUUAU-UUUUACACUUCAUUUU  271
cca_pri-miR398a-2119     UGCAUA-----AUGGAUGGUUAUGAAAUCAUUGUUGUUAUUAUUAUUAUUAUUAUUAU  252
                          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119     CUAUGCU-----UUUCCUCUCAACUCUCUUUUUAUUUGGAGAAAUGAAGUGGAUUUCU   342
gma_pri-miR398a-2119a    UUAUACU--UUAUUUUCCUCUAUACCCUCACUUUUUAU--GGAGAAAAAGA-GA-----  326
gma_pri-miR398b-2119b    CUAUAUUU-UUAUUUUCCUCUACCCUCUCUUUUUAU--GGAGAAAAAGA-GA-----  321
cca_pri-miR398a-2119     CUUUGCUGUCAUUUUCCUCUACCCUCUCUUUUUAUC--AGAGAAAAUAAG-GG-----  303
                          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                               miR2119
pvu_pri-miR398a-2119     ACUCUUUGAUUGGAGAAA-AAAAGUGGAUUUCUAUU----UUUUUCAUCCAAAGGGGAGU   396
gma_pri-miR398a-2119a    -----AUAGAAA--AUAGUGGAUUUCUCUUCUU--UUUUUCAUCCAAAGGGGAGU   371
gma_pri-miR398b-2119b    -----AUAGAAAAAAGUGGAUUUCUCUACUU--CUUUUCAUCCAAAGGGGAGU   368
cca_pri-miR398a-2119     -----AGAGAAU-AAAGUGGAUUUCUCUUUUUUUUUCAUCCAAAGGGGAGU   351
                          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119     UGUAGGGGAAAGCUUAGAAAUGAAGUUUAAGAAUGAUUAUUAUUGGCAUACUAGUGC   456
gma_pri-miR398a-2119a    UGUAGGGGAAAGUUUAAGAAAUGGCGUGUAAGAAUAACAUCUUGGAAAUUA---   428
gma_pri-miR398b-2119b    UGUAGGGGAAAGUUUAAGAAAUGGCGUGUAAGAAUAACAUCUUGGAAAUUA---   424
cca_pri-miR398a-2119     UGUAGGGGAAAUUCUUAAGAAUAGCGUGUAAGAAUAGCAGCAUUGGAAUUGCA---   407
                          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119     CUGUGGUUGCAGCCAUUUGUACAGUUUU-----UGAAGAGAAAUGACCCUAAUUUG---   507
gma_pri-miR398a-2119a    -AGUGGUCGAAUCAUUUGCACAAUUUCAAGU--UGAAGAGAAAUGACAACUAGUGCUU   485
gma_pri-miR398b-2119b    -AGUGGAUGCAGAAUUUGC--AGUUUCAAGU--UGAAGAGAAAUGACAACUAGUGCUU   479
cca_pri-miR398a-2119     -AGUGGUCGAAUCAUUUGCACAAUUUCAACAGUCGCAUG-----CUGUAAGGGAAU   458
                          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119     -----UG   509
gma_pri-miR398a-2119a    AUA-----   488
gma_pri-miR398b-2119b    AUAACUUUU-----UUUAUCAGUAAU-----GUUAGUG--UG   511
cca_pri-miR398a-2119     AUAACUUUUCCUCGUCAUUUUCUUCAAAAGGAAAAGGUAAGGAAUAGAACUAAUUUU   518

pvu_pri-miR398a-2119     U-----   510
gma_pri-miR398a-2119a    -----   488
gma_pri-miR398b-2119b    UUAGUUUUUGUUAAGAAAGGUCACUUGAGCCUA-CAACCUCUCUCCCCUCCUUCUCCUU   570
cca_pri-miR398a-2119     UAAGUUUUUUUAACCAUGAUUUUGUAUGAAAAAAUUCUAUC--AUUAAGUAAAAUU   576

pvu_pri-miR398a-2119     -----GAGU-----GCCUAAA   521
gma_pri-miR398a-2119a    -----ACAUUA   495
gma_pri-miR398b-2119b    CACCUUUUCCAAGCACUGAGCCAAUCUUAU---CUCCACUAGUGCUUAUAACUUAU   626
cca_pri-miR398a-2119     -----AAUUAGAGUGCAUUAAGUAACUUAUCUUCU-----UAAU   615
                          **

```

```

pvu_pri-miR398a-2119      UACAUCAGAUUUAGGAACACAAAAGUAGAAGAUUCU-----CCAU      561
gma_pri-miR398a-2119a    AGCAUCAGAUUUAGGAUACAA--GAGGAAGAUUCUAUUGGCACGUAUUUUUCUCUAG      553
gma_pri-miR398b-2119b    AGCAUCAGUUUUAGGAUACAAAAGAGGAAGAUU-----CUGUAG      666
cca_pri-miR398a-2119      AUAACUUAUUUAGC-----UCAGGAUUUAAAUUAAAUAUCUGAUUAAGGCA      664
                        ***      *****      *      ****

pvu_pri-miR398a-2119      UG-GCAAGAUAAAGACUCACCGU-----CUUCU--UUUUUCUUUAAGUUGAUG      606
gma_pri-miR398a-2119a    UGCGAGACACAAGACAUAGCCUCCUU-----UUUCUACUUUUUUUUCAAGUUGAUG      606
gma_pri-miR398b-2119b    UGCGAGACACAAGACAUAGCCUCCUU-----UUUCUACUU--UUUUUAAGUUGAUG      718
cca_pri-miR398a-2119      UACCGAACACAAACUACAACCAUUAAUGAGAAGUAGUU--GAUUUUUUUCAAGUUGAUG      723
                        *      * * * *      * *      * *      * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119      AUAUU-----AACUAUGGUUUAAAGUUAUUGGGAGUUUCUUUCUAUUUGUGUGU      654
gma_pri-miR398a-2119a    ACAAUUAUUAGAGUUUAACUAUGGUUAAGUU--GGGAGGUUU-----CCUUUUUUUU      659
gma_pri-miR398b-2119b    ACAAUUAUUAGAGUUUAACUAUGGUUAAGUU--GGGAAGUUC-----UUUUUUUU      769
cca_pri-miR398a-2119      ACAAU--AAUAGCAUCCACAAACUAUAGAAGGU--UGUCAAUUC-----GUCCAC      769
                        * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * *

                        Alt 3' SS
                        ↓
pvu_pri-miR398a-2119      AUUUUGAUGCAGGAAAAUGAAGGA-----UUGUUAGAGCAGAUUAGUUAAGUCCU---      703
gma_pri-miR398a-2119a    UUUUUUAUACAGAAAAUUAAAGGCCUUUGAAUGCUAAAGCAGAAAUGCAGUUACUAGCU      719
gma_pri-miR398b-2119b    UUUUUUAUACAGGAAAAUCAAGGAUCCUUGAAUGCUAAA-----UUGAAGUUAAGU      808
cca_pri-miR398a-2119      UUUUUAAAAUA-----UUCUAUGGCAAUGAAUCAUGU-----UUGAAGUUAAGU      801
                        **** * *      * *      * *      * *

```

Figura 48. Comparación de los precursores pre-miR398a-miR2119 entre las *P. vulgaris*, *G. max* y *C. cajan*. Alineamiento con clustal O de la secuencia del precursor pre-miR398a-miR2119 de las *P. vulgaris* (pvu), *C. cajan* (cca) y los dos parálogos de pre-miR398a-miR2119 presentes de *G. max* (gma). Los sitios de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS) se señalan con flecha, así como también el sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3'SS). Las secuencias de los bordes de exones e intrones son resaltadas en color rojo y azul, respectivamente. Las secuencias de miR398a* y miR2119* se indican de color azul y naranja, respectivamente. La secuencia de los miRNAs maduros está señalada con un rectángulo del mismo color utilizado para la secuencia de miRNA*.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

pvu_pri-miR398a-2119      -GGUUUAUCUCAGAGGAGUGAAUUUGAGAACACAAAGGCUGGUUUUGUAAUU--CAUAAUUU      57
lja_pri-miR398a-2119      -GGUCUAUCUCAAGGAGUGAGCCUGAGAACACAAAGCUGAAUUGGUUUUGAAUUGCCAUU      59
lcu_pri-miR398a-2119      GGUUCUAUCUCAGAGGAGUGAAACUGAGAACACAAAGAUUGAUUGGUA-----      47
mtr_pri-miR398a-2119      GGUUCUAUCUCAGAGGAGUGACACUGAGAACACAAAGAUUGAUUAAUCAU-----A-      50
car_pri-miR398a-2119      GGUUCUAUCUCAGAGGAGUGAAUCUUGAGAACACAAAGAUUGAUUGGUUAG-ACAACAAUU      59
tpr_pri-miR398a-2119a    GGUUCUAUCUCAGAGGAGUGACACUAGAACACAAAGAUUGAUUGGUUAAA--ACAAAA      57
tpr_pri-miR398b-2119b    GGUUCUAUCUCAGAGGAGUGACACUUGAGAACACAAAGAUUGAUUGGUUGACACUACAAAA      59
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119      CAUUUGUUGG-----UAUUUGGUGUGAAUCUACUUUGUGUUCUCAGGUCA      102
lja_pri-miR398a-2119      CACAUACUGAUUUCUGGUUAGGC-UUUUAGUUGCUAAUUUAAUUUGUGUUCUCAGGUCA      118
lcu_pri-miR398a-2119      -----AAUUUGCUUGUUGUUAAUUUAAUUUGUGUUCUCAGGUCA      86
mtr_pri-miR398a-2119      ---U-----AAUGUAAUUGGUUUACUAGUUGAUUUUGUGUUCUCAGGUCA      94
car_pri-miR398a-2119      CAUCUAAUUGCAUAUAGGACUAUAAUUUGUUUCUUGCUAAUUUAAUUUGUGUUCUCAGGUCA      119
tpr_pri-miR398a-2119a    -----AUUGAUUCUUUUGUUAACUAAUUUGUUUUUGUGUUCUCAGGUCA      99
tpr_pri-miR398b-2119b    -----AUUAAUUUGUUUUUUAAUUUCCUUUUUGUGUUCUCAGGUCA      101
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

pvu_pri-miR398a-2119      CCCCUUUGAGCCAACCGUUGACAUG-----CUAAACCUAA-----      138
lja_pri-miR398a-2119      CCCCUUUGAGCUGACCGUUGAACAUAUGGUUU--UACA-----UUUGCAA      161
lcu_pri-miR398a-2119      CCCCUUUGAAUCAACCUUGUUAAACCAUGUUU--UAGAUUGUA-----AUUAUA      134
mtr_pri-miR398a-2119      CCCCUUUGAGUCAACCUUGUUAAACUGUG---AUUUUAAUUUUUG-----AUUGUA      142
car_pri-miR398a-2119      CCCCUUUGAGCAAACCUUGUUAAUUAGCUAUGAUUUUAAAUAUGAUUAAAUAUUGCAA      179
tpr_pri-miR398a-2119a    CCCCUUUGAGUUAACUUCUUGUUAACUUAAGUUUUUAAUU--AUGAUGA-----      144
tpr_pri-miR398b-2119b    CCCCUUUGAAGUCAACCUUGUUAAUUUAGUUUUUAAUUAAUUUAGAUUAAG--AUUACAG      159
                        ***** *      * * * *      * * * *      * * * *

pvu_pri-miR398a-2119      -----AC-----CAAAA-----      145

```

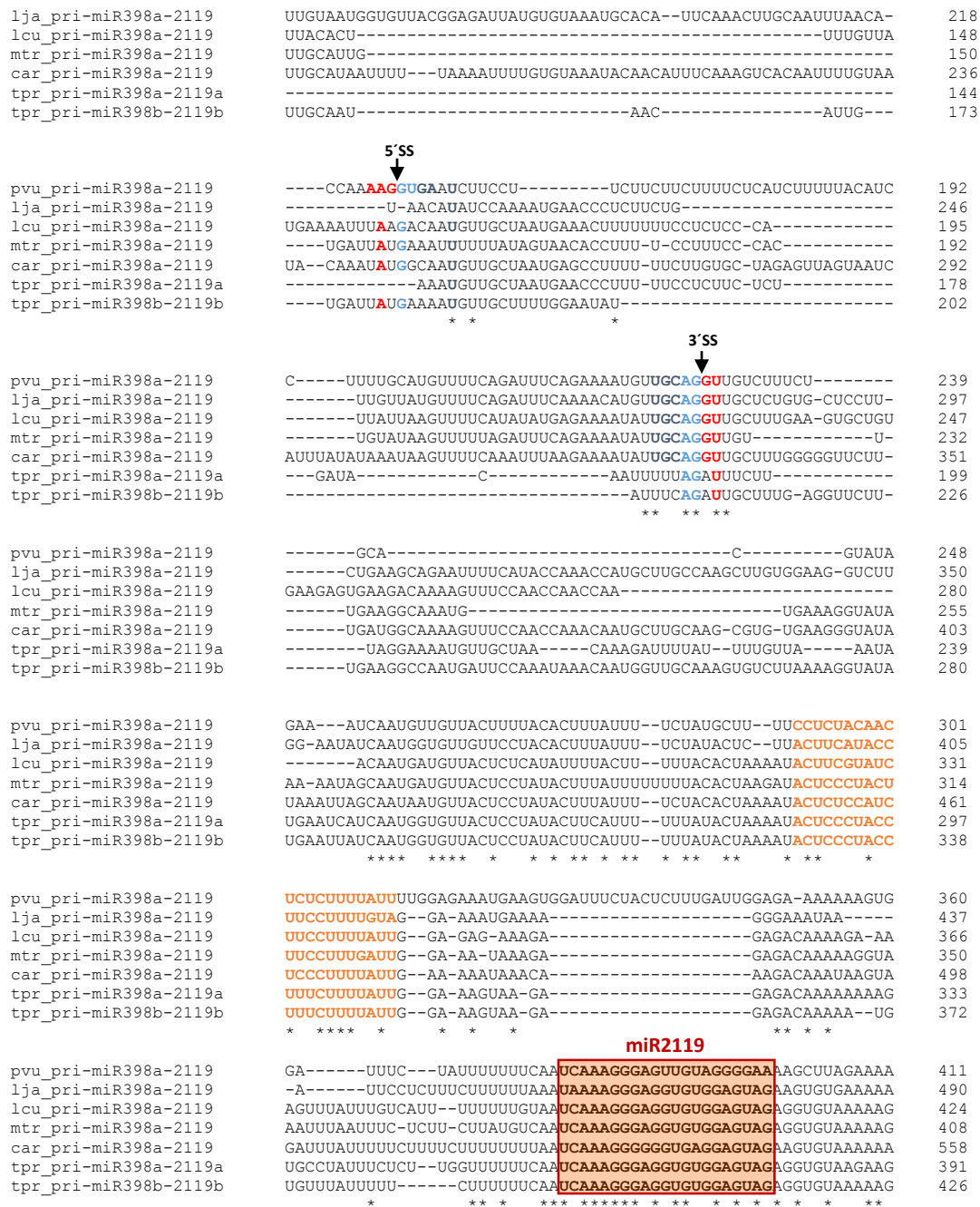


Figura 49. Comparación de secuencia de los precursores pre-miR398a-miR2119 en especies de Hologaleginas. Alineamiento del precursor pre-miR398a-miR2119 de *P. vulgaris* con los precursores de *L. japonicus* (lja), *L. culinaris* (lcu), *M. truncatula* (mtr), *C. arietinum* (car) y dos parálogos de *T. pratense* (tpr). Los sitios de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS) se señalan con flecha. Las secuencias de los bordes de exones e intrones son resaltadas en color rojo y azul, respectivamente. Las secuencias de miR398a* y miR2119* se indican de color azul y naranja, respectivamente. La secuencia de los miRNAs maduros está señalada con un rectángulo del mismo color utilizado para la secuencia de miRNA*.

En resumen, el análisis de secuencia de los precursores pre-miR398a-miR2119 en las distintas especies pertenecientes a los clados Hologaleginas y Millettioides muestran que existe conservación de los sitios de splicing en las especies de los géneros *Phaseolus* y *Vigna* (Figura 50), lo cual sugiere un proceso adicional de la regulación a nivel post-transcripcional en la acumulación de miR398a y miR2119, con excepción de *V. unguiculata*. Probablemente, éste proceso se ha refinado para regular la acumulación de los miRNAs en alguna condición particular, tejido específico o quizás en cierta etapa de desarrollo o condición de estrés que permita la regulación de los mRNAs blancos (CSD1 y ADH1) de manera diferencial, distinto a lo que se caracterizó en éste trabajo durante déficit hídrico.

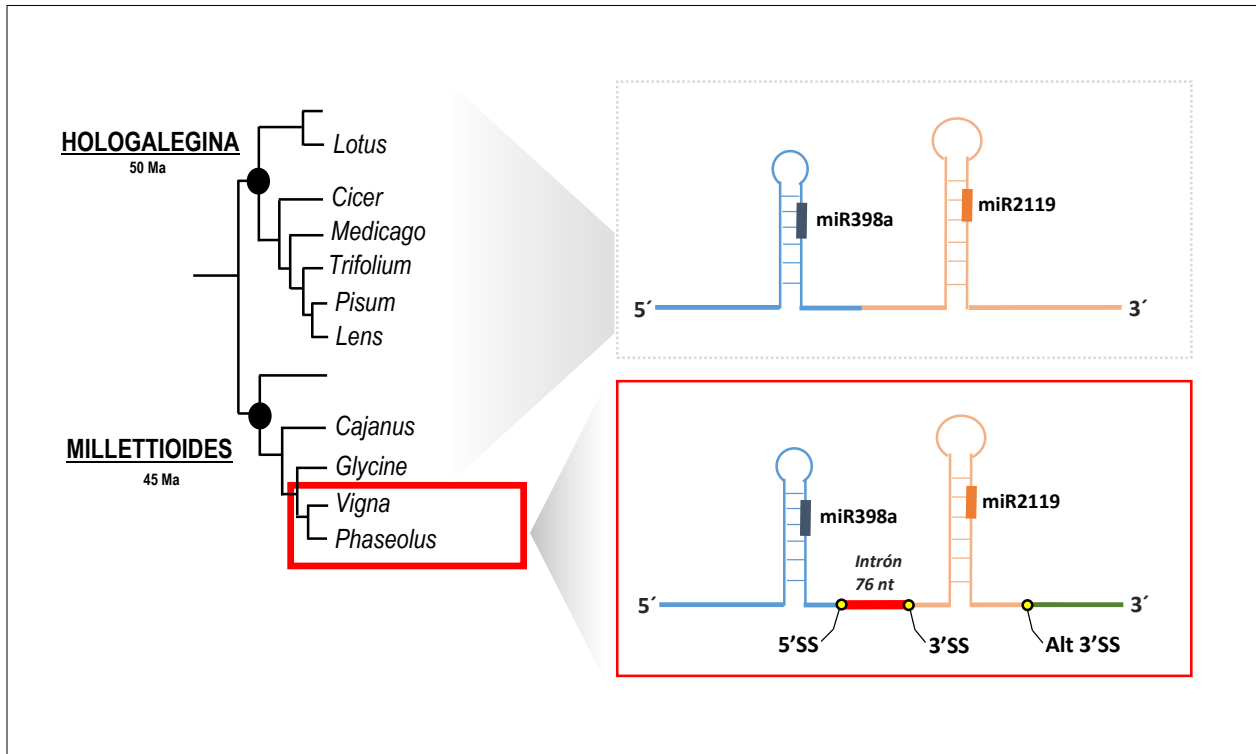


Figura 50. Regulación adicional del precursor pre-miR398a-miR2119 por el procesamiento de splicing en los géneros de *Vigna* y *Phaseolus*. Dentro de los clados importantes en la subfamilia de las Papilionoideae están las Hologaleginas y los Millettioides, y se indica en el diagrama de árbol con punto negro, el posible surgimiento de cada clado en millones de años “Ma”. En el diagrama de árbol, se indica los géneros analizados que contienen el precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119. Se señala la secuencia del precursor de miR398 y miR2119 (azul y naranja), y el intrón predicho de 76 nt en rojo; así como los sitios de splicing 5' y 3' (5'SS y 3'SS, respectivamente) y sitio de splicing alternativo 3' (Alt 3'SS).

X. DISCUSIÓN

Durante la caracterización de miR2119 en *P. vulgaris*, identificamos a otro miRNA proveniente del mismo gen, miR398a. Ambos miRNAs están contenidos en el mismo transcrito. Este precursor dicistrónico se procesa y los miRNAs maduros resultantes regulan a dos blancos diferentes, *ADH1* y *CSD1*. miR398 se encuentra distribuido ampliamente en las espermatofitas (plantas vasculares que producen semilla). En cambio, miR2119 sólo lo encontramos en la familia de las leguminosas, lo que sugiere la reciente aparición de este miRNA en un linaje específico. Estudios previos identificaron la existencia de precursores policistrónicos que contiene miRNAs conservados o con secuencia similar (miRNAs homólogos) en un mismo transcrito, tal es el caso del precursor policistrónico que codifica a miR395 en distintas especies vegetales (Guddeti et al., 2005). Además, se han identificado precursores policistrónicos que contienen dos miRNAs no relacionados (miRNAs no homólogos). Estos miRNAs maduros resultantes regulan a diferentes mRNAs blanco, los cuales codifican para proteínas con funciones relacionadas, por lo que sugiere una regulación coordinada de los miRNAs no homólogos afectando la expresión de diferentes genes involucrados en un mismo proceso de manera simultánea (Merchan et al., 2009). En nuestro trabajo, el precursor dicistrónico *MIR398-MIR2119* en *P. vulgaris*, es el único caso descrito hasta ahora donde el transcrito contiene un miRNA conservado y un miRNA no conservado, miR398a y miR2119, respectivamente.

Exploramos diferentes bases de datos la presencia de la secuencia de miR2119 en distintas especies de leguminosas. Nuestro análisis de secuencia mostró que miR2119 se encuentra sólo en clados específicos dentro de la subfamilia Papilionoideae, la cual incluye especies de importancia para el consumo humano y como forraje. Dentro de las papilionoideas, en los genomas analizados de los clados Millettiodes y Hologalegina, *MIR2119* y *MIR398a* se encuentran localizados en el mismo gen. En contraste, en el clado Dalbergioides, *MIR2119* está localizado en un *locus* diferente al de *MIR398a*, sugiriendo esto como una posible organización genómica ancestral.

En el caso de microRNAs de reciente emergencia evolutiva, también llamados miRNAs jóvenes o miRNAs no conservados, se ha propuesto que no son funcionales, principalmente por la dificultad que existe para demostrar su actividad regulatoria sobre los mRNAs blanco predichos de manera computacional. Se asume que la aparición reciente de estos miRNAs no ha sido suficiente para seleccionar un mRNA blanco en el tiempo evolutivo desde su emergencia o que probablemente, estos miRNAs están en una ruta de extinción (Allen et al., 2004; Cuperus et al., 2011). Significativamente, en este trabajo confirmamos experimentalmente mediante 5'RACE

que miR2119 es un miRNA funcional a través de detectar el corte en el transcrito que codifica para la enzima ADH1, una enzima altamente conservada. Una estrategia alternativa para identificar la regulación y el corte mediado por miRNAs sobre mRNAs blanco es mediante el uso de la técnica conocida como degradoma. Reportes recientes donde utilizaron el análisis de degradoma en *M. truncatula* y *G. max*, revelaron que el transcrito de ADH1 es también mRNA blanco de miR2119 en estas leguminosas, mostrando la conservación de la regulación de ADH1 por miRNAs en este grupo de plantas (Devers et al., 2011; Shamimuzzaman and Vodkin, 2012). Además, el estudio filogenético de las secuencias de ADH1 en la subfamilia Papilionoideae reveló eventos de duplicación que resultaron en cuatro genes de ADH1 en ciertas especies de las leguminosas. La presencia de *MIR2119* correlacionó con la conservación del sitio de reconocimiento dentro de los genes ADH1 para cada clado. Nuestros resultados sugieren que la regulación post-transcripcional de ADH1 por miR2119 ha contribuido a la expansión y a la divergencia de esta familia génica dentro de la subfamilia Papilionoideae.

En el caso de miR2119, además de ser un microRNA no conservado funcional, las leguminosas innovaron en mantener la co-regulación de miR398a y miR2119 compartiendo la biogénesis de miRNAs. Para conocer si existe algún efecto sobre la biogénesis de miRNAs al tener dos precursores en el mismo transcrito realizamos experimentos en el sistema heterólogo de *Nicotiana benthamiana* mediante la infiltración de las construcciones que expresan al precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119*, o el precursor de miR398a y de miR2119 expresados de manera independiente. En estos experimentos, se encontró que la expresión de miR398a no afectaba la expresión de miR2119 y viceversa (Figura S2). Este dato sugiere que la ventaja de tener dos microRNAs en un mismo transcrito no radica en favorecer o modificar su biogénesis, en cambio, si puede recaer en el hecho de estar coordinando la represión de los mRNAs blanco de cada microRNA y en consecuencia los procesos donde éstos participan. La co-transcripción de miR398 y miR2119 podría representar una ventaja estratégica para coordinar la expresión de los transcritos de *CSD1* y *ADH1* en respuesta a condiciones estresantes como déficit hídrico.

Por un lado, CSD1 está involucrada en regular la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), convirtiendo el anión superóxido (O_2^-) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Posteriormente, la catalasa o la peroxidasa transforman el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Asada, 1999). Los niveles elevados de ROS han sido asociados a diferentes estreses como radiación por UV, intensidad de luz, temperaturas extremas, sequía, etc. La generación de ROS ocasiona peroxidación de lípidos, daño al DNA y proteínas (Mittler et al., 2004). Por lo anterior, se ha propuesto la participación de CSD1 como necesaria para limitar la acumulación de ROS que pudiera ser dañino para la célula. Así, la planta utiliza un grupo de

enzimas que le permite controlar y mantener los niveles de ROS, aunado a un amplio número de antioxidantes como el ácido ascórbico y el glutatión, entre otras moléculas como el NAD⁺ que sirven como moduladores del estado redox de la célula. Por otro lado, se ha estudiado el papel de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en levadura y se ha demostrado que SOD1 no sólo participa en la respuesta al estrés oxidativo, también ayuda a integrar la señal mediada por oxígeno y glucosa para reprimir la respiración a través de estabilizar la interacción con casein cinasas 1-gamma de levadura (Yck1p y Yck2p). SOD1 interacciona físicamente con el extremo C-terminal de Yck1p o Yck2p, y la actividad enzimática de SOD1 es importante para prevenir la degradación de Yck1p y Yck2p. De esta manera, existe un circuito que integra el oxígeno, la glucosa y ROS para reprimir la respiración a través de la señalización de casein cinasas mediada por SOD1 (Reddi and Culotta, 2013). Este mecanismo de regulación de SOD1 se encuentra conservado en levadura y en mamíferos, por lo que no descartamos que SOD1 pueda participar en este mismo circuito en plantas.

Adicionalmente, existe un amplio estudio de la participación de miR398 y sus mRNAs blanco (*CSD1*, *CSD2*, *CSS1*, *COX5b-1* y *NOD19*) en distintos estreses como estrés oxidativo, estrés por luz, deficiencia de nutrientes (cobre y fósforo), déficit hídrico, crecimiento en altas concentraciones de sacarosa e infección por bacterias (Naya et al., 2014; Zhu et al., 2011a). En 2006, Sunkar y colaboradores encontraron una disminución de la acumulación de miR398b, lo cual permite el incremento de la acumulación de *CSD1* y *CSD2* durante estrés oxidativo en *A. thaliana* (Sunkar et al., 2006). En este mismo estudio, detectaron el transcrito de *MIR398a*, pero mantiene una baja expresión en comparación con los loci *MIR398b* y *MIR398c*. Además, se obtuvieron plantas sobreexpresoras de *mCSD2*, una versión de *CSD2* resistente al corte de miR398, las cuales mostraron una mayor tolerancia al estrés por luz, metales pesados (Cu²⁺ y Fe³⁺) y estrés oxidativo (metil viológeno) (Sunkar et al., 2006). En contraste, se ha estudiado la participación de miR398 como regulador de la homeostasis de cobre. En condiciones limitante de cobre, miR398 aumenta su acumulación para disminuir la acumulación de *CSD1*, *CSD2* y *CSS1* en *A. thaliana* (Beauclair et al., 2010; Yamasaki et al., 2007). Sin embargo, la actividad de SOD es reemplazada por FSD1 (Superóxido dismutasa que utiliza Hierro como cofactor) y el cobre limitante queda disponible para las Plastocianinas (PC), proteínas esenciales para la fotosíntesis (Yamasaki et al., 2007). A pesar de crecer plantas en concentraciones óptimas de cobre, donde los niveles endógenos de miR398 se mantienen bajos, plantas mutantes sobreexpresoras de miR398b reprimen la expresión de *CSD1* y *CSD2*, sin alterar los niveles de PC (Yamasaki et al., 2007). La expresión de miR398 está regulada por el factor transcripcional SPL7 en la respuesta a cobre en *A. thaliana*. SPL7 se une a la región promotora, específicamente

a la secuencia “GTAC”, y regula la expresión de *MIR398b* y *MIR398c* en deficiencia de cobre. En cambio, *MIR398a* no posee sitios de unión de SPL7 en su región promotora y no responde de igual forma en comparación con *MIR398b* y *MIR398c* (Yamasaki et al., 2009). Además, se ha visto la regulación positiva de miR398 por sacarosa. *MIR398c* incrementa en plantas crecidas en sacarosa, resultando en la disminución de *CSD1* y *CSD2* en *A. thaliana* (Dugas and Bartel, 2008). En otro reporte, observaron un rápido aumento en la acumulación de miR398b y la disminución en la acumulación de sus mRNAs blancos *CSD1*, *CSD2* y *CSS1* durante el tratamiento de estrés por calor en *A. thaliana* (Guan et al., 2013). Plantas transgénicas con versión resistente al corte de miR398 en *CSD1*, *CSD2* y *CSS1* con su promotor nativo muestran fenotipo de hipersensibilidad al estrés por calor, así como la correlación de la disminución de los genes de respuesta a calor (*Heat shock Proteins* y *Heat Stress Transcription Factors*, HSPs y HSFs, respectivamente) con respecto a la planta silvestre. En cambio, los genes HSPs y HSFs incrementaron sus niveles de expresión en mutantes de pérdida de función *csd1*, *csd2* y *css1*, las cuales fueron más tolerantes a estrés por calor en comparación con plantas silvestres de *A. thaliana* (Guan et al., 2013). Por lo anterior, el estudio de miR398 y sus mRNAs blanco ha revelado su participación en la respuesta a distintas formas de estrés, tanto abiótico como biótico en *A. thaliana* y otras especies. Esto, aunado con el estudio de mutantes en la alteración del miRNA o los mRNAs blanco donde se obtienen fenotipos con susceptibilidad o resistencia dependiendo del estrés impuesto, indica que miR398 es un miRNA que puede estar asociado a la red de regulación genética de respuesta a estrés en las plantas.

Recientemente, se describió el papel de miR398 en la homeostasis de cobre y en la respuesta a estrés biótico en *P. vulgaris* (Naya et al., 2014). Se realizaron tratamientos de toxicidad por cobre y deficiencia de cobre (CT y CD, respectivamente) en plantas de frijol crecidas en sistema hidropónico. Se encontraron patrones similares en la respuesta a cobre de miR398 previamente descrito en otros organismos. Es decir, durante el tratamiento de CT la acumulación de miR398b disminuye y sus mRNAs blanco (*CSD1* y *NOD19*) aumentan; caso contrario, en CD la acumulación de miR398b aumenta y de sus mRNAs blanco disminuye. Además, se reportó la participación de miR398b en respuesta ante rizobias simbióticas (*Rhizobium tropici* CIAT899) y hongos patógenos (*Sclerotinia sclerotiorum*). En ambos casos, los transcritos de *CSD1* y *NOD19* aumentan su acumulación, los cuales podrían estar asociado con el incremento de ROS y la posible respuesta ante la interacción con patógenos (Naya et al., 2014). Sin embargo, en nuestro estudio se observó la participación de miR398a y miR398b durante el desarrollo de *P. vulgaris*, donde ambos miRNAs aumentan su acumulación y mantienen reprimido los niveles de acumulación de *CSD1*, probablemente niveles basales requeridos para el programa de desarrollo

de órganos como la raíz. En contraste, en plantas adultas de *P. vulgaris* sometidas a tratamiento de déficit hídrico, observamos la disminución de miR398a y miR398b, lo que permite el aumento de *CSD1*, tanto en raíz como en hoja. Nuestros datos son consistentes con la idea del aumento en los niveles de *CSD1*, que en conjunto con otras enzimas participan en la regulación de ROS, contribuyendo a mantener el estado redox intracelular apropiado en la respuesta al estrés.

Por otro lado, la enzima ADH1 participa en la producción de etanol a través de la vía de la fermentación. Esto ha sido ampliamente estudiado cuando las células vegetales se ven sometidas a estrés por limitación de oxígeno (hipoxia o anoxia), inhibiendo la entrada del piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Una alternativa para la producción de ATP, en menor proporción, es la vía anaeróbica, por la cual el piruvato puede ser convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), o ser convertido a acetaldehído por la piruvato descarboxilasa (PDC) y después, el acetaldehído es transformado a etanol por la ADH1. En ambas direcciones, la fermentación permite regenerar el NAD⁺ para ser utilizado nuevamente en la glucólisis (Bray et al., 2000). Sin embargo, el estudio de mutantes *adh1* en *A. thaliana* ha demostrado que la fermentación alcohólica también tiene un papel importante en condiciones aeróbicas, debido a que estas mutantes muestran una mayor acumulación de piruvato comparado con las plantas silvestres en condiciones de normoxia, sugiriendo que se requiere mantener un control de los niveles de piruvato aún en condiciones normales. Esto puede ser logrado a través de la actividad de ADH1, por lo cual la producción de etanol no es exclusiva de condiciones de limitación de oxígeno (Zabalza et al., 2009). Así, ADH1 podría ser importante para controlar el consumo o la cantidad de piruvato canalizado hacia TCA y regular la obtención de energía durante una condición adversa. Además, durante déficit hídrico el aumento de ADH1 podría ser necesario para regenerar los niveles NAD⁺ requerido para mantener un estado redox óptimo. De esta manera, la actividad de ADH1 podría estar coordinada con la actividad de *CSD1* en modular los niveles de NAD⁺ y otras moléculas antioxidantes involucradas en mantener un balance redox apropiado durante condiciones estresantes (Figura 51). Adicionalmente, el etanol producido por la actividad de ADH1 podría servir como molécula señalizadora durante el déficit hídrico, ya que se ha sugerido en experimentos de *A. thaliana* y arroz, donde se observó que la adición de etanol provocó un aumento en los transcritos que codifican para los factores transcripcionales como AtZAT10 y AtZAT12, involucrados en la señalización de la respuesta de ROS, y también en el aumento de los genes AtAPX1 y AtAPX2 que codifican para la enzima Ascorbato peroxidasa (APX), localizada en el citosol y encargada de transformar el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Con esto, el aumento de la actividad de APX correlacionó con la disminución de ROS en respuesta a estrés salino. Por lo tanto, el etanol siendo uno de los

productos finales de la fermentación, podría ser utilizado como molécula para amplificar la señal a través de encender la vía de regulación de ROS en respuesta a estrés. Los datos anteriores indican que ADH1 puede participar de distintas maneras en la respuesta a déficit hídrico. Sin embargo, queda por explorar la relevancia individual de cada uno de estos procesos.

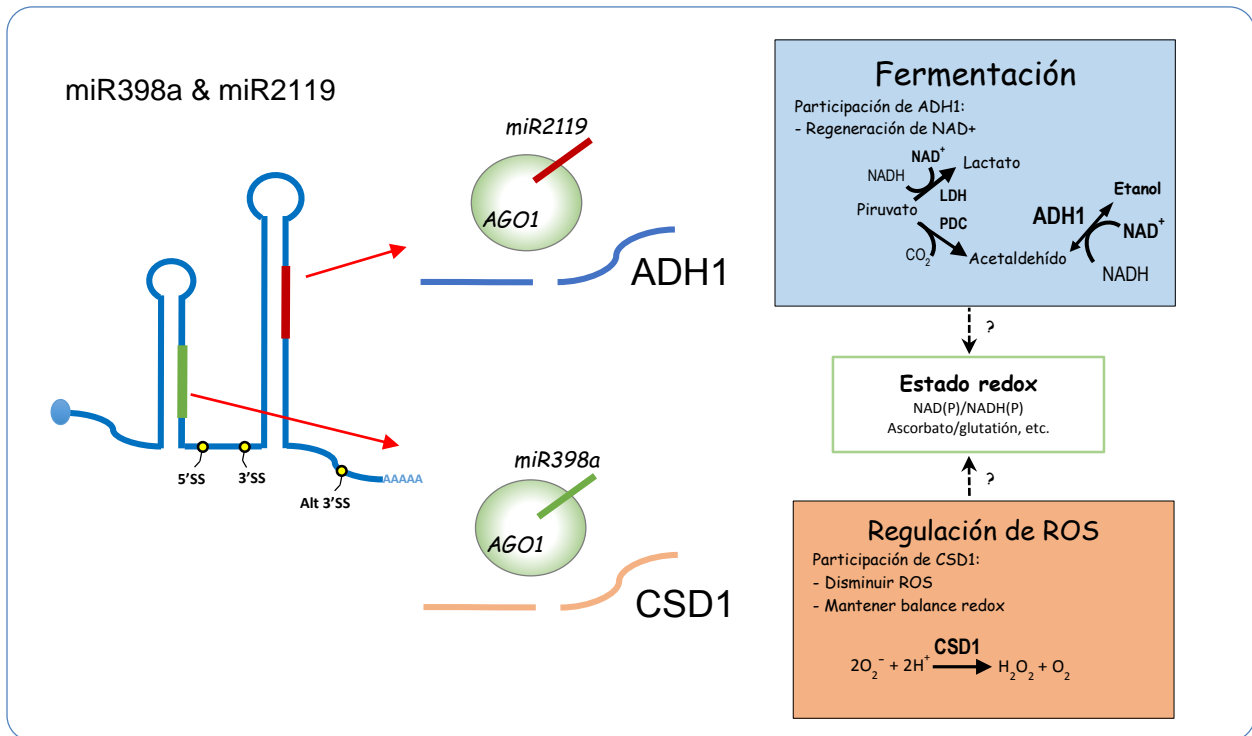


Figura 51. El precursor dicistrónico pre-miR398a-miR2119 produce dos miRNAs que coordinan la expresión de *CSD1* y *ADH1*, las cuales están involucradas en la regulación de las ROS y el metabolismo de la fermentación, respectivamente, durante condiciones estresantes en *P. vulgaris*.

Durante el estrés, se sugiere que la disminución en la acumulación de *miR398* y *miR2119* permite el aumento de *CSD1* y *ADH1*. Como resultado, la actividad de estas dos enzimas podría estar coordinada y probablemente conectada a través de mantener un estado redox apropiado en las células. Adicionalmente, el precursor dicistrónico puede ser procesado por splicing alternativo, generando un transcrito que sólo contiene al precursor de *miR398*. De esta forma, la acumulación diferencial de los miRNAs permite la regulación específica de *CSD1* y *ADH1*. Se señala en la secuencia del precursor, los sitios de splicing 5', 3' y sitio de splicing alternativo 3' (5'SS, 3'SS y Alt 3'SS, respectivamente).

La gran mayoría de los mRNAs blanco de miRNAs codifican para factores transcripcionales (TFs), colocando a los miRNAs como reguladores maestros en las redes de expresión genética (Jones-Rhoades et al., 2006). Estos TFs tienen una tendencia a estar

involucrados en el desarrollo de la planta, proponiendo que la función de los miRNAs facilita la transición de una etapa a otra durante el programa de desarrollo. Sin embargo, en este trabajo caracterizamos la modulación de los mRNAs blanco que codifican para las enzimas, CSD1 y ADH1, lo que sugiere que durante condiciones estresantes como déficit hídrico, los miRNAs actúan de manera distinta al desarrollo, modulando la expresión de estos transcritos de manera reversible, llevando a que una vez solventada la condición adversa, se recupere la acumulación de los transcritos a los niveles iniciales u óptimos.

En resumen, en este trabajo estudiamos la contribución de dos miRNAs provenientes de un precursor dicistrónico durante condiciones de déficit hídrico. La represión de miR398 permite el aumento de CSD1 para participar en el control y la regulación de ROS, mientras que la disminución de miR2119 permite el aumento de ADH1 participando en la regeneración de NAD⁺ y la regulación de los niveles de piruvato, en conjunto contribuyendo a mantener el balance del estado redox celular a través de regular las moléculas como NAD⁺, ácido ascórbico, glutatión, entre otras. En este escenario, los microRNAs podrían coordinar la actividad de dos procesos, revelando que la fermentación y la regulación de ROS están conectados a diferentes niveles, a través de la acción de microRNAs, producción de metabolitos y posiblemente por señalización de etanol. Adicionalmente, durante la caracterización del precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119* en *P. vulgaris*, encontramos procesamiento de splicing alternativo de este transcrito, generando una isoforma donde sólo se encuentra *MIR398a*. Esto revela un proceso adicional de la regulación a nivel post-transcripcional de la acumulación de miR398a y miR2119. Posiblemente, este proceso ha permitido regular la acumulación diferencial de estos miRNAs en alguna condición particular, tejido específico o quizás en cierta etapa de desarrollo o condición de estrés que permita la regulación de manera específica de sus mRNAs blanco, *CSD1* y *ADH1*.

XI. CONCLUSIONES

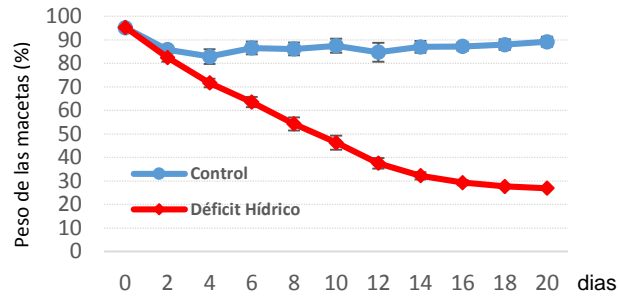
- miR398a y miR2119 representan dos microRNAs, uno conservado y otro no conservado, presentes en un precursor dicistrónico que permite su expresión coordinada.
- Existen al menos dos genes *MIR398* en leguminosas, uno donde *MIR398* se encuentra como unidad transcripcional independiente y otro donde *MIR398* y *MIR2119* forman parte de un precursor dicistrónico.
- miR2119 es un microRNA linaje-específico, particularmente identificado en los genomas de las especies perteneciente a los clados Dalgergioides, Hologaleginas y Milletioides de la subfamilia Papilionoideae de las leguminosas.
- En *P. vulgaris*, el precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119* produce dos miRNAs que regulan a dos mRNAs blanco diferentes: *CSD1* y *ADH1*.
- Durante el desarrollo de raíz en *P. vulgaris*, miR398 y miR2119 incrementan su acumulación y existe una correlación inversa con la acumulación del transcrito de sus mRNAs blanco, *CSD1* y *ADH1*.
- Durante tratamientos de déficit hídrico e inundación, la represión miR398 y miR2119 conlleva a un aumento coordinado de los niveles de acumulación tanto de transcrito como de proteína de *CSD1* y *ADH1* en plantas adultas de *P. vulgaris*.
- En *P. vulgaris*, el gen *MIR398a-MIR2119* produce un transcrito que es procesado por splicing y genera al menos dos isoformas donde una contiene al precursor dicistrónico y otra únicamente a miR398a.

XII. PERSPECTIVAS

- Determinar como la regulación coordinada de CSD1 y ADH1 afecta el balance redox en condiciones de estrés.
- Explorar si otras condiciones adversas que provocan estrés oxidativo y/o alteraciones en el potencial redox celular provocan una respuesta a nivel de miR398 y miR2119.
- Determinar cuál es la relevancia biológica de regular la expresión de *MIR398a-MIR2119* por splicing alternativo.
- Explorar la co-expresión de CSD1 y ADH1. Buscar condiciones donde CSD1 no se expresa y ADH1 si (presencia de miR398 y ausencia de miR2119) que daría un punto de partida para buscar AS de *MIR398a-MIR2119* buscando la isoforma con pre-miR398a únicamente.
- Explorar condiciones que favorezcan la expresión diferencial de los precursores de pre-miR398a-miR2119, así como otras formas de estrés: oxidativo, osmótico, choque térmico, etc.
- Confirmar o descartar si existe procesamiento por splicing del precursor dicistrónico en otras especies de leguminosas como *M. truncatula* y *G. max*.
- Determinar la localización tisular de miR398 y miR2119.
- Explorar elementos regulatorios en *cis* en la región promotora de *MIR398a-MIR2119*, así como conocer factores de transcripción que regulen la expresión del mismo gen.

XIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

A



B

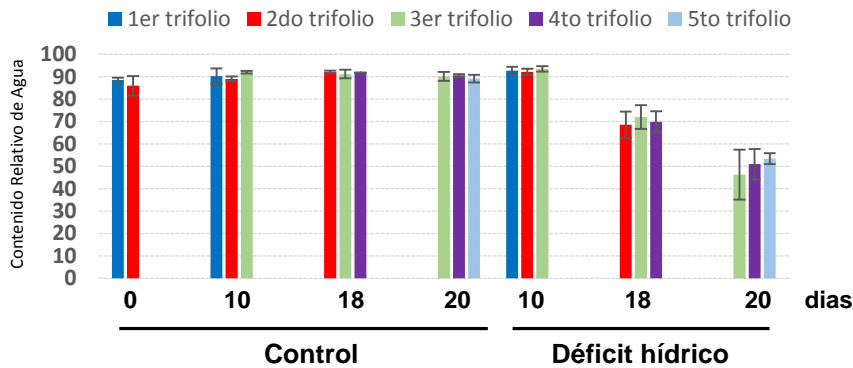


Figura S1. Observación del curso del tratamiento de déficit hídrico en plantas adultas de *P. vulgaris*.

A) Porcentaje en el peso de las macetas medidas a lo largo del tratamiento de déficit hídrico y control. El día inicial (0 días) fue tomado como referencia al 100% en plantas de irrigación óptimas, las plantas control (línea azul) y en déficit hídrico (línea roja), las barras de error indican la desviación estándar del peso de 3 a 10 macetas independientes por cada punto del tratamiento. **B)** El contenido relativo de agua (CRA) en el 1er, 2do, 3er, 4to y 5to del folíolo central de la hoja recolectada a diferentes tiempos del tratamiento. El CRA fue el promedio de tres folíolos centrales (tres plantas independientes) de cada hoja recolectada en cada punto del tratamiento déficit hídrico y control, el CRA se describe en la parte de materiales y métodos, las barras de error indican la desviación estándar del CRA de tres plantas independientes para cada muestra. Plantas jóvenes contienen 1ro y 2do trifolio (azul y rojo, respectivamente), plantas adultas contienen 3er, 4to y 5to trifolio (verde, morado y azul claro, respectivamente).

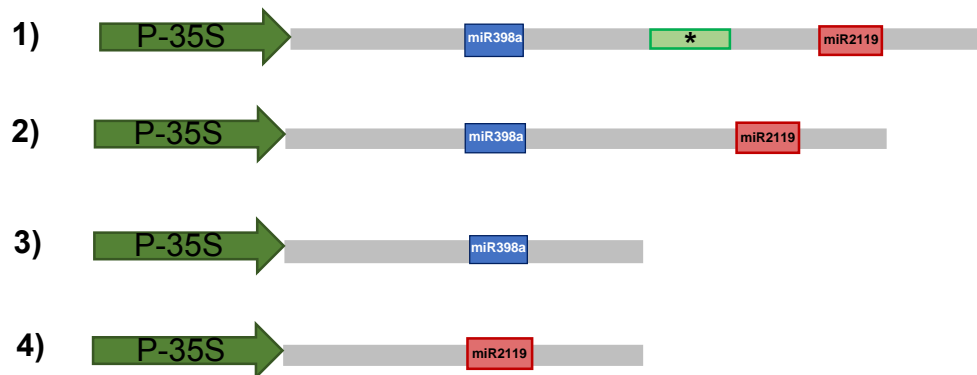
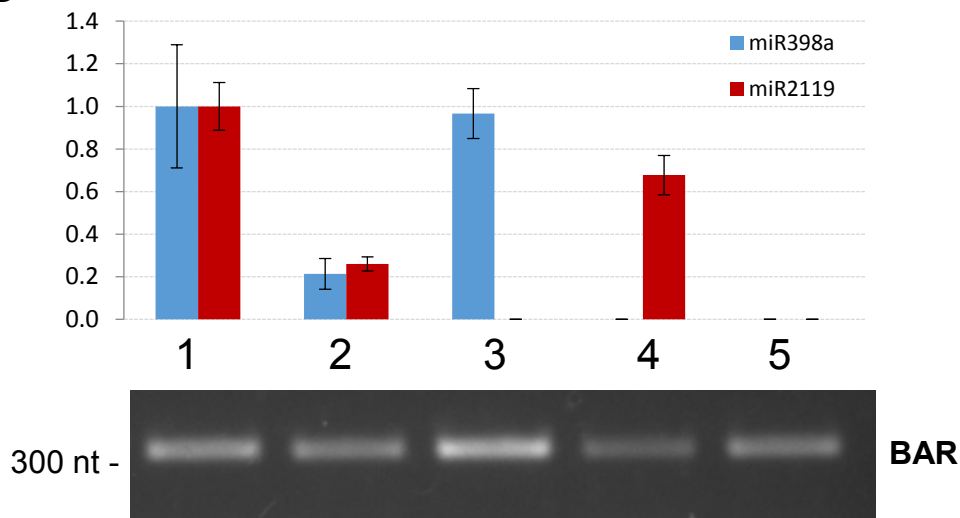
A**B**

Figura S2. Expresión transitoria del precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119* por infiltración en *N. benthamiana*. **A)** Construcciones infiltradas en *N. benthamiana*: 1) precursor dicistrónico *MIR398a-MIR2119*, 2) precursor dicistrónico procesado de *MIR398a-MIR2119* (proc-miR398a-miR2119, precursor procesado que elimina un fragmento con características de intrón), 3) precursor *MIR398a*, 4) precursor *MIR2119*. Cada transcrito está bajo la regulación del promotor CaMV 35S (verde), miR398a y miR2119, rectángulo en azul y rojo, respectivamente. El rectángulo en verde claro con asterisco en 1), señala el intrón predicho de 76 nt de longitud. **B)** Se determinó mediante RT-qPCR la acumulación de miR398a y miR2119. Se usó a miR159 endógeno de *N. benthamiana* como gen referencia en el RT-qPCR. El gen BASTA (BAR) se tomó como gen de referencia en la infiltración en *N. benthamiana* y como control negativo se utilizó vector vacío, denotado con el número 5 (De la Rosa, 2012).

XIV. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

qPCR	
ADH1.1_fwd-rt3	GAGCACAGCTGGTCAGGTCATC
ADH1.1_rev-rt3	GTCCCCGGGTTTCAGATGAGTC
ADH1.2_Fw-Rt	CTGCGACCGTTGGCCAGATAATC
ADH1.2_Rv-Rt	CATGGTCTCCTGGTTGCAAATGAG
CSD1-Fwd	TCTTCTTGTGCTACTTCTAGAC
CSD1-qRev2	TCACTGCTGCCAAGAAGTGC
Pv-Act11-Fwd	TGCATACGTTGGTGATGAGG
Pv-Act11-Rev	AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG
Pvu-miR398a-sh	TGTGTTCTCAGGTCACCCCT
Pvu-miR398b	TGTGTTCTCAGGTCGCCCTG
Pvu-miR2119	CAAAGGGAGTTGTAGGGG
Mtr-U6snRNA	GAGAAGATTAGCATGGCCCT
qPCR PRECURSORES	
CACC-pre2119	CACCTGTTGCAGGTTGTCTTTCTGC
Pre-2119-Rev	GTATGCCACAATGATATCATTC
Proc-398a-2119-Fwd	CCAAAAGGTTGTCTTTCTGCACG
Pre-2119-Fwd	CAGAGGAGTGAATTTGAGAAC
Proc-398-Rev	ACAATCCTTCATTTTCCTTTTGG
5'RACE	
Adaptador 5'	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUGAUGAAA
5'RACE outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5'RACE inner	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
ADH1-Rv4	GTGTATTCACTGAATGTAGAGG
ADH1.2_Rv-Rt	CATGGTCTCCTGGTTGCAAATGAG
Construcciones para pENTR	
CACC-pre398-2119	CACCCAGAGGAGTGAATTTGAGAAC
Pre2119Rev	GTATGCCACAATGATATCATTC
STTM mi-miR2119-Fw	CACCaagctTTCCCCTACAAaccCTCCCTTTGAgttggtggttatggct taATTTAAATatggct
STTM mi-miR2119-Rv	gaattcTCAAAGGGAGgggtTTGTAGGGGAAattcttcttcttagaccata TTTAAATtagacc
STTM mi-miR398-Fwd	CACCaagctAGGGGTGACCcaaTGAGAACACAgttggtggttatggct aATTTAAATatggct
STTM mi-miR398-Rev	gaattcTGTGTTCTCAAttgGGTCGCCCTGattcttcttcttagaccata TTTAAATtagacc

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany, S.E., and Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *J Biol Chem* 283, 15932-15945.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., and Carrington, J.C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121, 207-221.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., Sung, G.H., Spatafora, J.W., and Carrington, J.C. (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* 36, 1282-1290.
- Arenas-Huertero, C., Perez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A.A., and Reyes, J.L. (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume Phaseolus vulgaris in response to stress. *Plant Mol Biol* 70, 385-401.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 601-639.
- Aukerman, M.J., and Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15, 2730-2741.
- Axtell, M.J., and Bowman, J.L. (2008). Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci* 13, 343-349.
- Azani, N., Babineau, M., Bailey, C.D., Banks, H., Barbosa, A.R., Barbosa Pinto, R., Boatwright, J.S., Borges, L.M., Brown, G.K., Bruneau, A., *et al.* (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny - The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66, 44-77.
- Baek, D., Kim, M.C., Chun, H.J., Kang, S., Park, H.C., Shin, G., Park, J., Shen, M., Hong, H., Kim, W.Y., *et al.* (2013). Regulation of miR399f transcription by AtMYB2 affects phosphate starvation responses in Arabidopsis. *Plant physiology* 161, 362-373.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., and Scheible, W.R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant physiology* 141, 988-999.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., and Covarrubias, A.A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology* 148, 6-24.
- Beauchair, L., Yu, A., and Bouche, N. (2010). microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *Plant J* 62, 454-462.
- Bertioli, D.J., Cannon, S.B., Froenicke, L., Huang, G., Farmer, A.D., Cannon, E.K., Liu, X., Gao, D., Clevenger, J., Dash, S., *et al.* (2016). The genome sequences of Arachis duranensis and Arachis ipaensis, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nat Genet* 48, 438-446.

- Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., and Voinnet, O. (2018). Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol Cell* 69, 709-719 e705.
- Bologna, N.G., and Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* 65, 473-503.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2, 48-54.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stress. Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., and Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., and Pereira, J. (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30 239-264.
- Chen, L., Luan, Y., and Zhai, J. (2015). Sp-miR396a-5p acts as a stress-responsive genes regulator by conferring tolerance to abiotic stresses and susceptibility to *Phytophthora nicotianae* infection in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 34, 2013-2025.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303, 2022-2025.
- Chiou, T.J., Aung, K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F., and Su, C.L. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 412-421.
- Christie, P.J., Hahn, M., and Walbot, V. (1991). Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings. *Plant physiology* 95, 699-706.
- Chuck, G., Cigan, A.M., Saeteurn, K., and Hake, S. (2007). The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat Genet* 39, 544-549.
- Covarrubias, A.A., and Reyes, J.L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ* 33, 481-489.
- Cui, P., Zhang, S., Ding, F., Ali, S., and Xiong, L. (2014). Dynamic regulation of genome-wide pre-mRNA splicing and stress tolerance by the Sm-like protein LSm5 in Arabidopsis. *Genome Biol* 15, R1.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., and Carrington, J.C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23, 431-442.
- Dash, S., Campbell, J.D., Cannon, E.K., Cleary, A.M., Huang, W., Kalberer, S.R., Karingula, V., Rice, A.G., Singh, J., Umale, P.E., *et al.* (2016). Legume information system (LegumeInfo.org): a key

- component of a set of federated data resources for the legume family. *Nucleic Acids Res* *44*, D1181-1188.
- de Bruxelles, G.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S., and Dolferus, R. (1996). Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant physiology* *111*, 381-391.
- De la Rosa, C. (2012). Análisis funcional de un microRNA de leguminosas, miR2119 en respuesta a déficit hídrico. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- De la Rosa, C., and Reyes, J.L. (2019). Northern Blot Analysis of microRNAs and Other Small RNAs in Plants. *Methods Mol Biol* *1932*, 121-129.
- Devers, E.A., Branscheid, A., May, P., and Krajinski, F. (2011). Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* *156*, 1990-2010.
- Dietz, K.J., Vogel, M.O., and Viehhauser, A. (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* *245*, 3-14.
- Ding, Y., Tao, Y., and Zhu, C. (2013). Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *J Exp Bot* *64*, 3077-3086.
- Dos Santos, P.C., Fang, Z., Mason, S.W., Setubal, J.C., and Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics* *13*, 162.
- Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant physiology* *131*, 900-910.
- Dugas, D.V., and Bartel, B. (2008). Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol Biol* *67*, 403-417.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.B., and Waterhouse, P.M. (2009). The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* *15*, 2219-2235.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P.M., and Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc* *2*, 1819-1824.
- Fang, Y., and Spector, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr Biol* *17*, 818-823.
- Fang, Y., Xie, K., and Xiong, L. (2014). Conserved miR164-targeted NAC genes negatively regulate drought resistance in rice. *J Exp Bot* *65*, 2119-2135.
- Fang, Y., and Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci* *72*, 673-689.
- Fei, Q., Zhang, Y., Xia, R., and Meyers, B.C. (2016). Small RNAs Add Zing to the Zig-Zag-Zig Model of Plant Defenses. *Mol Plant Microbe Interact* *29*, 165-169.

- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., and Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 *Suppl*, S15-45.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A., and Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39, 1033-1037.
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2012). Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J* 31, 3588-3595.
- Gallie, D.R. (1993). Posttranscriptional regulation of gene-expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44, 77-105.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F., and Young, N.D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant physiology* 137, 1228-1235.
- Gong, Z., Dong, C.H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (2005). A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 256-267.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.
- Griesmann, M., Chang, Y., Liu, X., Song, Y., Haberer, G., Crook, M.B., Billault-Penneteau, B., Laressergues, D., Keller, J., Imanishi, L., *et al.* (2018). Phylogenomics reveals multiple losses of nitrogen-fixing root nodule symbiosis. *Science* 361.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., and Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *Plant J* 74, 840-851.
- Guddeti, S., Zhang, D.C., Li, A.L., Leseberg, C.H., Kang, H., Li, X.G., Zhai, W.X., Johns, M.A., and Mao, L. (2005). Molecular evolution of the rice miR395 gene family. *Cell Res* 15, 631-638.
- Hajyzadeh, M., Turktas, M., Khawar, K.M., and Unver, T. (2015). miR408 overexpression causes increased drought tolerance in chickpea. *Gene* 555, 186-193.
- Hsiao, T.C. (1973). Plant Responses to water stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 24, 519-570.
- Hugouvieux, V., Kwak, J.M., and Schroeder, J.I. (2001). An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* 106, 477-487.
- Ibrahim, F., Rohr, J., Jeong, W.J., Hesson, J., and Cerutti, H. (2006). Untemplated oligoadenylation promotes degradation of RISC-cleaved transcripts. *Science* 314, 1893.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* 39, 282-291.

- Iwakawa, H.O., and Tomari, Y. (2013). Molecular insights into microRNA-mediated translational repression in plants. *Mol Cell* 52, 591-601.
- Iwakawa, H.O., and Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 25, 651-665.
- Iwata, H., and Gotoh, O. (2011). Comparative analysis of information contents relevant to recognition of introns in many species. *BMC Genomics* 12, 45.
- Iwata, Y., Takahashi, M., Fedoroff, N.V., and Hamdan, S.M. (2013). Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in Arabidopsis microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Res* 41, 9129-9140.
- Jacob, T., Ritchie, S., Assmann, S.M., and Gilroy, S. (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12192-12197.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Li, Y.F., Shukla, L.I., Matts, J., Hoyt, P., Macmil, S.L., Wiley, G.B., Roe, B.A., Zhang, W., *et al.* (2009). Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *The New phytologist* 184, 85-98.
- Jia, F., and Rock, C.D. (2013). MIR846 and MIR842 comprise a cisgenic MIRNA pair that is regulated by abscisic acid by alternative splicing in roots of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 81, 447-460.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
- Jones-Rhoades, M.W., and Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14, 787-799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57, 19-53.
- Kamaluddin, M., and Zwiazek, J.J. (2002). Ethylene enhances water transport in hypoxic aspen. *Plant physiology* 128, 962-969.
- Kant, S., Peng, M., and Rothstein, S.J. (2011). Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in Arabidopsis. *PLoS Genet* 7, e1002021.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* 4, 205-217.
- Kim, J.H., Choi, D., and Kende, H. (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* 36, 94-104.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., and Last, R.L. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant physiology* 118, 637-650.

- Knauer, S., Holt, A.L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E.J., Hinze, A., Pisch, M., Javelle, M., Timmermans, M.C., Tucker, M.R., and Laux, T. (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Dev Cell* 24, 125-132.
- Komatsu, S., Deschamps, T., Hiraga, S., Kato, M., Chiba, M., Hashiguchi, A., Tougou, M., Shimamura, S., and Yasue, H. (2011). Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. *Plant molecular biology* 77, 309-322.
- Kruger, J., and Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 34, W451-454.
- Laloum, T., Martin, G., and Duque, P. (2018). Alternative Splicing Control of Abiotic Stress Responses. *Trends Plant Sci* 23, 140-150.
- Lamke, J., and Baurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol* 18, 124.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crete, P., Voinnet, O., and Robaglia, C. (2009). Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs. *Plant Cell* 21, 1762-1768.
- Lelandais-Briere, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., Gouzy, J., and Crespi, M. (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *The Plant cell* 21, 2780-2796.
- Leustek, T. (2002). Sulfate metabolism. *Arabidopsis Book* 1, e0017.
- Li, A., and Mao, L. (2007). Evolution of plant microRNA gene families. *Cell research* 17, 212-218.
- Li, J., Reichel, M., and Millar, A.A. (2014). Determinants beyond both complementarity and cleavage govern microR159 efficacy in Arabidopsis. *PLoS Genet* 10, e1004232.
- Li, S., Castillo-Gonzalez, C., Yu, B., and Zhang, X. (2017). The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *Plant J* 90, 654-670.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., Ji, L., Pan, Z., Cao, X., Mo, B., *et al.* (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell* 153, 562-574.
- Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H., and Zhu, J.K. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20, 2238-2251.
- Lin, W.Y., Huang, T.K., and Chiou, T.J. (2013). Nitrogen limitation adaptation, a target of microRNA827, mediates degradation of plasma membrane-localized phosphate transporters to maintain phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4061-4074.
- Liu, C., Axtell, M.J., and Fedoroff, N.V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant physiology* 159, 748-758.

- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
- Liu, W.W., Meng, J., Cui, J., and Luan, Y.S. (2017). Characterization and Function of MicroRNA(*)s in Plants. *Front Plant Sci* 8, 2200.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297, 2053-2056.
- Lorkovic, Z.J., Wieczorek Kirk, D.A., Lambermon, M.H., and Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in plant science* 5, 160-167.
- Lu, C., and Fedoroff, N. (2000). A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin. *Plant Cell* 12, 2351-2366.
- Ma, C., Burd, S., and Lers, A. (2015). miR408 is involved in abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant J* 84, 169-187.
- Machida, S., Chen, H.Y., and Adam Yuan, Y. (2011). Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE. *Nucleic Acids Res* 39, 7828-7836.
- Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., and Weigel, D. (2012). Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* 151, 859-870.
- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., and Waterhouse, P.M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett* 580, 2442-2450.
- Marquez, Y., Brown, J.W., Simpson, C., Barta, A., and Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Res* 22, 1184-1195.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Murdter, F., Kuttner, F., and Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol* 7, e1000148.
- Matsui, A., Nakaminami, K., and Seki, M. (2019). Biological Function of Changes in RNA Metabolism in Plant Adaptation to Abiotic Stress. *Plant Cell Physiol*.
- McGlinchy, N.J., and Smith, C.W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* 33, 385-393.
- Mckersie, B.D., and Leshem, Y.Y. (1994). Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. *The Journal of Agricultural Science, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers* 125, 169.
- Merchan, F., Boualem, A., Crespi, M., and Frugier, F. (2009). Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins. *Genome Biol* 10, R136.

- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., *et al.* (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116-127.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9, 490-498.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E., and Carrington, J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128-141.
- Naya, L., Paul, S., Valdes-Lopez, O., Mendoza-Soto, A.B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., Reyes, J.L., and Hernandez, G. (2014). Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS One* 9, e84416.
- Nicholson, P., and Muhlemann, O. (2010). Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochem Soc Trans* 38, 1615-1620.
- Noman, A., Fahad, S., Aqeel, M., Ali, U., Amanullah, Anwar, S., Baloch, S.K., and Zainab, M. (2017). miRNAs: Major modulators for crop growth and development under abiotic stresses. *Biotechnol Lett* 39, 685-700.
- Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J., and Scheible, W.R. (2008). MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* 53, 731-738.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., and Poethig, R.S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3691-3696.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Gogolin, K.A., and Ye, H. (2006). Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 9, 256-263.
- Poethig, R.S. (2013). Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Curr Top Dev Biol* 105, 125-152.
- Pucker, B., and Brockington, S.F. (2018). Genome-wide analyses supported by RNA-Seq reveal non-canonical splice sites in plant genomes. *BMC Genomics* 19, 980.
- Raczynska, K.D., Simpson, C.G., Ciesiolka, A., Szewc, L., Lewandowska, D., McNicol, J., Szweykowska-Kulinska, Z., Brown, J.W., and Jarmolowski, A. (2010). Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* 38, 265-278.
- Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science* 321, 1490-1492.
- Ramanjulu, S., and Bartels, D. (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25, 141-151.
- Reddi, A.R., and Culotta, V.C. (2013). SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* 152, 224-235.

- Ren, G., Chen, X., and Yu, B. (2012). Uridylation of miRNAs by hen1 suppressor1 in Arabidopsis. *Curr Biol* 22, 695-700.
- Ren, G., Xie, M., Zhang, S., Vinovskis, C., Chen, X., and Yu, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 6365-6370.
- Ren, G., and Yu, B. (2012). Critical roles of RNA-binding proteins in miRNA biogenesis in Arabidopsis. *RNA Biol* 9, 1424-1428.
- Reyes, J.L., and Chua, N.H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49, 592-606.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24, 219-226.
- Rodriguez, R.E., Ercoli, M.F., Debernardi, J.M., and Palatnik, J.F. (2016). Chapter 17 - Growth-Regulating Factors, A Transcription Factor Family Regulating More than Just Plant Growth. *Plant Transcription Factors*, 269-280.
- Sakharkar, M.K., Chow, V.T., and Kanguane, P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 4, 387-393.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 998-1009.
- Shamimuzzaman, M., and Vodkin, L. (2012). Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing. *BMC Genomics* 13, 310.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Panneerselvam, R., and Shao, M.A. (2009). Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the environment in arid regions of the globe. *Crit Rev Biotechnol* 29, 131-151.
- Shaul, O. (2015). Unique Aspects of Plant Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Trends Plant Sci* 20, 767-779.
- Sheth, N., Roca, X., Hastings, M.L., Roeder, T., Krainer, A.R., and Sachidanandam, R. (2006). Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 34, 3955-3967.
- Shinozaki, K., Uemura, M., Bailey-Serres, J., Bray, E.A., and Weretilnyk, E. (2015). Responses to Abiotic Stress. *Buchanan, B.B., Grissem, W., and Jones, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd edition.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6, 410-417.

- Shivaprasad, P.V., Chen, H.M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A., and Baulcombe, D.C. (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24, 859-874.
- Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S., and Sarkar, A.K. (2018). Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* 248, 545-558.
- Smirnov, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125, 27-58.
- Song, J.B., Gao, S., Sun, D., Li, H., Shu, X.X., and Yang, Z.M. (2013). miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biol* 13, 210.
- Song, L., Han, M.H., Lesicka, J., and Fedoroff, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5437-5442.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15, 173-183.
- Stepien, A., Knop, K., Dolata, J., Taube, M., Bajczyk, M., Barciszewska-Pacak, M., Pacak, A., Jarmolowski, A., and Szweykowska-Kulinska, Z. (2017). Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8.
- Strommer, J. (2011). The plant ADH gene family. *Plant J* 66, 128-142.
- Sunkar, R., Kapoor, A., and Zhu, J.K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18, 2051-2065.
- Sunkar, R., and Zhu, J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 2001-2019.
- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., and Brown, J.W. (2012). Alternative splicing in plants - coming of age. *Trends Plant Sci* 17, 616-623.
- Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., and Vazquez, F. (2013). The crosstalk between plant microRNA biogenesis factors and the spliceosome. *Plant Signal Behav* 8, e26955.
- Tardieu, F. (2013). Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Front Physiol* 4, 17.
- Trindade, I., Capitao, C., Dalmay, T., Feveteiro, M.P., and Santos, D.M. (2010). miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231, 705-716.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal

- transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11632-11637.
- Valdes-Lopez, O., Arenas-Huertero, C., Ramirez, M., Girard, L., Sanchez, F., Vance, C.P., Luis Reyes, J., and Hernandez, G. (2008). Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ* 31, 1834-1843.
- Vierstra, R.D. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 8, 135-142.
- Wang, J.W., Czech, B., and Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138, 738-749.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X., and Cao, X. (2013). NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 715-727.
- Wang, L., Zeng, J.H., Song, J., Feng, S.J., and Yang, Z.M. (2015). miRNA778 and SUVH6 are involved in phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 238, 273-285.
- Willmann, M.R., Mehalick, A.J., Packer, R.L., and Jenik, P.D. (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 155, 1871-1884.
- Wu, B.F., Li, W.F., Xu, H.Y., Qi, L.W., and Han, S.Y. (2015). Role of cin-miR2118 in drought stress responses in *Caragana intermedia* and Tobacco. *Gene* 574, 34-40.
- Wu, F., Yu, L., Cao, W., Mao, Y., Liu, Z., and He, Y. (2007). The N-terminal double-stranded RNA binding domains of *Arabidopsis* HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* 19, 914-925.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138, 750-759.
- Wu, H.J., Wang, Z.M., Wang, M., and Wang, X.J. (2013a). Widespread long noncoding RNAs as endogenous target mimics for microRNAs in plants. *Plant physiology* 161, 1875-1884.
- Wu, X., Shi, Y., Li, J., Xu, L., Fang, Y., Li, X., and Qi, Y. (2013b). A role for the RNA-binding protein MOS2 in microRNA maturation in *Arabidopsis*. *Cell Res* 23, 645-657.
- Xie, M., Zhang, S., and Yu, B. (2015). microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell Mol Life Sci* 72, 87-99.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S.A., and Carrington, J.C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant physiology* 138, 2145-2154.
- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., and Zhu, J.K. (2001). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 1, 771-781.

- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., and Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282, 16369-16378.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y., and Shikanai, T. (2009). SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 347-361.
- Yan, J., Gu, Y., Jia, X., Kang, W., Pan, S., Tang, X., Chen, X., and Tang, G. (2012a). Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 415-427.
- Yan, K., Liu, P., Wu, C.A., Yang, G.D., Xu, R., Guo, Q.H., Huang, J.G., and Zheng, C.C. (2012b). Stress-induced alternative splicing provides a mechanism for the regulation of microRNA processing in Arabidopsis thaliana. *Mol Cell* 48, 521-531.
- Yang, L., Wu, G., and Poethig, R.S. (2012). Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 315-320.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T.T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., and Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell* 22, 2156-2170.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., and Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, 932-935.
- Yu, Y., Ji, L., Le, B.H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., Gao, L., Liu, C., Cao, X., Mo, B., *et al.* (2017a). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in Arabidopsis. *PLoS Biol* 15, e2001272.
- Yu, Y., Jia, T., and Chen, X. (2017b). The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytol* 216, 1002-1017.
- Zabalza, A., van Dongen, J.T., Froehlich, A., Oliver, S.N., Faix, B., Gupta, K.J., Schmalzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M., *et al.* (2009). Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant physiology* 149, 1087-1098.
- Zhai, J., Zhao, Y., Simon, S.A., Huang, S., Petsch, K., Arikait, S., Pillay, M., Ji, L., Xie, M., Cao, X., *et al.* (2013). Plant microRNAs display differential 3' truncation and tailing modifications that are ARGONAUTE1 dependent and conserved across species. *Plant Cell* 25, 2417-2428.
- Zhang, J.Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W., and Wang, Z.Y. (2005). Overexpression of WXP1, a putative Medicago truncatula AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J* 42, 689-707.
- Zhang, Y., Xia, R., Kuang, H., and Meyers, B.C. (2016). The Diversification of Plant NBS-LRR Defense Genes Directs the Evolution of MicroRNAs That Target Them. *Mol Biol Evol* 33, 2692-2705.

- Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T.T., Meyers, B.C., Mo, B., and Chen, X. (2012). The Arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Curr Biol* 22, 689-694.
- Zhu, C., Ding, Y., and Liu, H. (2011a). MiR398 and plant stress responses. *Physiologia plantarum* 143, 1-9.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.H., Liou, L.W., Barefoot, A., Dickman, M., and Zhang, X. (2011b). Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* 145, 242-256.
- Zhu, Q.H., and Helliwell, C.A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* 62, 487-495.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

ORIGINAL ARTICLE

A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit

Carlos De la Rosa | Alejandra Alicia Covarrubias | José Luis Reyes 

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Correspondence

J. L. Reyes, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.

Email: jlreyes@ibt.unam.mx

Funding information

CONACyT, Grant/Award Number: 151571; DGAPA-PAPIIT, Grant/Award Numbers: IN-205015 and IN-202918

Abstract

Plant microRNAs are commonly encoded in transcripts containing a single microRNA precursor. Processing by DICER-LIKE 1 and associated factors results in the production of a small RNA, followed by its incorporation into an AGO-containing protein complex to guide silencing of an mRNA possessing a complementary target sequence. Certain microRNA loci contain more than one precursor stem-loop structure, thus encoding more than one microRNA in the same transcript. Here, we describe a unique case where the evolutionary conserved miR398a is encoded in the same transcript as the legume-specific miR2119. The dicistronic arrangement found in common bean was also observed in other legumes. In *Phaseolus vulgaris*, mature miR398 and miR2119 are repressed in response to water deficit, and we demonstrate that both are functional as they target the mRNAs for CSD1 and ADH1, respectively. Our results indicate that the repression of miR398 and miR2119 leads to coordinated up-regulation of CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit in common bean and possibly in other legumes. Furthermore, we show that miRNA directed CSD1 and ADH1 mRNAs up-regulation also occurs when common bean plants are exposed to flooding, suggesting that plant redox status and fermentation metabolism must be closely coordinated under different adverse conditions.

KEYWORDS

alcohol dehydrogenase, common bean, *Phaseolus vulgaris*, plant miRNAs, superoxide dismutase, water deficit

1 | INTRODUCTION

To regulate different aspects of development, hormone signalling, and stress responses, plants employ a variety of small RNA silencing pathways, which include short interfering (si)RNAs, trans-acting (ta)-siRNAs and microRNAs (miRNAs). Among these, miRNAs are 20–24 nt RNA molecules that have been widely implicated in responses to abiotic stress, in particular to water deficit (Covarrubias & Reyes, 2010; Li, Castillo-Gonzalez, Yu, & Zhang, 2017).

Plant microRNA biogenesis starts with RNA polymerase II transcription of a noncoding RNA that assumes an imperfect hairpin structure. This so-called pri-miRNA is recognized and processed by a

number of protein factors, including DAWDLE, HYPONASTIC LEAVES 1, SERRATE, and importantly DICER-LIKE 1 to generate a precursor microRNA (pre-miRNA), and subsequently releases a short double-stranded duplex of miRNA:miRNA* (Chen, 2010). Once in the cytoplasm, the mature miRNA, devoid of the miRNA* strand, is incorporated into an effector RNA-induced silencing complex through its association to ARGONAUTE 1 where it guides the base pairing to a complementary target transcript, which is repressed by cleavage and/or translational inhibition (Borges & Martienssen, 2015). Typically in plants, each transcript encodes a single hairpin encoding a mature microRNA, although in certain cases, the miRNA* sequence has been proposed to be functional in plants and animals (Devers, Branscheid,

May, & Krajinski, 2011; Okamura et al., 2008). Recent evidence suggests that variations in DCL1 cleavage of the pre-miRNA may generate variants with a slightly different sequence but functionally distinct from the original mature miRNA (Jeong et al., 2011).

Although several microRNA maturation steps are similar between plant and animal systems, there are a few significant differences. As an example, animals require two RNase III-type enzymes, Drosha and Dicer, whereas in plants, DCL1 catalyzes both pri-miRNA and pre-miRNA processing (Axtell, Westholm, & Lai, 2011). In addition, plant miRNAs are uniquely methylated at their 3'-ends by the methyl transferase HUA-ENHANCER 1 (HEN1; Yu et al., 2005). Down-regulation of mRNAs is mostly accomplished by almost perfect base pairing of miRNAs to target mRNAs followed by endonucleolytic cleavage, whereas animal miRNAs predominantly inhibit mRNA translation through imperfect base pairing, mostly relying on limited base pairing through a core of 7–8 nucleotides at the 5'-end known as "seed" sequence (Axtell et al., 2011). Finally, another difference between animal and plant miRNAs is found in miRNA gene organization. Examples abound in animals, where miRNAs are found in clusters often cotranscribed as polycistronic precursors, encoding mature miRNAs that can belong or not to the same miRNA family (related sequences). In direct contrast, plant miRNAs are almost always found as independent single precursors. However, occasionally, plant precursors are found in clusters, thus likely to be cotranscribed. *MIR395* family is a notorious example in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*, where this family is found in clusters containing as many as three and eight contiguous precursors, respectively (Merchan, Boualem, Crespi, & Frugier, 2009). Furthermore, genome-scale analysis comparing genomes of *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *O. sativa* indicates that certain miRNA clusters are conserved. In particular, the *MIR166*, *MIR169*, and *MIR395* gene families encode several members, some of them found in clusters in different plant species (Merchan et al., 2009). In rice, mature miR2118 is encoded by five different loci, each including two or three precursors (Baldrich, Hsing, & San Segundo, 2016). Moreover, less-conserved *MIR* genes are sometimes present in pairs, or as dicistronic units; however, they contain two miRNAs unrelated by sequence, coexpressed in the same transcript, as described for *Arabidopsis* (Merchan et al., 2009) and rice (Baldrich et al., 2016). For a limited number of cases, these nonhomologous miRNAs were predicted to target different mRNAs in *Arabidopsis*, although the encoded targets are functionally related proteins, suggesting that cotranscription of different miRNAs serves to regulate similar transcripts involved in a common biological pathway (Merchan et al., 2009). An analogous situation occurs in the case of *Arabidopsis* miR842 and miR846, which are encoded by the same gene and both target jacalin transcripts. However, alternative splicing leads to the exclusive production of one or the other pre-miRNA and corresponding mature miRNA (Jia & Rock, 2013).

In our previous studies, we characterized novel microRNAs from the legume *Phaseolus vulgaris* (common bean) induced in response to water-deficit conditions (Arenas-Huertero et al., 2009; Contreras-Cubas et al., 2012; Sosa-Valencia, Palomar, Covarrubias, & Reyes, 2017). Among these, we identified miR2119 and described its accumulation pattern in response to abiotic stress. In addition to our initial identification of miR2119 in *Glycine max* and *Medicago*

truncatula, high throughput sequencing led to an independent report of miR2119 in *M. truncatula* (Jagadeeswaran et al., 2009; Lelandais-Briere et al., 2009).

In this work, we show that miR2119 accumulation decreases in roots and leaves of common bean adult plants in response to water deficit. Surprisingly, we found that miR2119 is encoded in the same transcript as miR398a, a conserved microRNA present in spermatophytes (seed plants) and known to target *COPPER-ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1* (*CSD1*) mRNA (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar, Kapoor, & Zhu, 2006; Zhu, Ding, & Liu, 2011). Noteworthy, this dicistronic transcript encodes a conserved miRNA together with a miRNA that has only been detected in legumes, highlighting the uniqueness of this association. Bioinformatic analysis previously suggested *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (*ADH1*) mRNA as a potential target for miR2119, which we confirmed in this report using a 5'RACE approach. We report here that both microRNAs are cotranscribed and functional and that their levels are modulated under stress conditions. The accumulation of target mRNAs encoding *ADH1* and *CSD1* increased upon water-deficit treatments, consistent with the reduction in the accumulation of miR2119 and miR398. Previous studies have shown that miR398 decreases allowing increased accumulation of *CSD1* contributing to the response to different stress conditions including oxidative stress, copper toxicity, high-intensity light, ozone, and salt stress (Jagadeeswaran, Saini, & Sunkar, 2009; Sunkar et al., 2006). Although *ADH1* has not been described as a target of miRNA regulation, *ADH1* is widely recognized as a gene responsive to multiple stimuli, including low temperature, ABA, hypoxia, flooding, salt, and dehydration, among others (Christie, Hahn, & Walbot, 1991; de Bruxelles, Peacock, Dennis, & Dolferus, 1996; Komatsu et al., 2011; Zabalza et al., 2009). We propose that miRNA-mediated modulation of *ADH1* and *CSD1* mRNAs is necessary to achieve proper levels of the encoded proteins during water-deficit conditions in common bean, which in turn would be necessary to coordinate reactive oxygen species (ROS) levels and fermentation metabolism. We suggest that this metabolic regulation is required for an efficient plant adjustment to stress conditions in common bean and likely in other legumes as well.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Plant materials and growth treatments

Seeds of *P. vulgaris* L. cultivar Negro Jamapa were used in this study. Briefly, seeds were surface sterilized using a 20% Clorox/0.1% Tween-20 solution, rinsed several times with sterile water, and germinated on moist towels at 28 °C for 3 days in the dark. Subsequently, seedlings of similar size were transferred to pots with a mixture of vermiculite and maintained well irrigated with watering solution (5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM Fe(EDTA), 0.07 mM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.2 μM Na₂MoO₄, 10 μM NaCl, and 0.01 μM CoCl₂) under greenhouse conditions (approximately 25 °C) for 4 weeks. At this point, plants were subjected to a gradual water loss treatment by limiting irrigation as follows. Pot weight was measured every 2 days, and the amount of water lost due to evaporation determined.

Reference plant pots (control) were then irrigated with the amount of water necessary to restore the initial plant pot weight (at Day 0). Water limitation was imposed by restoring only 1/12 of the amount of water lost in a given time period (2 days between measurements), such that the water volume restored decreased as time passed. Samples of fully developed leaves and roots were collected at 0, 10, 18, and 20 days after the start of the treatment, along with samples taken from well-irrigated plants. Tissue was flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until processed. Alternatively, for relative water content (RWC) measurements, three individual leaflets for each time point were collected and fresh weight was determined. Subsequently, leaflets were allowed to reach maximum turgor by floating over water overnight to determine turgid weight. Finally, leaflets were dried out in an oven at 80°C for 3 days to estimate dry weight. RWC was calculated as follows: $\text{RWC} = [(\text{fresh weight} - \text{dry weight})/(\text{turgid weight} - \text{dry weight})] \times 100$.

2.2 | RNA and northern blot analysis

Total tissue was ground to a fine powder in liquid nitrogen and used for RNA extraction using the Trizol reagent (Invitrogen, Piscataway, NJ, USA) according to manufacturer's directions, except that the final rinse was performed with 100% ethanol and RNA was resuspended in a 50% formamide solution. Samples containing 10 μg of total RNA were separated in a 7M urea/1X TBE/15% polyacrylamide gel, transferred to a Hybond N+ membrane (GE), and subjected to northern blot hybridization using the ULTRA-hyb oligo solution (Ambion, Austin, TX, USA), and oligonucleotide probes labeled at the 5'-end using P^{32} -ATP (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) and T4 polynucleotide kinase (Fermentas, Hanover, MD, USA). Blots were visualized using a Typhoon phosphorimager (GE) and quantified using the ImageQuant software tools (GE). Results shown were obtained from two independent experiments where RNA from three individuals was pooled for each time point analysed.

2.3 | Plasmids and cloning

All plasmids used in this work were constructed using Gateway technology (Invitrogen). PCR products included a CACC sequence at the 5'-end to be inserted into pENTR-SD/D as directed by the manufacturer. The complete miR398-miR2119 precursor was obtained from genomic DNA or cDNA derived from total leaf RNA using oligonucleotides CACCpre398-2119 and pre2119rev (Chromosome 2 pos. 8673937-4337, Phytozome *P. vulgaris* genome version 2.1) to obtain pENTR-Pvu-pre-miR398-miR2119. The oligonucleotides used for subcloning of individual pre-miRNAs were CACCpre398-2119fwd and pre-miR398a-rev for premiR398a and CACCpre-miR2119 and pre2119rev for pre-miR2119 to obtain pENTR-pre-miR398a and pENTR-pre-miR2119. pENTR constructs were used for LR clonase reactions to recombine into the Gateway system (Invitrogen) pBA-DC vector, to obtain pBA-pre-miRNA constructs, where the pre-miRNAs are expressed from the 35S promoter and fused to the nopaline synthase terminator (Zhang, Garretton, & Chua, 2005). For a complete list of oligonucleotides used in this work, refer to Table S1.

2.4 | RT-qPCR

Total RNA samples were first DNase I treated (Fermentas) and subsequently used for either microRNA or mRNA detection by RT-qPCR. cDNA production for microRNA detection was obtained through the use of Ncode cDNA synthesis kit (Invitrogen), which employs a small RNA polyadenylation step. For mRNA detection, cDNA was first obtained with Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT for priming cDNA preparation. For normalization of accumulation levels for small RNAs, we utilized U6 snRNA amplification, whereas for mRNAs, we used the amplification of Act11 mRNA (Borges, Tsai, & Caldas, 2012). All oligonucleotides used for qPCR were first tested for specificity and optimal amplification conditions. Quantitative PCR was performed using the Maxima SYBR-Green qPCR Master mix kit (Fermentas) in a Step One thermocycler (Applied Biosystems). Results shown were obtained from two independent experiments where RNA from three individuals was pooled for each time point analysed.

2.5 | 5'RACE experiments

Total RNA from adult leaves and roots was isolated from plants under water-deficit conditions and subjected to ligation to an RNA oligonucleotide followed by reverse transcription and nested PCR to obtain a fragment of the target mRNA according to instructions in the RLM-RACE kit (Ambion), except that the acid phosphatase and TAP steps were omitted to selectively enrich for RNA fragments containing a phosphate group at their 5'-ends. Oligonucleotides designed for amplification of *ADH1.1* (Phvul.009G134700), *ADH1.2* (Phvul.001G064000), and *CSD1* (Phvul.006G097000) mRNAs were used for nested PCR and are described in Table S1. Amplified products were cloned into the pCR2.1 plasmid using TOPO-TA cloning as directed by the manufacturer (Invitrogen), and independent clones were verified by automated DNA sequencing (IBT, UNAM, Cuernavaca, Mor. Mexico). For a complete list of oligonucleotides used in this work, refer to Table S1.

2.6 | Common bean hairy roots transformation

The pBA-Pvu-pre-miR398-miR2119 plasmid or the corresponding pBA-DC-TdT plasmid were introduced into *Agrobacterium rhizogenes* K599 strain and used for plant transformation as described before (Estrada-Navarrete et al., 2007), with minor modifications. Plants were maintained for hairy root formation for 2 weeks, and TdT fluorescence-positive roots were harvested and kept at -70°C until further use.

2.7 | Bioinformatical analyses

Sequences for *ADH1* (Phvul.009G134700), *ADH1.2* (Phvul.001G064000), and *CSD1* (Phvul.006G097000), as well as the sequence corresponding to *MIR398a-MIR2119* precursor (chromosome 2 pos. 9731038-9732110, Phytozome: *P. vulgaris* genome ver. 2.1), were obtained from the genomic sequence available in Phytozome website (phytozome.jgi.doe.gov) corresponding to *P. vulgaris* G19833 cultivar (Race Peru).

microRNA target prediction was obtained from the WMD3 web server (WMD3, Ossowski Stephan, Fitz Joffrey, Schawb Rebecca, Riester Markus, and Weigel Detlef, personal communication). RNA secondary structure was predicted using the mFold software (Zuker, 2003) available at <http://mfold.rna.albany.edu>.

2.8 | Western blot assays

We used antibodies from Agrisera: anti-ADH1 (AS10 685) and CSD1 (AS06 170) rabbit antibodies. Total protein extracts (40 μ g per lane), prepared as described previously (Jonak, Nakagami, & Hirt, 2004), were resolved in a 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Protran, Amersham). Protein transfer to the membrane was verified by Ponceau red staining. We followed standard western blot assay protocols. Membranes were incubated with primary antibodies, both in a 1:2000 dilution in nonfat milk/TBS-T. Mouse anti-IgG coupled to HR peroxidase was used as the secondary antibody. Membranes were developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Scientific).

3 | RESULTS

3.1 | miR2119 is repressed by water deficit in adult common bean plants

We had previously identified miR2119 as a novel miRNA in *P. vulgaris* seedlings responsive to different stress conditions (Arenas-Huertero et al., 2009). To continue its characterization, we have extended the expression analysis by including common bean adult plants subjected

to water-deficit conditions. Four-week-old plants were subjected to water-deficit treatment by withholding water irrigation (Figure 1a), which showed a corresponding reduction of relative water content in leaves (Figure 1b). Samples from fully expanded leaves and roots were collected separately at 0, 10, 18, and 20 days of treatment and used for RNA isolation and northern blot detection of miR2119. Results showed that miR2119 accumulation levels in leaves progressively decreased upon stress treatment during the first 18 days; however, after this time, a slight increase was detected (Figure 1c). In roots, miR2119 accumulation levels showed a patent decrease throughout the stress treatment (Figure 1d).

To extend our knowledge on the distribution of miR2119 in plants, we explored its presence in other legumes, using the sequence of mature miR2119 as query in BLAST searches of NCBI databases for expressed sequences (including mRNAs and expressed sequence tags [ESTs] from plants). We found sequences containing the mature miR2119 in other legumes that we subjected to *in silico* RNA folding to predict miRNA precursors. These sequences included the reported miR2119 in *M. truncatula* and *G. max* (miRBase, ver 21.0; Arenas-Huertero et al., 2009). In contrast, we could not find evidence of related sequences in species outside the Fabaceae family, suggesting that miR2119 is a legume-specific miRNA. Consistently, we previously showed northern blot detection of miR2119 in different legumes, including *P. vulgaris*, *G. max*, *Lotus japonicus*, *M. truncatula*, *Pisum sativum*, *Arachis hypogaea*, and *Acacia cochliacantha*, but absent in *A. thaliana* and *O. sativa* (Arenas-Huertero et al., 2009). We identified additional miR2119 sequences in other legumes (*Phaseolus acutifolius*, *Vigna angularis*, *Vigna radiata*, *Cajanus cajan*, *A. hypogaea*, *Cicer arietinum*, *L. japonicus*, and *Trifolium pratense*), which allowed us to

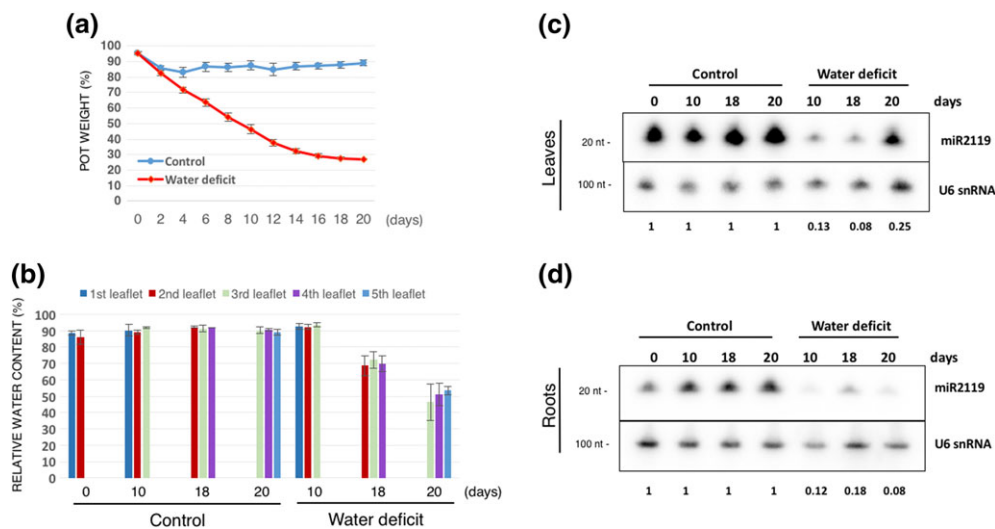


FIGURE 1 miR2119 is repressed by water deficit in *Phaseolus vulgaris*. Plant status during water-deficit treatments. (a) Water contents of pots during the time-course experiment. The weight of pots in percent with respect to the initial weight (100%) is shown for well-watered plants (blue line) and water-deficit-treated plants (red line). Error bars represent the standard deviation for 3 to 10 independent pots for each time point. (b) Relative water contents in different trifolium leaflets. The central leaflet of each trifolium was collected for each time point and used to determine relative water content as described in Section 2. Young plants contained first and second trifoliates, whereas older plants contained only third to fifth trifoliates. Colors indicate leaflets collected from different age trifoliates depending on the age of the plants. Error bars represent the standard deviation for three independent leaflets for each time point. Total RNA samples (10 μ g) obtained from (c) leaves or (d) roots of water-deficit-treated plants for 0, 10, 18, or 20 days or from well-irrigated plants were used to determine miR2119 abundance by northern blot analysis. U6 snRNA was used as loading control. The accumulation levels of miR2119 were determined by phosphorimager analysis. Normalized values relative to control samples, which were arbitrarily set as 1.0, are indicated at the bottom of each panel. Here, we show a representative result obtained from two independent experiments

MIR398 is independently transcribed (Phvul.008G202400), hereafter designated as *pvu-MIR398a* and *pvu-MIR398b*, respectively.

These findings led us to experimentally confirm the presence of the common bean dicistronic precursor for miR398a-miR2119. To this end, we obtained cDNA samples from different sources, including roots and leaves from water-deficit-treated and control plants. Consistent with the reduced abundance of the mature miR2119 in water-deficit samples described above (Figure 1), we found that the precursor transcript accumulation levels also decrease upon water-deficit treatment in leaves and roots (Figure 3a,b). This analysis revealed the presence of two transcripts of different sizes. The cloning and sequence of these two PCR products showed that the larger transcript corresponded exactly to the genomic sequence including both miR398a and miR2119, whereas the smaller segment lacks 76 nt present in the sequence region between both precursors (Figure 3c). This analysis also indicated that the missing fragment corresponds to an intron, as it includes the splicing site consensus sequences required for mRNA processing (Figure S2). In silico folding predictions of these two different fragments suggested that the presence or absence of the putative intron does not affect the secondary structure for miR398a or miR2119 precursors (Figure 3c).

We asked whether the presence of two such possible precursors has an effect on the processing of the individual precursors. To address this question, we used *Agrobacterium*-mediated infiltration in *Nicotiana benthamiana* leaves, to introduce constructs containing the genomic sequence, the processed intron version of the dicistronic miRNA precursor, or the individual miR398a or miR2119 precursors. We observed similar accumulation of mature miRNAs in the constructs carrying the dicistronic miR398a-miR2119 precursors (Figure S3), indicating that miR398a and miR2119 coexpression and intron removal do not affect individual processing, and suggesting that this gene organization allows coordinated miRNA production.

3.3 | miR398a and miR398b are repressed by water deficit in adult common bean plants

Given that two distinct *MIR398* loci are present in the genome of legumes, it was important to distinguish the expression patterns for both miR398 isoforms to confirm coexpression of miR398 and miR2119 and to determine their individual contribution. Northern blot analysis is not sensitive enough to distinguish the miR398 isoforms present in common bean because they are different in only two

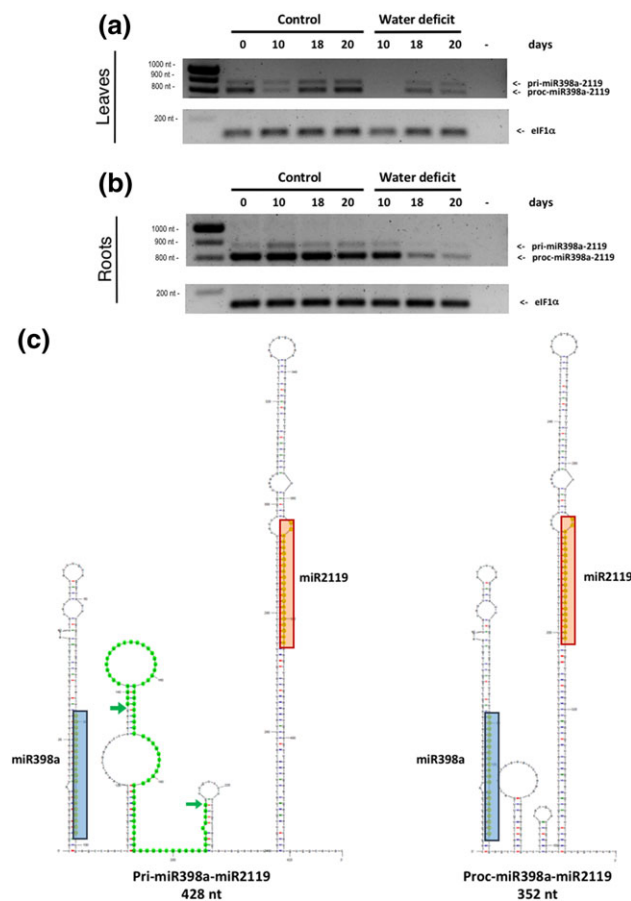


FIGURE 3 Expression and processing of the *pvu*-pre-miR398a-miR2119 transcript. RT-PCR analysis was performed to detect the presence of transcripts containing both pre-miR398 and pre-miR2119 in *Phaseolus vulgaris* total RNA obtained from (a) leaves and (b) roots from a water-deficit time course experiment. cDNA amplification of eIF1 α is shown as reference for RNA loading. The “-” lanes indicate absence of cDNA in the PCR reaction. The position of the two products described as pri-miR398a-2119 (primary) and proc-miR398a-2119 (processed) is indicated by arrows. (c) The two PCR amplification products found in the water-deficit-treated leaf RNA samples were cloned and sequenced. The most stable secondary structure predicted using Mfold software is shown for both cases. The difference in size is due to a sequence located in the region between the two precursors in the longer sequence (428 nt), absent in the shorter fragment (352 nt), and indicated in green and by two arrows in the longer structure

nucleotide positions in the 3' half of its mature sequence (see Figure 2 c). Thus, we employed RT-qPCR with oligonucleotides and amplification conditions that allowed for discrimination of both isoforms. In addition, RT-qPCR detection of miR2119 was also included to follow the expression of the dicistronic transcript under water-deficit conditions in leaves and roots of adult common bean plants, as previously described (Figure 1). Thus, in response to water deficit at 10, 18, and 20 days of treatment, miR2119, miR398a, and miR398b (encoded in a separate locus) showed a marked decrease in their accumulation levels in leaves and roots when compared with those in nonstress conditions (Figure 4). The reduction in miR2119 levels detected by RT-qPCR is consistent with the results obtained from northern blot assays for the same organs (see Figure 1).

3.4 | miR2119 regulates ADH1 mRNA and miR398 regulates CSD1 mRNA

Because of our interest in knowing the impact that the regulation of miR398a and miR2119 might have on the plant responses to water deficit, we performed a series of bioinformatical analyses to predict target transcripts. Previously, we reported as the best candidate target for miR2119 the mRNA encoding *ALCOHOL DEHYDROGENASE 1* (ADH1; Arenas-Huerta et al., 2009). To complement this prediction, we searched for potential targets in other legumes using the miR2119 sequence corresponding to each plant species and the Web MicroRNA Designer 3 application (WMD3, see Section 2). Interestingly, the outcome of this analysis indicated that ADH1 transcript also appears as the best candidate in the different legumes examined, despite the few base substitutions present in their miR2119 mature sequence when compared with that of *P. vulgaris* (Figure 5a). A close

inspection of the base pairing between miR2119 and ADH1 mRNA sequences from the different legumes showed that additional base changes in miR2119 are accompanied by compensatory substitutions in ADH1 mRNA, thus maintaining the recognition by the microRNA in at least eight species, including *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *G. max*, *C. cajan*, *M. truncatula*, *A. hypogaea*, *C. arietinum*, and *L. japonicus* (Figure 5a).

The *P. vulgaris* genome contains four genes encoding ADH1, which we have named here as *ADH1.1* to *ADH1.4*. Analysis of *ADH1.1* and *ADH1.2* gene sequences predicted that miR2119 could pair to their transcripts. On the basis of these observations, we performed 5'RACE experiments for *P. vulgaris* *ADH1.1* (Phvul.009G134700) and *ADH1.2* (Phvul.001G064000) using as substrate total RNA obtained from leaves and roots subjected to water deficit. As shown in Figure 5b, 5'RACE results confirmed that miR2119 targets *ADH1.1* and *ADH1.2* mRNAs for cleavage.

A similar experiment was carried out for miR398, which has been shown to regulate *CSD1*, the Cu/Zn superoxide dismutase mRNA in different plant species, including Arabidopsis, rice, soybean, and *M. truncatula* (Zhu et al., 2011). Consistent with this information, 5'RACE experiments confirmed that *CSD1* (Phvul.006G097000) mRNA is targeted by miR398 in common bean (Figure 5c). We attempted to obtain 5'RACE evidence for miR398 targeting mRNAs for COX5b-1 or CCS1, a chaperone for superoxide dismutase, as determined for this microRNA in other species (Beauclair, Yu, & Bouche, 2010; Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004); however, we failed to detect any amplification products using RNA from water-deficit-treated plants (data not shown). These data demonstrate that miR2119 and miR398 are functional in common bean, targeting the *ADH1.1*, *ADH1.2*, and *CSD1* mRNAs, respectively.

To confirm the regulation of the *ADH1* and *CSD1* transcripts by miR2119 and miR398, respectively, we turned to the common bean transgenic hairy roots system, where the full-length precursor for miR398a-miR2119 was overexpressed under the control of the 35S CaMV promoter. As expected, miR2119 and miR398a showed increased accumulation, whereas the independently transcribed miR398b levels were not affected (Figure S4a). In agreement, we observed reduced accumulation of *ADH1.1*, *ADH1.2*, and *CSD1* transcripts in transgenic roots overexpressing the miRNA dicistronic precursor, when compared with transgenic roots carrying the empty vector (Figure S4b). These results indicate that miR2119 and miR398a are able to modulate the levels of their corresponding target mRNAs in vivo.

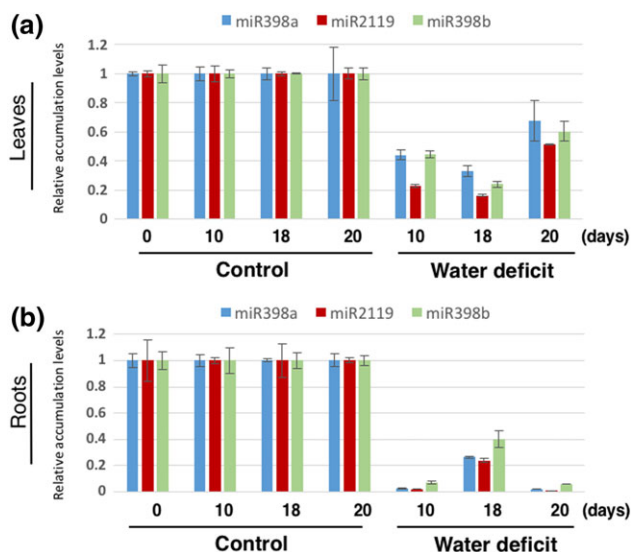


FIGURE 4 Expression of miR398a/b and miR2119 during water deficit. Total RNA samples obtained from water-deficit-treated or control (a) leaves or (b) roots after 0, 10, 18, or 20 days were used to determine mature microRNA abundance by RT-qPCR. Amplification of miR398a (blue), miR2119 (red), and miR398b (green) was normalized with U6 snRNA. We show a representative result obtained from two independent experiments. Error bars represent standard deviation of three technical replicates

3.5 | Accumulation of ADH1 and CSD1 mRNAs is up-regulated in response to water deficit in common bean

To determine the accumulation levels of *ADH1* and *CSD1* transcripts in response to water deficit, we performed RT-qPCR assays from time-course experiments, where plants were subjected to this stress treatment for 10, 18, and 20 days, as described in Section 2. The results obtained using RNA from roots and leaves showed that *ADH1.1* and *ADH1.2* transcript accumulation levels increased in response to water deficit. In roots, *ADH1.1* transcript abundance showed its highest

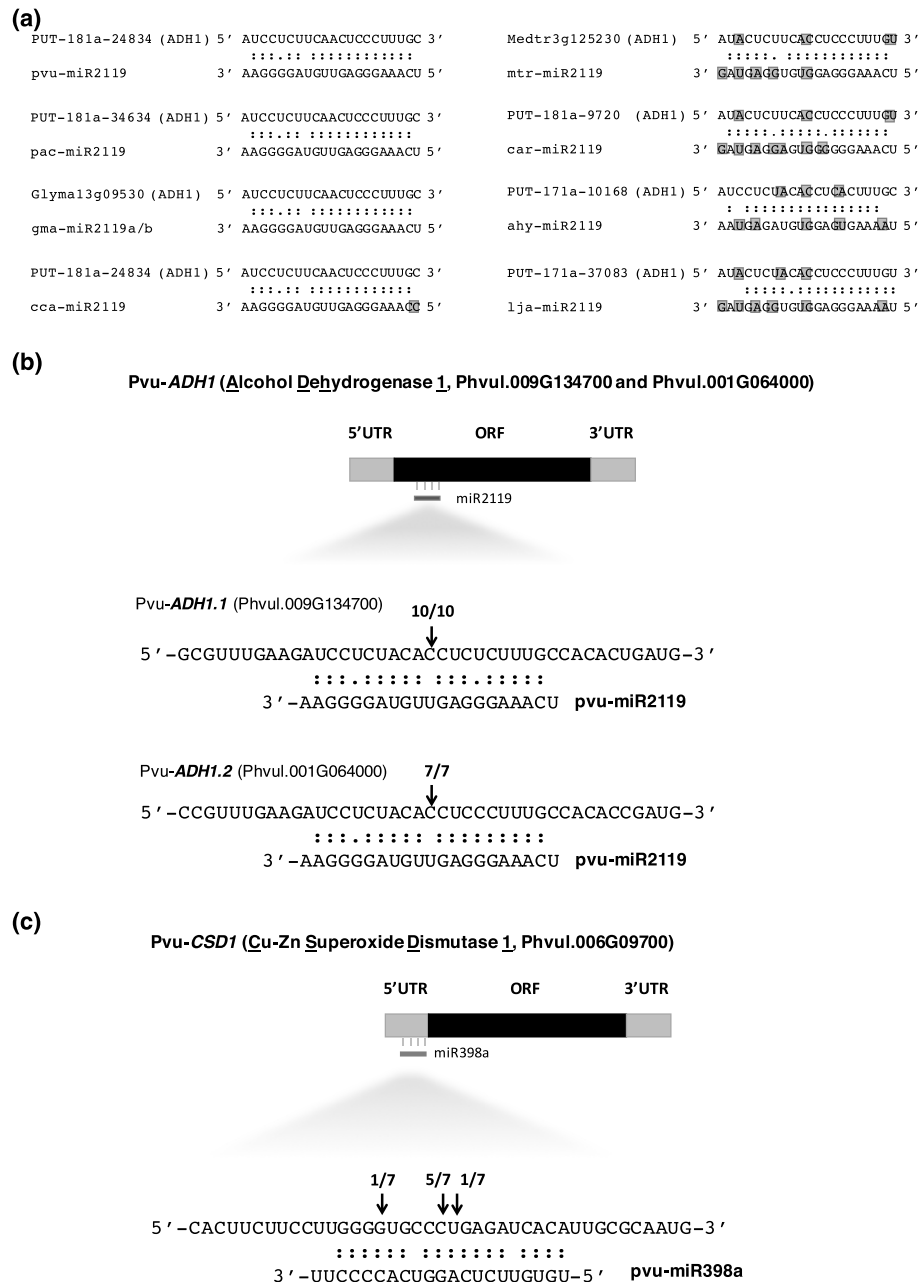


FIGURE 5 pvu-miR2119 targets the *ADH1* mRNA and pvu-miR398 targets *CSD1* mRNA. (a) In silico target prediction using the WMD3 server tool for miR2119 in pvu: *Phaseolus vulgaris*; pac: *Phaseolus acutifolius*; gma: *Glycine max*; cca: *Cajanus cajan*; mtr: *Medicago truncatula*; car: *Cicer arietinum*; ahy: *Arachis hypogaea*; and lja: *Lotus japonicus* revealed *ADH1* transcript as the best candidate in each legume species. Gene annotation corresponds to Plant GDB unique transcripts (www.plantgdb.org) used by WMD3 (wmd3.weigelworld.org) or Phytozome gene identifiers (phytozome.jgi.doe.gov) for *G. max* and *M. truncatula*. Shadowed positions indicate compensatory base substitutions in target and microRNA sequences with respect to those present in *P. vulgaris*. Total RNA obtained from leaf and root tissues of water-deficit-treated plants were used for 5'RACE experiments. The upper diagrams (b and c) indicate the structure of each transcript and the location of the miRNA recognition site, which is shown below. 5'-, 3'-UTR (untranslated region) and ORF (open reading frame) are indicated as well. Independent clones obtained from cloning of 5'RACE products for (b) *ADH1.1* and *ADH1.2* or (c) *CSD1* were sequenced, and the arrows indicate the number of clones where each RNA cleavage site was found. Base pairing between target mRNA and microRNA is indicated by a "." and wobble base pairing is indicated by "."

levels (120-fold) after 18 days of treatment, with a small reduction after 20 days (Figure 6a); whereas for *ADH1.2* transcript, a progressive increase occurred to reach its highest level after 20 days of the stress treatment (Figure 6b). Moreover, in leaves, the *ADH1.1* transcript showed a sevenfold increase after 10 days of treatment, which was slightly reduced to threefold at 20 days of treatment (Figure S5a).

We could not detect *ADH1.2* transcript in these samples, suggesting it is not expressed in leaves. In comparison, the *CSD1* transcript in roots showed a basal accumulation under control conditions that also increased upon water-deficit treatment, attaining 12-fold accumulation after 18 and 20 days of treatment (Figure 6c). In addition, the *CSD1* transcript levels also increased in leaf tissue (13-fold) after

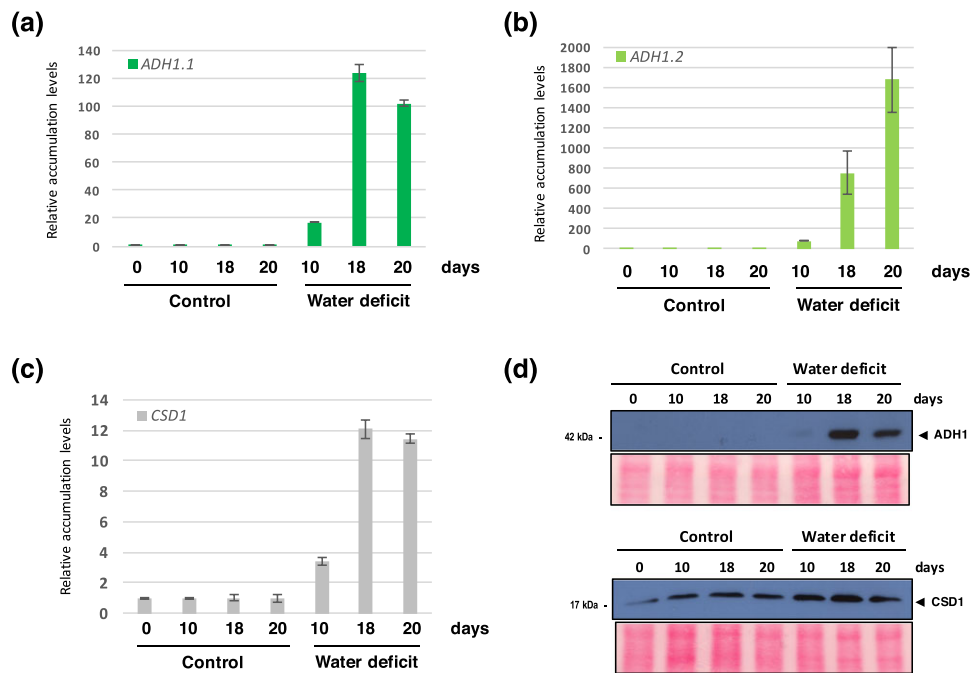


FIGURE 6 Levels of *ADH1* and *CSD1* mRNAs are up-regulated by water deficit. Total RNA samples from roots of water-deficit-treated plants (0, 10, 18, and 20 days) or control untreated plants were used for RT-qPCR experiments. The accumulation of (a) *ADH1.1* (Phvul.009G134700), (b) *ADH1.2* (Phvul.001G064000), and (c) *CSD1* (Phvul.006G097000) mRNAs was normalized using amplification of *Act11* mRNA and subsequently represented relative to control samples, which were arbitrarily set as 1.0, which was arbitrarily set as 1.0. We show a representative result obtained from two independent experiments. Error bars represent standard deviation of three technical replicates. (d) Western blot analysis was performed using total protein extracts from roots of water-deficit-treated plants (0, 10, 18, and 20 days) or control untreated plants. Detection of *ADH1* or *CSD1* proteins using their specific antibodies is shown together with the Ponceau red staining of a membrane section to show equal sample loading

18 days of treatment (Figure S5b). These observations were consistent with the reduction of miR2119 and miR398 and their precursors under the same treatment (Figures 1c,d and 3a,b). Accordingly, by western blot experiments using specific antibodies and root protein extracts from the same samples as those used for the experiments described above, we observed increased levels of *ADH1* and *CSD1* proteins at the same time points (Figure 6d).

3.6 | Coordinated miRNA regulation of *CSD1* and *ADH1* during flooding

In diverse plant species, *ADH1* gene expression responds to different environmental stress conditions, particularly, flooding (de Bruxelles et al., 1996; Komatsu et al., 2011). To determine if *ADH1* mRNA is under miRNA control when plants are exposed to different conditions to those imposed by water deficit, we subjected 2-week-old plants to flooding by submerging the root system for 24 and 48 hr. After the treatment, root tissue was collected and analysed to determine accumulation levels of miR398, miR2119, and their target transcripts. As we observed for water deficit, upon flooding treatment, miR398a, miR398b, and miR2119 accumulation decreased (Figure 7a,b), whereas the abundance of target *CSD1*, *ADH1.1*, and *ADH1.2* transcripts increased under this stress condition (Figure 7c–e). Correspondingly, the protein levels for *CSD1* and *ADH1* also increased under these conditions (Figure 7f). These data indicate that in common bean, flooding responses also require a coordinated action of *ADH1*

and *CSD1* enzymes, attained by a fine modulation of their transcript levels through the action of miR2119 and miR398.

4 | DISCUSSION

During the course of characterizing the *MIR2119* gene in *P. vulgaris*, we identified a second microRNA precursor encoding *MIR398a* in the same transcript. Interestingly, this dicistronic microRNA precursor includes a conserved microRNA, miR398a, and a nonconserved one, miR2119. Remarkably, we found through the analysis of existing ESTs, other expressed sequences and genomic data, that a similar structure is conserved in other legumes as well, including *G. max* and *M. truncatula*. In contrast, we could not find the presence of *MIR2119* or of this dicistronic arrangement outside this plant group. Previous studies have shown the existence of polycistronic precursors corresponding to conserved families, such as miR395 in different plant species (Guddeti et al., 2005; Merchan et al., 2009). In addition, the study carried out by Merchan et al. identified dicistronic precursors in *A. thaliana* where both microRNAs encoded are poorly conserved, and in all cases analysed the microRNAs found in a dicistronic transcript had predicted target mRNAs encoding proteins with related functions, suggesting that they are coordinately regulated (Merchan et al., 2009). The transcript encoding miR398 and miR2119 in *Phaseolus* is unique as it encodes a conserved and a nonconserved microRNA. This innovation in legumes did not come at the expense

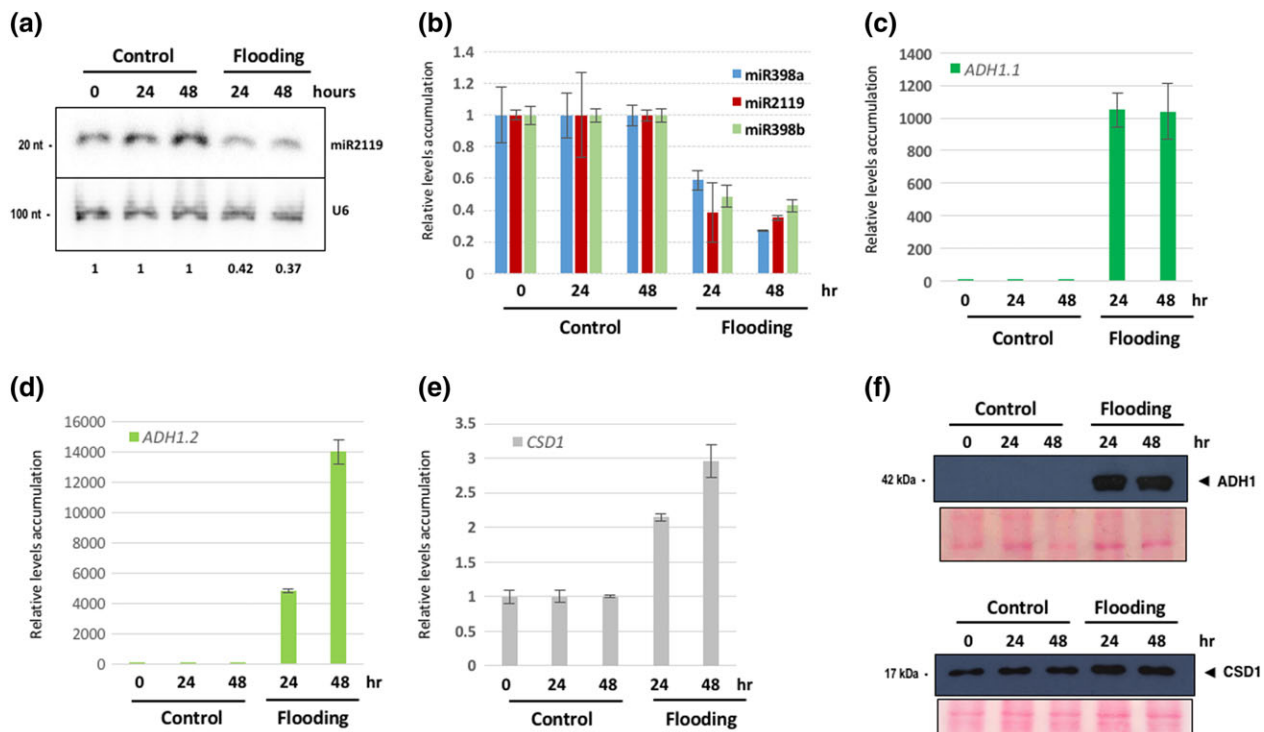


FIGURE 7 Levels of miR398, miR2119, and their target mRNAs are modulated by flooding. Total RNA samples from roots of flooding-treated plants (0, 24, 48 hr) or control untreated plants was used for (a) northern blot analysis to detect miR2119 or (b) RT-qPCR experiments to detect miR398a, miR2119, and miR398b. miRNA levels were normalized using U6 snRNA as reference. The same RNA samples were used to determine transcript levels for (c) *ADH1.1*, (d) *ADH1.2*, and (e) *CSD1*, using Act11 mRNA levels as reference. In each case, error bars represent standard deviation of three technical replicates. Western blot analysis was performed using total protein extracts from roots of flooding-treated plants (0, 24, 48 hr) or control untreated plants. Detection of ADH1 or CSD1 proteins is shown together with Ponceau red staining of a section of the membranes to show equal sample loading

of independent expression of *MIR398*. We found that two versions of *MIR398* genes exist in the legume genomes explored, including *P. vulgaris*, *G. max*, and *M. truncatula*: The *MIR398a* gene is linked to *MIR2119*, whereas *MIR398b* is not linked to another small RNA and is thus equivalent to other *MIR398* genes present in more distantly related species, such as *A. thaliana*.

MicroRNAs of recent emergence in evolution have been suggested to be non-functional, mainly because of the difficulty to demonstrate their regulatory activity on predicted target mRNAs. It is thus assumed that their recent origin has not allowed sufficient evolutionary time for selection of a target mRNA or that they are en route to extinction (Allen et al., 2004; Cuperus, Fahlgren, & Carrington, 2011). Significantly, we have determined that miR2119 is functional and regulates by cleavage the mRNA encoding the highly conserved ADH1 enzyme, as determined by 5'RACE assays. An alternative strategy to identify microRNA cleavage targets takes advantage of high throughput sequencing, known as degradome or PARE analysis (Addo-Quaye, Eshoo, Bartel, & Axtell, 2008; German et al., 2008). Two recent reports have applied degradome analysis to *M. truncatula* micorrhizal roots and *G. max* seed coats revealing that miR2119 targets *ADH1* mRNA in these legumes as well (Devers et al., 2011; Shamimuzzaman & Vodkin, 2012). Thus, we anticipate that miR2119 regulates *ADH1* transcript in other legumes, as suggested by their sequence conservation as we have shown in this work.

Why has cotranscription of *MIR398a* and *MIR2119* been conserved in legumes? One explanation could be that it represents an

advantageous strategy to coordinate microRNA functions in response to particular conditions, or that the correct processing of the recently evolved pre-miR2119 could be dependent on the maturation of the adjacent pre-miR398a, or vice versa, thus demanding their shared biogenesis. However, when we separated both precursors and expressed them independently in the *Nicotiana* heterologous system, we did not observe any adverse effect, reinforcing the possibility that coregulation is the main beneficial feature of a dicistronic *MIR398a-MIR2119* transcript.

In this work, we showed that the joint production of miR398a and miR2119 leads to the coordinated regulation of the targeted transcripts encoding CSD1 and ADH1, respectively, indicating that the abundance of these enzymes needs to be attuned for a plant adjustment response to stress conditions. CSD1 participates in the scavenging of ROS by dismutating the superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) that in turn is transformed into water and O_2 by catalase activity. It is well established that different forms of biotic and abiotic stresses perturb cellular homeostasis, inducing ROS accumulation, which can be detrimental for several subcellular components causing oxidation of lipids, proteins, or nucleic acids (Apel & Hirt, 2004). Although ROS scavenging is essential for maintaining cellular functions (Mittler, Vanderauwera, Gollery, & Van Breusegem, 2004), ROS can also function as signalling molecules as has been observed for several stress stimuli, including dehydration and salt stress (Choudhury, Rivero, Blumwald, & Mittler, 2017; Miller, Suzuki, Ciftci-Yilmaz, & Mittler, 2010). Thus, fine-tuning of ROS accumulation levels

to balance elimination and signalling should be achieved through the regulation of scavenging enzymes such as CSD1 activity to result in appropriate stress responses. Accordingly, miR398 has previously been shown to respond to different forms of stress in several plant species (Naya et al., 2014; Sunkar & Zhu, 2004; Zhu et al., 2011). Upon water-deficit treatment, we observed an increase in CSD1 mRNA and protein levels (Figure 6c,d). The accumulation of ROS species caused by stress conditions could result in signalling waves or, cause a disturbance in the levels of buffering molecules such as glutathione, ascorbate, NAD(P)⁺, or others, important modulators of the redox state of the cell (Miller et al., 2010). Our results are consistent with the idea that increased levels of CSD1, triggered by miR398 down-regulation, and other ROS-scavenging enzymes contribute to maintain an appropriate intracellular redox status in response to stress conditions.

As mentioned previously, ADH1 is induced under several adverse conditions, although its contribution to stress responses is less well defined (Christie et al., 1991; de Bruxelles et al., 1996; Komatsu et al., 2011; Zabalza et al., 2009). ADH1 participates in fermentation by catalyzing the conversion of acetaldehyde into ethanol to regenerate NAD⁺ and the production of ATP in the absence of aerobic respiration. This activity is essential under low-oxygen conditions, as those prevailing during flooding. However, it should be noted that fermentation occurs under normoxia as well, suggesting that ADH1 activity could also be important under stress conditions different from oxygen limitation (Zabalza et al., 2009). ADH1 up-regulation upon water-deficit treatments could be necessary to regenerate NAD⁺ levels required to maintain an optimal redox status. In addition, ADH1 could also be important to regulate pyruvate consumption by the TCA cycle and play a role in energy balance (Zabalza et al., 2009). In this way, ADH1 activity could be coordinated with CSD1 activity to modulate the levels of NAD⁺ and other redox molecules involved in maintaining an appropriate balance under stress conditions. Additionally, ethanol produced by ADH1 activity could serve as a signal to bolster plant responses to water deficit, as it has recently been suggested for *Arabidopsis*, where addition of external ethanol helped plants to better cope with saline stress conditions, by enhancing gene regulation responses and ROS scavenging activities (Nguyen et al., 2017).

In summary, during water-deficit conditions, down-regulation of miR398 to maintain higher levels of CSD1 is a process that removes harmful ROS under stress conditions, whereas up-regulation of ADH1 contributes to NAD⁺ regeneration and pyruvate metabolism. In this scenario, microRNA regulation would coordinate the outcome of these two processes, revealing that fermentation and ROS scavenging are connected at several levels of regulation, including microRNA action, metabolite production, and possibly ethanol signalling.

ACKNOWLEDGMENTS

C.D.R. was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We thank Carlos A. González-Chávez (head of Unit of Genetic Transformation and Plant Tissue Culture, Instituto de Biotecnología-UNAM) for technical support and facilities for the growth of plant materials. We also thank Rosa M. Solórzano for her excellent technical support during the development of this

work. This work was partially supported by grants from DGAPA-PAPIIT (IN-205015 and IN-202918) and CONACyT (151571) to J.L.R. The authors have no conflict of interest to declare.

ORCID

José Luis Reyes  <http://orcid.org/0000-0001-5129-9741>

REFERENCES

- Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., & Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. *Current Biology*, *18*, 758–762.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Sung, G. H., Spatafora, J. W., & Carrington, J. C. (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, *36*, 1282–1290.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373–399.
- Arenas-Huertero, C., Perez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., ... Reyes, J. L. (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology*, *70*, 385–401.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la difference: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, *12*, 221.
- Baldrich, P., Hsing, Y. I., & San Segundo, B. (2016). Genome-wide analysis of polycistronic microRNAs in cultivated and wild rice. *Genome Biology and Evolution*, *8*, 1104–1114.
- Beauchair, L., Yu, A., & Bouche, N. (2010). microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *62*, 454–462.
- Borges, A., Tsai, S. M., & Caldas, D. G. (2012). Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *31*, 827–838.
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*, 727–741.
- de Bruxelles, G. L., Peacock, W. J., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (1996). Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *111*, 381–391.
- Chen, X. (2010). Small RNAs—Secrets and surprises of the genome. *The Plant Journal*, *61*, 941–958.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, *90*, 856–867.
- Christie, P. J., Hahn, M., & Walbot, V. (1991). Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedlings. *Plant Physiology*, *95*, 699–706.
- Contreras-Cubas, C., Rabanal, F. A., Arenas-Huertero, C., Ortiz, M. A., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2012). The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Molecular Biology*, *80*, 103–115.
- Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell & Environment*, *33*, 481–489.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*, *23*, 431–442.
- Devers, E. A., Branscheid, A., May, P., & Krajinski, F. (2011). Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, *156*, 1990–2010.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., ... Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and

- reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2, 1819–1824.
- German, M. A., Pillay, M., Jeong, D. H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., ... Green, P. J. (2008). Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature Biotechnology*, 26, 941–946.
- Gudeti, S., Zhang, D. C., Li, A. L., Leseberg, C. H., Kang, H., Li, X. G., ... Mao, L. (2005). Molecular evolution of the rice miR395 gene family. *Cell Research*, 15, 631–638.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A., & Sunkar, R. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta*, 229, 1009–1014.
- Jagadeeswaran, G., Zheng, Y., Li, Y. F., Shukla, L. I., Matts, J., Hoyt, P., ... Sunkar, R. (2009). Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families. *The New Phytologist*, 184, 85–98.
- Jeong, D. H., Park, S., Zhai, J., Gurazada, S. G., De Paoli, E., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2011). Massive analysis of rice small RNAs: Mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *Plant Cell*, 23, 4185–4207.
- Jia, F., & Rock, C. D. (2013). MIR846 and MIR842 comprise a cisgenic MIRNA pair that is regulated by abscisic acid by alternative splicing in roots of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 81, 447–460.
- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology*, 136, 3276–3283.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, 787–799.
- Komatsu, S., Deschamps, T., Hiraga, S., Kato, M., Chiba, M., Hashiguchi, A., ... Yasue, H. (2011). Characterization of a novel flooding stress-responsive alcohol dehydrogenase expressed in soybean roots. *Plant Molecular Biology*, 77, 309–322.
- Lelandais-Briere, C., Naya, L., Sallet, E., Calenge, F., Frugier, F., Hartmann, C., ... Crespi, M. (2009). Genome-wide *Medicago truncatula* small RNA analysis revealed novel microRNAs and isoforms differentially regulated in roots and nodules. *Plant Cell*, 21, 2780–2796.
- Li, S., Castillo-Gonzalez, C., Yu, B., & Zhang, X. (2017). The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *The Plant Journal*, 90, 654–670.
- Lorkovic, Z. J., Wicczorek Kirk, D. A., Lambermon, M. H., & Filipowicz, W. (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci*, 5, 160–167.
- Merchan, F., Boualem, A., Crespi, M., & Frugier, F. (2009). Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins. *Genome Biology*, 10, R136.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33, 453–467.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490–498.
- Naya, L., Paul, S., Valdes-Lopez, O., Mendoza-Soto, A. B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., ... Hernandez, G. (2014). Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS One*, 9, e84416.
- Nguyen, H. M., Sako, K., Matsui, A., Suzuki, Y., Mostofa, M. G., Ha, C. V., ... Seki, M. (2017). Ethanol enhances high-salinity stress tolerance by detoxifying reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* and rice. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1001.
- Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T., & Lai, E. C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3'UTR evolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 354–363.
- Shamimuzzaman, M., & Vodkin, L. (2012). Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing. *BMC Genomics*, 13, 310.
- Sosa-Valencia, G., Palomar, M., Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2017). The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 68, 2013–2026.
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18, 2051–2065.
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16, 2001–2019.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., ... Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307, 932–935.
- Zabalza, A., van Dongen, J. T., Froehlich, A., Oliver, S. N., Faix, B., Gupta, K. J., ... Geigenberger, P. (2009). Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiology*, 149, 1087–1098.
- Zhang, X., Garretton, V., & Chua, N. H. (2005). The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes & Development*, 19, 1532–1543.
- Zhu, C., Ding, Y., & Liu, H. (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiologia Plantarum*, 143, 1–9.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31, 3406–3415.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: De la Rosa C, Covarrubias AA, Reyes JL. A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant Cell Environ*. 2019;42: 133–144. <https://doi.org/10.1111/pce.13209>



Chapter 9

Northern Blot Analysis of microRNAs and Other Small RNAs in Plants

Carlos De la Rosa and José Luis Reyes

Abstract

The study of regulatory small RNAs, such as siRNAs and microRNAs in plants, has necessitated methods tailored to their unique features. Their analysis demands the use of sensitive and quantitative methods for their detection. The use of Northern blot hybridization offers an attractive alternative to address qualitative as well as quantitative features. We highlight the advantages and shortcomings of this method and offer a detailed description of the techniques that best work in our hands, considering their use for the study of several small RNAs in multiple samples. We enumerate relevant details as well as cautionary comments in cases where we have detected potential difficulties.

Key words Plant sRNAs, Plant miRNAs, Northern blot

1 Introduction

The advent of high-throughput sequencing for small RNAs (sRNAs) has allowed for large-scale identification of microRNAs (miRNAs) and other small regulatory RNAs involved in multiple processes in different plant species [1, 2]. As a consequence of the enormous amount of data generated by these methods, an ensuing challenge is to define the contribution of individual RNA molecules to the process under study and the corresponding need to use an independent method to determine miRNA or other small RNA abundance. Different techniques have been successfully employed to that end, and particularly Northern blot hybridization has been used extensively and proven to be amenable to accurately determine the abundance of miRNAs and other small RNAs. Northern blot analysis can be used to conveniently determine miRNA abundance in multiple samples in the same experiment (*see* Fig. 1, lanes marked as A-C), with the flexibility to reutilize the same blotted membrane to study other RNAs, including constitutively expressed RNAs serving as loading controls (U6 snRNA in Fig. 1). In addition, when defining the identity of potential small RNAs, for instance,

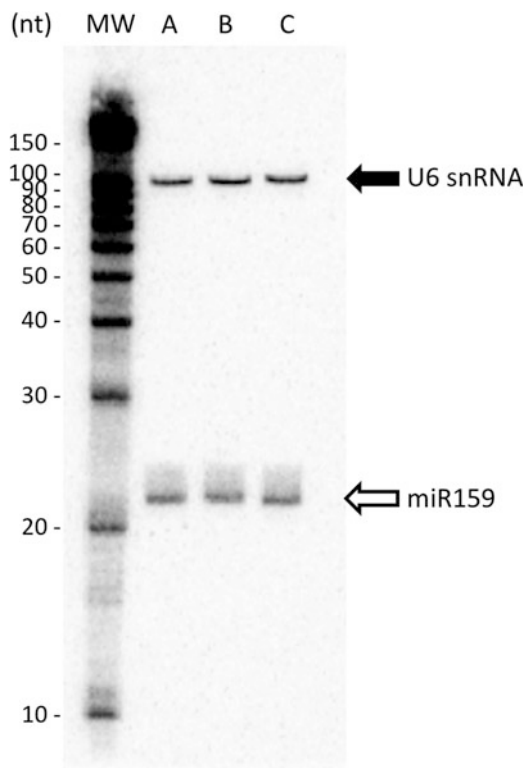


Fig. 1 Typical small RNA Northern blot. A Northern blot membrane showing hybridization to miR159 (white arrow) and U6 snRNA (black arrow) and the labeled ladder (Decade marker system, Ambion) showing band size in nucleotides. Gel electrophoresis included the RNA samples from three independent *Phaseolus vulgaris* leaf sources (marked as A–C) and the previously P^{32} -labeled RNA molecular weight marker (lane labeled as MW). After transferring the RNA samples to the membrane, it was first hybridized using an antisense probe to detect miR159a. The initial exposure revealed a single band in the blot corresponding to the microRNA signal, and then we performed a second hybridization without a stripping step (Subheading 3.5, step 5), to detect the loading control U6 snRNA. The blot shows the resulting image with detection of two independent RNAs and the molecular weight marker lane in a single image (DBM and JLR, unpublished results)

as the result of a deep-sequencing experiment, Northern blot analysis can identify the most abundant size isoform of the small RNA, as defined by its migration during gel electrophoresis. Moreover, other RNA species present in the same sample that could be related to the small RNA sequence in question can be detected. This is especially important when the small RNA of interest is derived from a larger RNA molecule and thus may represent a non-specific degradation product. Methodologies such as RT-qPCR or high-throughput sequencing to detect small RNAs may not be suitable to recognize this potential caveat.

The choice of Northern blot to detect small RNAs depends on multiple factors. First, the amount of RNA material needed can be demanding, in the range of 10–20 µg of total RNA per sample to be analyzed. Second, the use of Northern blot analysis, in general, will be useful to monitor the combined abundance of various members of a miRNA family present in a given sample. Alternative methods should be then employed to assess the contribution of individual gene *loci* to the accumulation of particular miRNAs. Third, for the analysis of very low abundance miRNAs or other small RNAs, RT-qPCR is better suited due to its higher sensitivity when compared to Northern blot.

Both approaches can be advantageous depending on the scope of the experiment; in this chapter, we will describe Northern blot hybridization, while RT-qPCR will be detailed elsewhere in this volume. Based on the particular aims of the researcher, a method of choice should be pursued. Here, we present our Northern blot hybridization method in detail for easy setup. We have chosen to describe the method in a temporal way, in a manner that best shows the different steps involved as they are performed. We also provide guidelines based on our experience as to what kind of alternatives may arise and ways to solve potential limitations.

2 Materials

2.1 Total RNA Preparation

1. Liquid nitrogen.
2. Mortar and pestle, previously autoclaved and kept at -20°C .
3. Low-retention microcentrifuge tubes (Eppendorf).
4. TRIzol reagent (Invitrogen).
5. Chloroform.
6. Ethanol 100%.
7. Isopropanol.
8. Sterile distilled water.
9. Formamide 50% solution in deionized water.

2.2 RNA Electrophoresis in Polyacrylamide Gels

1. Tris-borate buffer ($10\times$ TBE): Dissolve 108 g of Tris base, 55 g of boric acid, and 40 mL of 0.5 M EDTA, pH 8.0, in a final volume of 1 l of deionized water.
2. Acrylamide solution: 15 % acrylamide/bis-acrylamide (19:1), 8 M urea, and $1\times$ TBE.
3. RNA loading buffer: 95% of formamide; 25 mM of EDTA, pH 8.0; 0.1% of xylene cyanol; and 0.1% of bromophenol blue.
4. Working solutions of $0.5\times$ and $1\times$ TBE buffer.
5. Vertical electrophoresis apparatus for small gels.

6. Semi-dry electrotransfer apparatus (OWL Scientific).
7. Hybond-N+ membrane (GE).
8. 3MM chromatography paper (Whatman).
9. UV cross-linker (Stratagene or similar).

2.3 Membrane Hybridization

1. Hybridization bottles and incubator with temperature settings at 37–42 °C.
2. ULTRAhyb-Oligo solution (Ambion).
3. Saline sodium citrate buffer (20× SSC): Dissolve 175.3 g of NaCl and 88.2 g of Na₃C₆H₅O₇ in a final volume of 1 L with deionized water, and autoclave.
4. Wash solution: 2× SSC, 0.1% SDS.
5. Saran wrap.
6. PhosphorImager screen and scanner or, alternatively, autoradiography films.
7. Stripping solution: 0.1× SSC, 0.1% SDS. Necessary only if membrane will be reused for a second small RNA hybridization.

2.4 5-End Labeling and Purification of Oligonucleotide Probe

1. DNA oligonucleotide fully complementary to miRNA to study.
2. DNA oligonucleotide complementary to a region of an endogenous constitutive RNA. For example, U6 snRNA or 5S rRNA are typical loading controls (*see Note 1*).
3. γ -P³²-ATP (3000 Ci/mmol, PerkinElmer).
4. T4 polynucleotide kinase (Thermo).
5. 10× polynucleotide kinase buffer (provided with enzyme).
6. Sephadex G25 column (mini Quick-spin Oligo column, Roche).
7. STE buffer: 10 mM of Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM of EDTA, pH 8.0; and 100 mM of NaCl.

2.5 RNA Molecular Weight markers

1. Decade Markers System (Thermo Fisher).
2. γ -P³²-ATP (3000 Ci/mmol, PerkinElmer).

3 Methods

3.1 RNA Purification

1. Grind freshly collected tissue under liquid nitrogen to a fine powder using a mortar and pestle. Store powdered tissue at –70 °C if not proceeding immediately to RNA preparation.
2. Resuspend as much as 100 mg of ground tissue in 1 mL of TRIzol reagent by vortexing, using low-retention microcentrifuge tubes. Allow 5 min for full disruption of protein/RNA

complexes. Centrifuge at $12,000 \times g$ for 5 min to pellet fibrous material and debris. Transfer supernatant to a new microcentrifuge tube.

3. Add 200 μL of chloroform and vigorously shake by hand for 30 s. Separate phases by centrifugation, 10 min at $12,000 \times g$.
4. Recover the aqueous phase in a new microcentrifuge tube, and add 600 μL of isopropanol. Allow for RNA precipitation to proceed for 10 min at room temperature.
5. Centrifuge 15 min at $12,000 \times g$, remove supernatant with an automatic pipette, and wash pellet (often invisible) with 200 μL of 100% ethanol.
6. After centrifugation for 3 min at $12,000 \times g$, remove supernatant, and repeat centrifugation. The remaining few drops of ethanol can be removed with a 2 or 10 μL micropipette. The RNA pellet is resuspended in 30–50 μL of 50% formamide solution (*see Note 2*). If necessary, the solution can be warmed up to 65 °C for 5 min to help resuspension and immediately returned to ice. Determine RNA concentration using a Nanodrop, and check integrity by RNA electrophoresis in agarose gels or with a Bioanalyzer (Applied Biosystems). Store RNA at –20 °C until use. In general, there is no need for further sRNA enrichment (*see Note 3*).

3.2 RNA Molecular Weight Marker Preparation

1. Set up the following reaction on ice, according to the manufacturer's directions:
 - (a) 1 μL γP^{32} -ATP (1–4 pmol of ATP)
 - (b) 1 μL Decade marker RNA (included in kit)
 - (c) 1 μL 10 \times buffer (included in kit)
 - (d) 1 μL T4 polynucleotide kinase (included in kit)
 - (e) H_2O to 10 μL
2. Incubate at 37 °C for 1 h.
3. Stop reaction by addition of.
 - (a) 8 μL H_2O
 - (b) 2 μL 10 \times cleavage reagent (included in kit)
4. Incubate for 5 min at room temperature, and then add 20 μL gel loading buffer (included in kit).
5. Incubate at 95 °C for 5 min (*see Note 4*).

3.3 RNA Gel Electrophoresis and Membrane Transfer

1. Mix 10 μg of total RNA with RNA loading buffer to a convenient volume for loading. Because the sample is already in 50% formamide, the volume can be easily adjusted while maintaining denaturing conditions for the sample (at least 50% formamide vol/vol).

2. If the RNA molecular weight markers are included, care should be taken to load an appropriate amount (*see Note 4*).
3. Separate RNA samples using a 15% polyacrylamide/8 M urea/1 × TBE minigel. Electrophorese at 10 mA (~1 h for 8 cm × 10 cm minigels) (*see Note 5*).
4. Remove the polyacrylamide gel from the gel electrophoresis apparatus. Trim the borders of the polyacrylamide gel to eliminate lanes and extra bits of polyacrylamide; if RNA molecular weight markers were included, try to eliminate the bottom border of the gel where the unincorporated $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ migrated (this can be achieved with the aid of a Geiger counter) (*see Note 4*).
5. Place two layers of 3MM Whatman paper (cut to the size of the gel), previously soaked in 0.5 × TBE buffer on the semi-dry apparatus. Carefully place a Hybond-N+ membrane (soaked in 0.5 × TBE buffer) directly in contact with the polyacrylamide gel on top of the Whatman paper. Once the membrane contacts the gel, do not move or reposition the membrane as transfer of RNA to the membrane may start immediately. Cover with two more layers of 3MM Whatman paper previously soaked in 0.5 × TBE buffer. Assemble the semi-dry apparatus, and transfer the resolved RNA to the membrane for 35 min at 100 mA (*see Note 6*).
6. Disassemble the semi-dry apparatus, and recover the membrane, and crosslink RNA to the membrane with a UV crosslinker using the standard settings, twice. At this point the membrane can be stored in saran wrap at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used.

3.4 5-End Labeling of Oligonucleotides

1. Set up the following reaction on ice (*see Note 7*):
 - (a) 3–4 μL $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ (10–13 pmol of ATP)
 - (b) 1 μL oligonucleotide (10 pmol) (*see Note 8*)
 - (c) 1 μL 10 × buffer
 - (d) 1 μL T4 polynucleotide kinase
 - (e) H_2O to 10 μL .
2. Incubate at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h.
3. Purify labeled oligonucleotide to remove unincorporated nucleotide and enzyme using a Sephadex G25 column (Quick-spin mini column, Roche) according to manufacturer directions.
4. Quantify ^{32}P incorporation efficiency using a scintillation counter or similar. Typically 30–40% incorporation efficiency is adequate.

3.5 Hybridization

1. Prehybridization. Incubate crosslinked membrane at least 30 min in Ambion ULTRAhyb-Oligo solution (10 mL for a 10 cm × 10 cm membrane) in a hybridization bottle in an incubator with rotation set at 42 °C.
2. Add 5'-end-labeled oligonucleotide probe (*see* Subheading 3.4 for its preparation and *see* Note 9), and continue hybridization at 42 °C overnight (at least 10 h).
3. Carefully remove hybridization solution (*see* Note 10), and perform two washes in 2× SSC/0.1% SDS for 30 min at 42 °C with rotation.
4. Remove excess liquid, and wrap membrane with saran wrap avoiding wrinkles and bubbles as much as possible. Expose to an autoradiography film or PhosphorImager screen (*see* Notes 11 and 12).
5. Stripping. If re-hybridization is to be performed, wash membrane in boiling-temperature 0.1× SSC/0.1% SDS solution, incubate 15 min while shaking, and repeat wash with fresh boiling-temperature solution. Discard used wash solution as radioactive liquid waste. Confirm that the probe was completely removed from the membrane by exposing to an autoradiography film or PhosphorImager screen before a second hybridization.

4 Notes

1. To consider a reference gene for miRNA quantification, other constitutive sRNA transcripts such as U6 snRNA or 5S rRNA have been extensively used. Because these RNAs are highly conserved throughout plant evolution, we have successfully used the following oligonucleotides in different plant species [3, 4], including several legumes, *Nicotiana benthamiana*, wheat, rice, maize, *Arabidopsis*, and *Marchantia polymorpha*: antisense_5S rRNA (5'-GAGGGATGCAACACGAGGACTTCCC-3') or antisense_U6 snRNA (5'-CCAATTTTATCGGATGTCCCCG-3'). However, under particular conditions it could be important to consider other miRNAs as constitutive or reference sRNAs, instead of U6 snRNA or 5S rRNA. For some plant species, several miRNAs have already been reported as reference genes in the context of RT-qPCR experiments [5, 6].
2. The RNA pellet is washed with 100% ethanol rather than 70% ethanol to minimize resuspension of small RNAs during this step. For typical miRNAs, an additional step for small RNA enrichment is not required. If necessary, for less abundant RNAs, more total RNA sample can be used during electrophoresis or longer PhosphorImager screen exposure employed (*see* the following steps).

3. The use of 50% formamide solution to resuspend RNA increases yield and does not interfere with absorbance quantification (spectrophotometer or Nanodrop apparatuses) nor with subsequent enzymatic reactions. If formamide presence is an issue, water can be used to resuspend RNA but care should be taken to confirm complete resuspension.
4. The procedure to prepare the RNA molecular weight markers does not include a purification step to remove unincorporated $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$. The remaining unincorporated $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ will migrate faster in the polyacrylamide gel, and thus care should be observed during electrophoresis to avoid contaminating the running buffer in the lower tank (*see step 2* in Subheading 3.3, Gel electrophoresis). Also, removing the section of the polyacrylamide gel where unincorporated $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ migrates will avoid its presence during transfer to membrane and later exposure to PhosphorImager screen.
5. RNA molecules of ~20 nucleotides migrate between the xylene cyanol and bromophenol blue dyes in 15% polyacrylamide gels. Electrophoresis can be carried out at 20 mA, but lower current assures even migration of RNA molecules in the gel.
6. Extreme care should be taken not to extend times of semi-dry transfer of RNA to the membrane, as small molecules tend to pass through and end in the buffer tank.
7. To minimize generation of radioactive waste, we suggest adding the $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ last, after enzyme addition.
8. For labeling of reference gene antisense probes (U6 snRNA or 5S rRNA), we use more oligonucleotide amount (30 pmol) and less $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$ (3 pmol, equivalent to 1 μL). The high abundance of these small RNAs means that the band intensity can be too high, and the probe amount may not be sufficient to adequately hybridize to all RNA samples included in the membrane. To overcome these potential limitations, more probe is added, and its specific activity is reduced, compared to the small RNA probe.
9. We have tested the use of alternative labels such as digoxigenin, but results do not compare in sensitivity to the use of ^{32}P . Standard procedures for handling radioactive materials should be familiar to the experimenter and are not covered here.
10. The hybridization solution containing radiolabeled oligonucleotide can be recovered and reused to hybridize another membrane. In this case, for a new membrane, perform pre-hybridization step with fresh ULTRA-hyb solution as indicated, and replace with probe-containing hybridization solution. Thereafter, proceed as indicated.

11. The time of exposure to an autoradiography film or Phosphor-Imager screen depends on various factors such as the amount of RNA blotted, abundance of the miRNA, or the specific activity of the probe, among others. Exposure to a Phosphor-Imager screen is three to five times more sensitive than to an autoradiography film. In either case, expose hybridized membrane for 6–8 h first to estimate band intensity, and determine if longer exposures are required. Extended exposure times (up to 3 days) will be expected for low abundance RNAs.
12. Expected results. In our hands this procedure is highly sensitive, and the hybridization signal is very clear. Blots contain very low levels of non-specific signal and low background noise. We normalize our blots by performing a second hybridization against U6 snRNA or 5S rRNA using the same procedure and 20-nt long oligonucleotides complementary to conserved regions in these small RNAs. Exposure times are often a few hours in this case. In addition, due to the larger size of these RNA molecules, hybridization can be performed in the same blots after microRNA detection without removing microRNA probes (Fig. 1).

Acknowledgments

CDR received a PhD fellowship from CONACyT. We are grateful to Daniel Blanco-Mello for kindly providing the Northern blot image shown in Fig. 1 (DBM and JLR, unpublished results). This work was partially supported by grants from UNAM (PAPIIT IN-205015, IN-202918) and from CONACyT (CB2010-151571) to JLR.

References

1. Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 20:3407–3425
2. Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007) High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One* 2:e219
3. Arenas-Huertero C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol* 70:385–401
4. Contreras-Cubas C, Rabanal FA, Arenas-Huertero C, Ortiz MA, Covarrubias AA, Reyes JL (2012) The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Mol Biol* 80:103–115
5. Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R (2010) The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Anal Biochem* 406:185–192
6. Feng H, Huang X, Zhang Q, Wei G, Wang X, Kang Z (2012) Selection of suitable inner reference genes for relative quantification expression of microRNA in wheat. *Plant Physiol Biochem* 51:116–122