



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA CONSERVACIÓN DE LOS MICROPÉPTIDOS (miPEPs) CODIFICADOS POR PRECURSORES DE miR160 Y miR393, Y SU EFECTO EN LAS INTERACCIONES PLANTA- MICROORGANISMO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

DIANEY CELESTE CRUZ MUÑOZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. DAMIEN FORMEY DE SAINT LOUVENT
2023
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Cruz

Muñoz

Dianey Celeste

55 10 78 17 12

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

315103274

2. Datos del Asesor

Dr.

Damien

Formey de Saint Louvent

3. Datos del Sinodal 1

Dra.

Svetlana

Shishkova

4. Datos del Sinodal 2

Dra.

Vasti Thamara

Juárez

González

5. Datos del Sinodal 3

Dr.

Jesús

Montiel

González

6. Datos del Sinodal 4

Dr.

Oswaldo

Valdés

López

3. Datos del trabajo escrito.

Análisis de la conservación de los micropéptidos (miPEPs) codificados por precursores de miR160 Y miR393, y su efecto en las interacciones planta-microorganismo.

88 p

2023

4. Palabras clave (temas principales que trata la tesis):

“interacciones” “simbiosis” “enfermedad” “miRNAs” “miPEPs”





DEDICATORIA

A mis padres Berta, Fausto y mi hermana Paola...por brindarme siempre su cariño, su amor y apoyo incondicional. A ustedes les debo el haber llegado hasta aquí, porque me alentaron siempre a seguir intentando y me ayudaron a levantarme todas las veces que tropezaba. Los amo mucho.

A mi familia paterna y materna...porque gracias a ustedes sé de dónde vengo y han sido una guía para saber a dónde voy, gracias por todos los consejos y el apoyo que me han dado, estoy muy agradecida de tenerlos en mi vida.

A mí...por haber perseverado durante el camino y no haberme dado por vencida aún en los momentos más complicados. Sigamos adelante, para todo problema siempre habrá una solución.





AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la UNAM...por las personas tanto profesor@s como amig@s que me permitió conocer, por todo el conocimiento que se me brindó a lo largo de la carrera y las oportunidades que me fueron ofrecidas.

A mi asesor el Dr. Damien Formey...por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo para la realización de este proyecto y sobre todo le agradezco su guía, dedicación, paciencia y el haber estado siempre pendiente de mi avance, lo cual fue un pilar esencial para que yo pudiera realizar este trabajo.

Al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM...por haberme dado la oportunidad de acercarme a su institución a través del taller que ofrecen en la Facultad y posteriormente al permitirme hacer una estancia para realizar mis experimentos en el Programa de Genómica Funcional de Eucariontes. Fue una gran experiencia para mí el poder formar parte del Centro y conocer un poco de lo que es el día a día en la investigación.

A l@s miembros del programa de Genómica Funcional de Eucariontes: Melissa, Ana Karen, Javier, Ivette, Jordan, Alfonso, Jesús, Allanis, doctores y técnic@s académic@s que me apoyaron en el laboratorio para la realización de este proyecto.

A Diana, Julio, Grecia, Selene, Alejandra, Mitzy, Lesly. Gracias por haber compartido momentos conmigo y por haberme dado ánimos a lo largo de este proceso, los tqm.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave IA202620 y al proyecto de Investigación Científica Básica del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT número A1-S-16129.





ÍNDICE

Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Las plantas y sus interacciones biológicas.....	10
1.2 Las plantas leguminosas.....	11
1.3 Biología de <i>Phaseolus vulgaris</i> y su importancia.....	12
1.4 Diálogo molecular en la simbiosis fijadora de nitrógeno.....	12
1.5 Organogénesis del nódulo.....	13
1.6 La señalización mediada por auxinas y su papel en la nodulación.....	15
1.7 Parasitismo: La carrera armamentista planta-patógeno.....	16
1.7.1 <i>Botrytis cinerea</i> , causante de la enfermedad del moho gris.....	19
1.8 Biogénesis de los microRNAs (miRNAs).....	19
1.9 Micropéptidos producidos por precursores de miRNAs (miPEPs).....	21
2. Antecedentes.....	22
2.1 Los micropéptidos en las interacciones planta-microorganismo.....	22
2.2 miR160 y miR393 en la simbiosis leguminosa-rizobio y patogenicidad.....	23
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6. Metodología.....	26
6.1 Obtención de las secuencias precursoras de miRNAs.....	26
6.2 Análisis de conservación en los precursores.....	27
6.3 Identificación de marcos de lectura abiertos (ORFs).....	27





6.4 Prueba de sesgo de codón con el programa <i>COUSIN</i>	28
6.5 Prueba de sesgo de codón con <i>CAI</i>	28
6.6 Análisis de conservación en ORFs	29
6.7 Aplicación exógena de miPEPs	29
6.7.1 Enfermedad del moho gris	30
6.7.2 Simbiosis fijadora de nitrógeno	30
6.7.3 Actividad de la enzima nitrogenasa	31
6.8 Diseño de <i>primers</i> para qRT-PCR	31
6.9 Extracción de RNA total	32
6.9.1 Cuantificación de la acumulación de miRNA160 y sus mRNAs blancos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	32
7. Resultados	34
7.1 Conservación nucleotídica en secuencias precursoras	34
7.2 Identificación de los miPEPs generados por precursores de miR160 y miR393 y elección de candidatos para síntesis	35
7.2.1 Identificación de ORFs en los precursores de miRNAs en <i>A. thaliana</i>	35
7.2.2 Identificación de ORFs en los precursores de miRNAs en <i>P. vulgaris</i>	37
7.3 Conservación peptídica en secuencias de ORFs	40
7.4 Aplicación de miPEPs sintéticos	42
7.4.1 Efecto de miPEP160a y miPEP160b en la enfermedad del moho gris	42
7.4.2 Acumulación de miR160, pmiRNAs y transcritos blanco en la enfermedad del moho gris	44
7.4.3 Efecto de miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 en la simbiosis <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i>	49
7.4.4 Acumulación de miR160, pmiRNAs y blancos en la simbiosis <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i>	52
8. Discusión.....	55
8.1 Conservación de precursores	55





8.2 Identificación y conservación de ORFs	57
8.3 Aplicación de miPEPs sintéticos y análisis de su efecto en la simbiosis <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i> y la enfermedad del moho gris	58
8.3.1 Análisis del efecto de miPEP160a y miPEP160b en la enfermedad del moho gris	58
8.3.2 Análisis del efecto de miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i>	60
9. Conclusiones.....	62
10. Perspectivas.....	63
11. Referencias	64
12. Anexos	74
12.1 Secuencias de miRNA, precursores y IDs de transcritos blanco de miR160 y miR393	74
12.2 ORFs encontrados en los precursores de miR160 y miR393	76
12.2.2 ORFs miR160 y miR393 en <i>A. thaliana</i>	76
12.2.3 ORFs de miR160 y miR393 encontrados en <i>P. vulgaris</i>	78
12.3 MiPEPs sintéticos aplicados durante la enfermedad del moho gris y en la simbiosis fijadora de nitrógeno <i>P. vulgaris</i> - <i>R. etli</i>	82
12.4 Solución de riego B&D	82
12.5 <i>Primers</i> utilizados en los ensayos qRT-PCR	83
12.6 Protocolo de extracción RNA total con el kit Norgen Total RNA purification plus kit (#48300, 48400)	84
12.7 Protocolo de electroforesis en gel desnaturalizante.....	85
12.8 Protocolo stem-loop RT-PCR.....	86
12.9 Protocolo qPCR	87





Resumen

La comunicación planta-microorganismo se establece de acuerdo con las necesidades del hospedero y la identidad de las comunidades microbianas, presentes, propiciando o restringiendo interacciones específicas. La comunicación es compleja e involucra mecanismos de regulación de la expresión génica a diferentes niveles, con la participación de moléculas como los microRNAs (miRNAs) y los micropéptidos (miPEPs): péptidos pequeños codificados en los precursores de miRNAs, de los cuales se desconoce en detalle los mecanismos moleculares que subyacen su actividad regulatoria. En este trabajo se caracterizó a los miPEPs codificados en precursores de las familias miR160 y miR393 por medio de análisis bioinformáticos y la aplicación exógena de los miPEPs seleccionados en dos interacciones planta-microorganismo: La simbiosis fijadora de nitrógeno (SFN) entre *Phaseolus vulgaris* – *Rhizobium etli* y la enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis thaliana*. Se encontró que los precursores de miR160 están conservados entre ambas especies de plantas, mientras que la relación basal de los precursores miR393 no es clara debido a un valor de soporte bajo. Se identificaron 36 marcos de lectura abiertos (ORFs) en los precursores miR160 entre los que no se observó un patrón de conservación. Sin embargo, para los precursores de miR393 no se identificaron ORFs que potencialmente puedan generar miPEPs. Finalmente, el tratamiento con miPEP160b disminuyó el tamaño de lesión en las hojas de *A. thaliana* proponiendo un papel en el aumento del depósito de calosa, mientras que el miPEP160 7.1 tuvo efecto en el desarrollo de los nódulos durante la SFN y generó un incremento en la actividad de la enzima nitrogenasa. En conjunto, estos resultados indican que los precursores de miRNAs generan miPEPs con un efecto en las interacciones planta-microorganismo tanto benéficas como perjudiciales para las plantas.





Abstract

Plant-microorganism communication is based on the plant needs and the microorganism community present in the environment, favoring or restricting specific interactions. Plant-microorganism communication underlies complex interactions and involves mechanisms of regulation of gene expression at different levels, including participation of microRNAs (miRNAs) and micropeptides (miPEPs): small peptides encoded by miRNA precursors, molecular mechanisms underlying miPEPs regulatory activity are still unknown in detail. In this work, miPEPs precursors encoded by miR160 and miR393 families were characterized through bioinformatic analysis and exogenous application of the selected miPEPs in two plant-microorganism interactions: The nitrogen-fixing symbiosis (NFS), of *Phaseolus vulgaris* – *Rhizobium etli*, and gray mold disease, caused by *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. We found that miR160 precursors are conserved, whereas the relation of miR393 precursors is unclear due to a low support value. Furthermore, we identified 36 open reading frames (ORFs) in miR160 precursors, with no conservation pattern observed. For miR393 precursors, we did not identify ORFs that potentially generate miPEPs. Finally, treatment with miPEP160b decreased the size of the lesion in *A. thaliana* leaves, suggesting a role in the increase of callose deposition, while miPEP160 7.1 affected the nodule development during NFS and caused an increase in the activity of the nitrogenase enzyme. We conclude that miRNA precursors generate miPEPs with an effect on plant-microorganism interactions, both beneficial and harmful to the plants.





1. Introducción

1.1 Las plantas y sus interacciones biológicas

Las plantas mantienen una interacción constante con las comunidades de microorganismos que habitan en ellas o se encuentran a su alrededor, razón por la que estos han sido denominados microbiota de la planta. La microbiota de las plantas está compuesta de: bacterias, hongos, virus, arqueas, así como de protistas de distintos taxa. A nivel de especie, la distribución de esta microbiota difiere dependiendo de las zonas geográficas y su abundancia depende de las condiciones ambientales, las interacciones microorganismo-microorganismo, y del genotipo de los huéspedes y el hospedero (Trivedi *et al.*, 2020; Fitzpatrick *et al.* 2020).

Existen interacciones planta-microorganismo benéficas para las plantas, promoviendo un mayor crecimiento, la disponibilidad de nutrientes a los que normalmente no tienen acceso o incluso pueden generar una defensa en contra de patógenos (Trivedi *et al.*, 2020). Estos beneficios son tales que las plantas han logrado crecer en hábitats en los que normalmente no podrían desarrollarse sin estos microorganismos (French *et al.* 2021). Un ejemplo de estas interacciones benéficas es la Simbiosis Fijadora de Nitrógeno (SFN), que es una asociación mutualista entre plantas leguminosas y bacterias del orden Rhizobiales, comúnmente llamadas rizobios.

Por otro lado, existen microorganismos que utilizan a las plantas como una fuente de nutrientes para su desarrollo (Wirthmueller *et al.*, 2013). Las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten contender con estos microorganismos para evitar daños. El conjunto de estas respuestas se denomina como respuesta inmune (Jones & Dangl, 2006), y se divide en dos ramas principales: La inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a microorganismos o patógenos (por sus siglas en inglés, PTI: PAMP-triggered immunity) y la inmunidad desencadenada por efectores (por sus siglas en inglés, ETI: effector-triggered immunity) (Jones & Dangl, 2006; Wirthmueller *et al.*, 2013; Noman *et al.*, 2019). En un proceso coevolutivo, los microorganismos patógenos han desarrollado estrategias moleculares que les permiten evadir el sistema de defensa de la planta y causar su muerte (Wirthmueller





et al., 2013). Un ejemplo de ello es la enfermedad del moho gris causada por *Botrytis cinerea*, que es capaz de infectar a una gran variedad de especies, entre ellas *Arabidopsis thaliana* (Williamson *et al.*, 2007).

Las interacciones entre plantas y microorganismos tanto benéficas como perjudiciales, son prioritarias de estudio para favorecer la disponibilidad de los alimentos y su inocuidad. A través de diferentes enfoques experimentales se busca mejorar el rendimiento de las plantas y su capacidad de crecer en ambientes estresantes donde la disponibilidad de nutrientes y agua pueda ser escasa (Singh *et al.*, 2019).

1.2 Las plantas leguminosas

Las leguminosas son plantas angiospermas que conforman a la familia Fabaceae o Leguminosae, que contiene cerca de 20000 especies y 727 géneros, siendo así la tercera familia más grande de angiospermas (Velázquez *et al.*, 2010). Sin embargo, sólo una fracción reducida de este grupo es utilizada para fines de consumo humano (Peix *et al.*, 2014). Algunas de las especies más importantes a nivel mundial son la soya (*Glycine max*), el cacahuate (*Arachis hypogaea*), el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), el chícharo (*Pisum sativum*), la lenteja (*Lens culinaris*), el haba (*Vicia faba*) y el garbanzo (*Cicer arietinum*) (Silva *et al.* 2017).

Desde la antigüedad, las leguminosas han sido base de la alimentación en muchas civilizaciones, actualmente son reconocidas como el segundo alimento más importante para la dieta humana; esto debido al hecho de que, en combinación con los cereales, podrían contener todos los aminoácidos esenciales para una dieta saludable (Peix *et al.*, 2014). Su importancia no sólo recae en su valor alimenticio, sino que también tienen un papel ecológico importante debido a la simbiosis que forman con bacterias del orden Rhizobiales, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, permitiendo su disponibilidad para las leguminosas. A cambio, las plantas le brindan a su simbionte fuentes de carbono (Oldroyd, 2013). Tal propiedad ha sido aprovechada en la agricultura para la rotación de cultivos con cereales, ya que parte del nitrógeno fijado por las bacterias permanece en el suelo después del ciclo de crecimiento de cultivo (Peix *et al.* 2014; Mera & Rouanet, 2022).





1.3 Biología de *Phaseolus vulgaris* y su importancia

El frijol común es una planta herbácea anual que puede ser arbustiva o crecer como enredadera, su forma cultivada se puede encontrar en casi todas las regiones del mundo a excepción de las más frías (Vibrans, 2009). Su lugar de origen es el centro de México, posteriormente se dispersó hacia América Central y finalmente hacia América del Sur, generando dos acervos genéticos distintos: El acervo genético mesoamericano y el acervo genético andino (Stopnisek & Shade, 2021). El frijol no sólo es considerado como una de las leguminosas más importantes a nivel mundial, sino también, ha sido descrita por algunos como la leguminosa más cultivada (Singh, 2020; Stopnisek & Shade, 2021). La superficie cosechada mundial se estima en 36 millones de hectáreas, cantidad con una tendencia en aumento (CEDRSSA, 2020).

Una gran diversidad de especies del género *Rhizobium* es capaz de formar simbiosis con el frijol, como *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. gallicum* (Santamaría *et al.*, 2017; Bustos *et al.*, 2017), aunque también puede ser nodulado por especies de otros géneros como, por ejemplo, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*; e.g. *E. fredii* o *E. meliloti*) (Silva *et al.*, 2017).

1.4 Diálogo molecular en la simbiosis fijadora de nitrógeno

Bajo condiciones deficientes en nitrógeno, las leguminosas establecen un primer contacto con rizobios en la rizosfera, secretando flavonoides en los exudados radicales. Estos compuestos, son percibidos de manera específica por rizobios compatibles, induciendo la expresión de los genes *Nod*, que codifican enzimas participantes en la síntesis y liberación de lipoquitoligosacáridos (LCO) conocidos como factores Nod (Skorupska *et al.*, 2017). Los factores Nod son liberados por los rizobios y percibidos por receptores tipo cinasa con motivos LysM (LysM-RLKs), ubicados en la superficie membranal de los pelos radicales en la epidermis de la raíz, induciendo la cascada de señalización para la simbiosis (Oldroyd, 2013).

Posterior al reconocimiento de los factores Nod, la transducción de señales por medio de segundos mensajeros permite el inicio de las oscilaciones de calcio en la región perinuclear de las células epidérmicas y, posteriormente, en las células corticales (Oldroyd, 2013). Las oscilaciones de calcio permiten la activación de una proteína





cinasa dependiente de calcio y calmodulina (CCaMK) (Roy *et al.*, 2020). Esta proteína puede ser activada por la unión directa del calcio, o por la unión de éste a un complejo formado con la calmodulina (Oldroyd, 2013). CCaMK tiene como función fosforilar al factor de transcripción CYCLOPS, que junto con otros factores de transcripción (e.g. NODULATION SIGNALING PATHWAY (NSP) o NODULE INCEPTION (NIN), permiten la transcripción de genes requeridos para la infección rizobial y organogénesis de los nódulos (Oldroyd, 2013; Clúa, 2018; Roy *et al.*, 2020).

Para el proceso de infección rizobial, es necesario el reordenamiento del citoesqueleto en los pelos radicales, lo que permite su enroscamiento para la formación de bolsas de infección donde los rizobios son capturados (Ferguson *et al.*, 2010; Oldroyd, 2013; Roy *et al.*, 2020). A partir de las bolsas de infección, se forma una estructura tubular denominada “hilo de infección” mediante un proceso de invaginación de la membrana plasmática. Los hilos de infección, funcionan como un canal a través del cual las bacterias invaden el interior de la raíz (Oldroyd, 2013). La formación y extensión de los hilos de infección requiere de varios elementos y procesos como la remodelación de la pared celular, proteínas de tráfico de la membrana plasmática, componentes de la vía de la autofagia, el infectosoma, (complejo de exoquistes que guían el crecimiento de los hilos de infección) y otros cambios transcripcionales y postraduccionales (Roy *et al.*, 2020).

1.5 Organogénesis del nódulo

En la simbiosis entre rizobios y leguminosas, existen dos tipos de nódulos que pueden formarse: determinados e indeterminados (Roy *et al.*, 2020). Los nódulos determinados se forman en especies como *Lotus japonicus*, la soja (*Glycine max*) y el frijol (*Phaseolus vulgaris*), estos nódulos se caracterizan por su forma esférica y la presencia de su meristemo sólo durante las primeras etapas del desarrollo del nódulo (Nizampatnam *et al.*, 2015; Skorupska *et al.*, 2017). Por otro lado, los nódulos indeterminados se forman en especies como el chícharo (*Pisum sativum*) y *Medicago truncatula*, tienen forma cilíndrica y cuentan con un meristemo persistente a lo largo de la vida del nódulo (Nizampatnam *et al.*, 2015; Skorupska *et al.*, 2017).





Conforme se desarrolla el proceso de infección, la formación de nódulos inicia con una serie de divisiones celulares en el periciclo, ubicado en el interior de la raíz. Las divisiones celulares que ocurren posteriormente tienen su localización dependiendo del tipo de nódulo formado (Roy *et al.*, 2020). En el caso de la división celular para la formación de nódulos determinados, esta continúa en las células de la parte media y externa del córtex, mientras que, en los nódulos indeterminados, la división celular continúa en la parte interna del córtex, dando lugar al primordio del nódulo en ambos casos (Roy *et al.*, 2020; Monroy-Morales *et al.*, 2022). Los hilos de infección se ramifican y llegan a este primordio, donde las bacterias son liberadas del hilo de infección y alojadas dentro de las células vegetales en compartimentos especiales delimitados por membranas denominados simbiosomas, en estos espacios ocurre su diferenciación en bacteroides, una forma especializada para la fijación de nitrógeno (Oldroyd, 2013). El nódulo provee a los bacteroides un ambiente bajo en oxígeno, ya que el oxígeno tiene la capacidad de unirse de manera rápida e irreversible a la enzima nitrogenasa, inhibiendo su función de fijación de nitrógeno (Jiang *et al.*, 2021). Los bacteroides comienzan a fijar el nitrógeno liberándolo en forma de amoníaco, siendo asimilado por la planta por medio de la conversión a glutamina (Ferguson *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2020). Finalmente, el transporte de nutrientes dentro y fuera de los nódulos se efectúa gracias a las conexiones simplásticas y vasculares formadas en los nódulos maduros (Turner *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

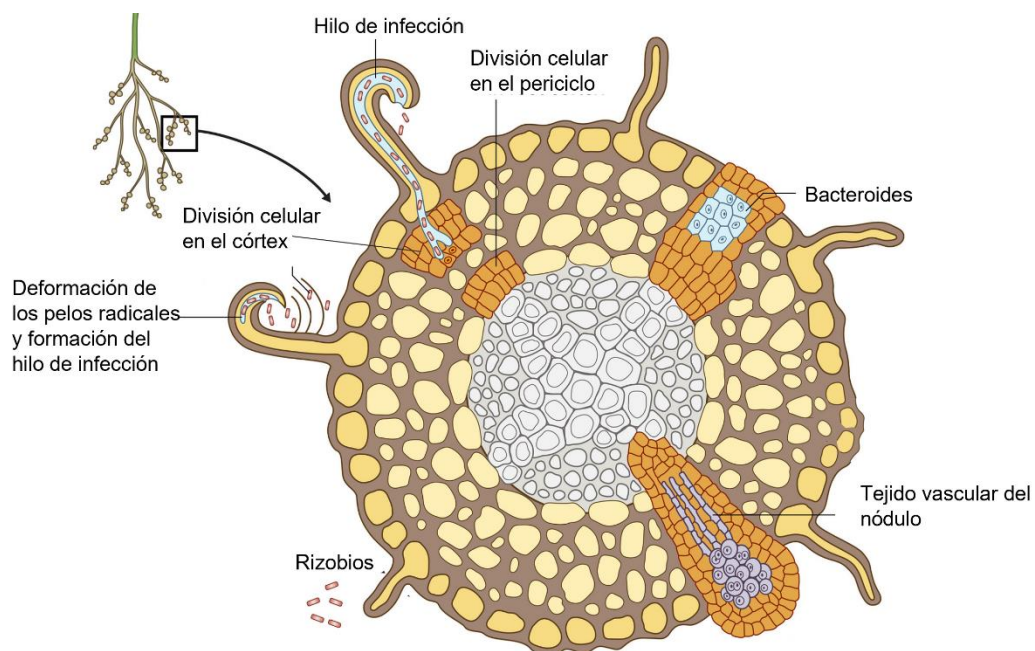




Figura 1. Proceso de nodulación en la simbiosis fijadora de nitrógeno. Modificada de Roux *et al.*, 2017.

1.6 La señalización mediada por auxinas y su papel en la nodulación

Las auxinas son fitohormonas que participan en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, como el inicio y desarrollo de las raíces laterales y adventicias; también, intervienen en la diferenciación vascular, la división y crecimiento celular (Li *et al.*, 2016). A nivel molecular, las auxinas establecen un enlace entre las proteínas Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-Box (TIR1/AFB) y las proteínas Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/IAA), permitiendo la ubiquitinación y degradación de Aux/IAA, que son represores transcripcionales de genes de respuesta a auxinas (Leyser, 2017). De esta manera, los factores de transcripción “Factores de respuesta a auxinas” (ARFs; por sus siglas en inglés “Auxin Response Factors”) que en principio se encuentran unidos a las proteínas Aux/IAA, son liberados de esta interacción, regulando la transcripción de los genes de respuesta a auxinas mediante su unión al motivo AuxRE localizado en los promotores de estos genes (Mallory *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2016).

En la nodulación, las auxinas actúan de manera temprana tanto en el proceso de infección rizobial como en la organogénesis de nódulos. En la infección rizobial, la síntesis de auxinas y los genes relacionados con su señalización son inducidos a partir del tratamiento con factores Nod (Breakspear *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2021). La presencia de auxinas también se ha detectado por medio de un sensor para la acumulación de auxina en los sitios de infección, promoviendo la formación de hilos de infección, regulando de manera positiva este proceso (Nadzieja *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha mostrado que la expresión de genes como *ARF16a* en *M. truncatula*, se requiere para el proceso de infección, ya que mutaciones en este gen reducen el número de eventos de infección (Breakspear *et al.* 2014).

Una serie de reguladores transcripcionales como NIN y el receptor Lotus Histidine Kinase (LHK1) permiten la acumulación de un máximo de auxinas requerido para la división celular e inicio de la organogénesis de nódulos (Nadzieja *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020). Las auxinas se detectan por primera vez en las células corticales en división





que se encuentran debajo de los pelos radicales infectados por rizobios (Suzaki *et al.*, 2012) y en el periciclo para la formación de primordios nodulares (Turner *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2020). Una vez que los nódulos son maduros, las auxinas se restringen a la periferia del nódulo y su zona vascular (Turner *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2020). La presencia de las auxinas durante las diferentes etapas de la organogénesis, muestran que tienen un papel relevante durante todo el proceso de nodulación.

1.7 Parasitismo: La carrera armamentista planta-patógeno

En el otro extremo de las interacciones, tenemos a los microorganismos patógenos que causan enfermedades en las plantas para conseguir nutrientes y fuentes de energía. Estas interacciones, similar a lo que ocurre en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre leguminosas y rizobios, son dadas por una comunicación mediada por moléculas de la planta y el patógeno (Trivedi *et al.*, 2020).

Las plantas restringen la entrada de una gran cantidad de microorganismos a través de sus barreras estructurales como la superficie de su cutícula, la pared celular y los depósitos de calosa entre la membrana plasmática y la pared celular (Conrath *et al.*, 2015; Nishad *et al.*, 2020; Wang *et al.* 2021). Aun con estas estructuras, las plantas deben ser capaces de detectar a los microorganismos en caso de que traspasen sus barreras, por ello, en la superficie de sus células se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que detectan moléculas denominadas como patrones moleculares asociados con microorganismos (MAMPs) o con patógenos (PAMPs), como la flagelina de las bacterias y la quitina en los hongos, que son ejemplos de MAMPs (Nishad *et al.*, 2020). También, pueden detectar patrones asociados al daño de las estructuras vegetales (DAMPs) (Wirthmueller *et al.*, 2013; Wang *et al.* 2021). Cuando los PAMPs, MAMPs o DAMPs se unen a los PRRs, estos inician un proceso de señalización intracelular denominada inmunidad mediante PRR o inmunidad desencadenada por patrones (PTI) (Li *et al.*, 2010; Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020). Estas señales incluyen la activación de una cascada de fosforilación de factores de transcripción por proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediada por la NADPH oxidasa RbohD y la superóxido dismutasa (SOD), y la entrada de calcio





extracelular en el citosol inducido por las ROS (Li *et al.*, 2014; Nishad *et al.*, 2020) **(Figura 2)**.

En ocasiones, la PTI puede contener los procesos infecciosos. Sin embargo, los patógenos exitosos han desarrollado estrategias para contrarrestarla a través de factores de virulencia como son las proteínas efectoras, que pueden evitar la activación de la PTI (Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020). Estas proteínas efectoras pueden ser secretadas o entregadas directamente en las células de la planta dependiendo del tipo de patógeno (Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020). Por ejemplo, las bacterias regularmente utilizan el sistema de secreción tipo III (T3SS) para translocar efectores, mientras que los hongos patógenos utilizan haustorios para invadir los tejidos y posteriormente secretar estas proteínas (Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020).

Dado el papel de las proteínas efectoras, las plantas han desarrollado un segundo nivel de respuesta, denominado inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020). En este caso, una serie de receptores intracelulares denominados NLRs: proteínas receptoras con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos, se unen a los efectores para inducir respuestas inmunes como la producción de óxido nítrico y ROS, cambios transcripcionales en genes de defensa y respuesta hipersensible o muerte celular programada (Wirthmueller *et al.*, 2013; Nishad *et al.*, 2020) **(Figura 2)**. También, se ha detectado la acumulación de enzimas hidrolíticas, moléculas antimicrobianas y la deposición de calosa en sitios de infección derivado de la ETI (Nishad *et al.*, 2020). La complejidad que acompaña a las interacciones planta-patógeno deja ver que al finalizar el proceso infeccioso saldrá victorioso aquel individuo que posea un mayor repertorio de respuestas inmunes o efectoras (Wirthmueller *et al.*, 2013).



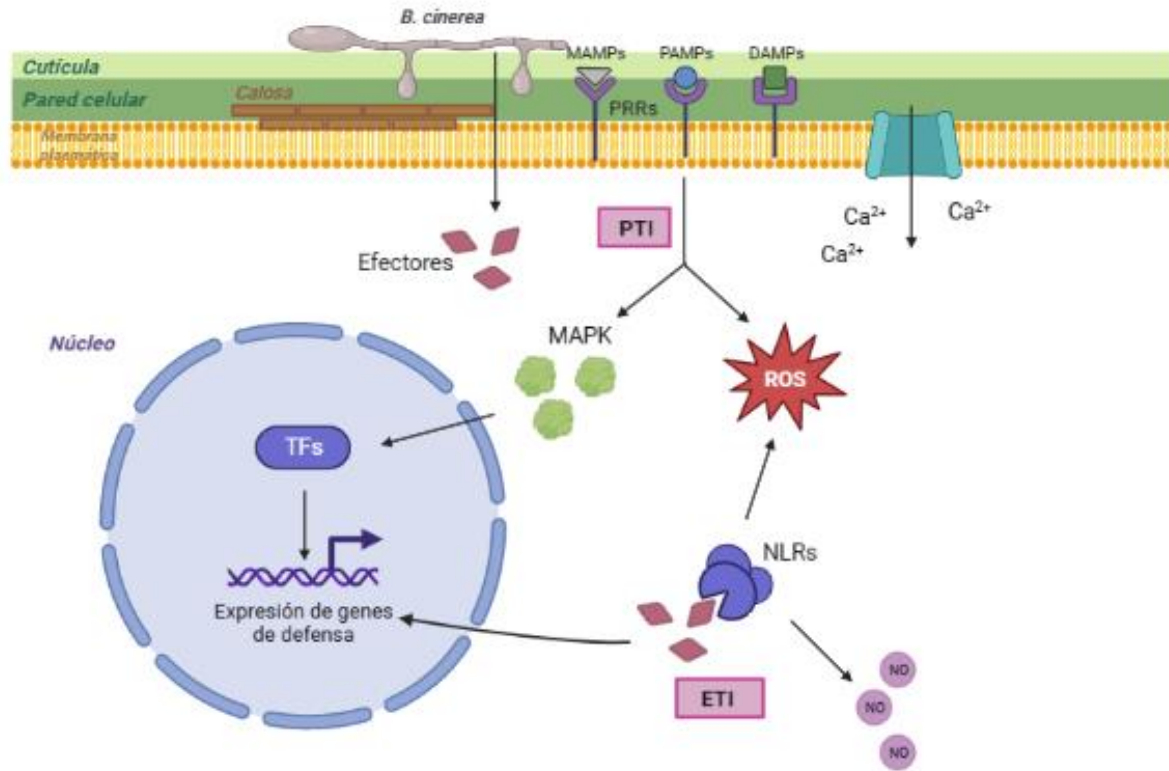


Figura 2. Representación esquemática de la inmunidad desencadenada por patrones (PTI) y la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) en las plantas ante el ataque de patógenos como *B. cinerea*. MAMPs: Patrones moleculares asociados con microorganismos; PAMPs: Patrones moleculares asociados con patógenos; DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño; PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones; MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno; ROS: Especies reactivas de oxígeno; TFs: Factores de transcripción; NO: Óxido nítrico; NLRs: Proteínas receptoras con repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos. Imagen creada con *Biorender.com*.

En las interacciones planta-patógeno también intervienen fitohormonas como el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), el etileno (ET), las auxinas, entre otros (Denancé *et al.*, 2013; AbuQamar *et al.*, 2017; Nishad *et al.*, 2020). Algunas fitohormonas pueden actuar en conjunto, mientras que otras pueden ser antagónicas. En el caso de las respuestas mediadas por auxinas, mediante ensayos de aplicación exógena se ha reportado que pueden debilitar la defensa en las plantas ante el ataque de patógenos, a través de la intervención en la PTI o la interferencia con otras fitohormonas (Checker *et al.*, 2018; Denancé *et al.*, 2013).





1.7.1 *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad del moho gris

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno necrótrofo causante de la enfermedad del moho gris, que afecta a más de 200 especies de plantas alrededor del mundo, entre ellas varias de interés agronómico como son la vid, el jitomate, flores ornamentales, entre otras. *B. cinerea* es capaz de descomponer los cultivos antes y después de la cosecha en condiciones de campo abierto, durante el almacenamiento e incluso en condiciones de invernadero. Por ello, es considerado el segundo fitopatógeno más importante para la agricultura (AbuQamar *et al.*, 2017; Williamson *et al.*, 2007).

A nivel molecular, el mecanismo de infección de *B. cinerea* consiste en la secreción de una serie de toxinas y enzimas líticas que le permiten penetrar la cutícula de su hospedero, la pared celular y posteriormente matar a las células vegetales. La planta, al detectar la quitina (como un MAMP) y los DAMP provenientes del daño a sus estructuras, activa la PTI y comienza a acumular especies reactivas de oxígeno (ROS) (AbuQamar *et al.*, 2017) que tienen un papel antimicrobiano y de señalización (van Rensburg *et al.*, 2020). Las percepciones iniciales de estas moléculas por las plantas derivan en la cascada de señalización que involucra a las proteínas cinasas MAPK, que como se mencionó anteriormente, intervienen en la expresión de genes de defensa (AbuQamar *et al.*, 2017).

1.8 Biogénesis de los microRNAs (miRNAs)

La comunicación a nivel molecular en las interacciones planta-microorganismo es tan compleja, que aún se continúa describiendo la intervención de nuevas moléculas, ejemplo de ello son los microRNAs (miRNAs). En eucariontes, los miRNAs son RNAs no codificantes de alrededor de 21 nucleótidos que inducen el silenciamiento de RNAs mensajeros con secuencia complementaria, siendo cruciales para la regulación post-transcripcional (Lee & Carroll, 2018). Los miRNAs se generan a partir de la transcripción de los genes *MIR* por la RNA polimerasa II, produciendo un precursor primario de miRNAs (pri-miRNAs) (Voinnet, 2009). Los precursores de miRNAs al igual que los RNA mensajeros, tienen un extremo 7-metil GTP (cap) en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3' (Gramzow & Theiben, 2019) y se pliegan de manera imperfecta en una estructura con forma de tallo-asa (Lee & Carroll, 2018).





Posteriormente, el pri-miRNA es procesado por la enzima DICER-LIKE1 (DCL1), que realiza un corte a una distancia de 15 a 17 nucleótidos lejos de la base del tallo-asa, generando precursores de miRNAs (pre-miRNAs). El segundo procesamiento mediado por DCL1 produce un dúplex de RNA formado por el miRNA activo y su miRNA complementario o miRNA *star* (miRNA*) (Lee & Carroll, 2018; Borges & Matienssen, 2015; Gramzow & Theiben, 2019). En el núcleo, el dúplex se asocia con las proteínas argonautas (AGOs), en este complejo se selecciona una sola cadena del dúplex y, comúnmente, el miRNA* es degradado (Lee & Carroll, 2018). La unión de la proteína AGO con el miRNA conforma el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC; por sus siglas en inglés “RNA Induced Silencing Complex”) (Lee & Carroll, 2018; Borges & Matienssen, 2015; Gramzow & Theiben, 2019). Finalmente, el RISC es transportado al citoplasma donde mediante la complementariedad de bases entre el miRNA y su transcrito blanco el RISC puede ejercer su efecto mediante la represión traduccional y/o la escisión del blanco, evitando la disponibilidad del transcrito (Lee & Carroll, 2018; Gramzow & Theiben, 2019). La represión de traducción y/o escisión del blanco, dependerán de la naturaleza del mRNA objetivo y el tipo de proteína AGO involucrada (Borges & Matienssen, 2015) (**Figura 3**).

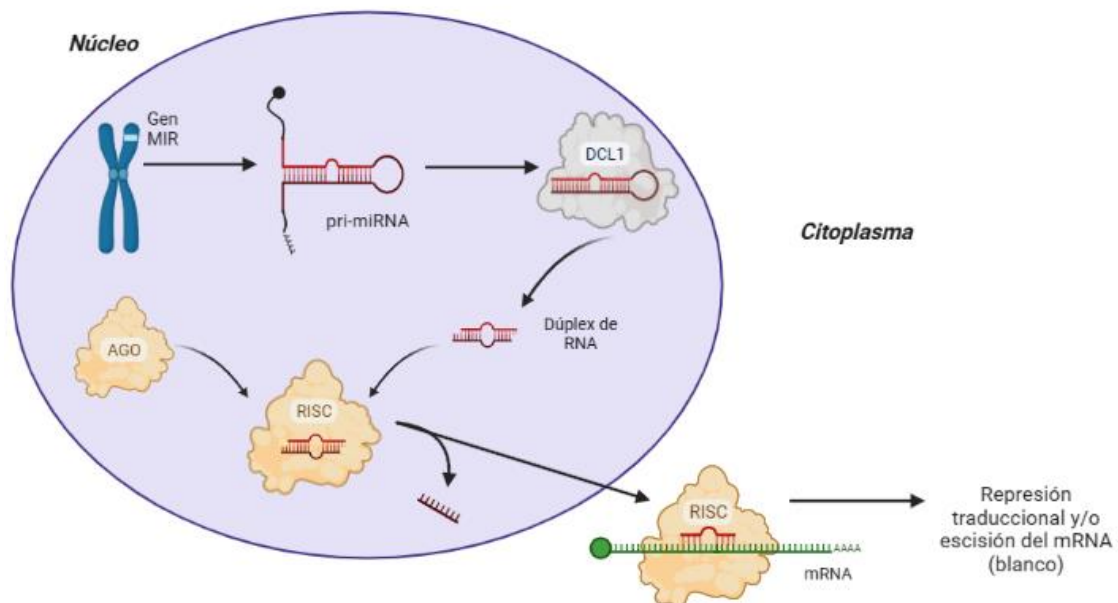


Figura 3. Modelo simplificado de la biogénesis de los miRNAs en plantas. Pri-miRNA: Precursor primario de miRNA; DCL1: DICER-LIKE1; AGO: Proteína argonauta; RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA; mRNA: RNA mensajero (blanco). Imagen creada con *Biorender.com*.





1.9 Micropéptidos producidos por precursores de miRNAs (miPEPs)

Hasta hace poco se creía que los precursores de miRNAs tenían únicamente como finalidad ser parte del procesamiento para obtener miRNAs maduros. Sin embargo, se ha reportado que los precursores contienen marcos de lectura abiertos (ORFs) en su extremo 5' y que éstos pueden codificar péptidos de 5 a 20 aminoácidos de largo en promedio (Lauessergues *et al.*, 2015) (**Figura 4**). El papel regulador de estos micropéptidos codificados por miRNAs (miPEPs) se descubrió primero en miR171b y miR165a por Lauessergues y cols. (2015). La expresión de formas nativas y mutantes de pri-miR171b mostraron que cuando el primer ORF es eliminado o su codón de inicio es mutado, se producen menores cantidades de miR171b en comparación con la expresión del pri-miR171b nativo. A su vez, la sobreexpresión de miPEP171b o su aplicación exógena en una concentración 0.1 μM también permiten una mayor acumulación de miR171b (Lauessergues *et al.*, 2015), de esta manera, se descubrió que los miPEPs tienen la capacidad de aumentar la transcripción de su pri-miRNA y, por lo tanto, permiten la acumulación del miRNA maduro, generando un mayor silenciamiento del transcrito blanco (Lauessergues *et al.*, 2015; Lauessergues *et al.*, 2022).

Los reportes sobre la caracterización de los miPEPs hasta ahora son limitados. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la interacción de los miPEPs con su respectivo ORF en la secuencia del pri-miRNA desencadenaría su función (Lauessergues *et al.*, 2022). Adicionalmente, parece ser que sólo el primer ORF del precursor genera un miPEP funcional (Ormancey *et al.* 2021; Chen *et al.*, 2020; Sharma *et al.* 2020; Lauessergues *et al.*, 2015). No obstante, cabe la posibilidad de que, en precursores cuyos ORFs no han sido analizados, ocurra de manera distinta.

Se ha detectado que la relación entre un miPEP y su respectivo miRNA es altamente específica, ya que la aplicación o sobreexpresión del péptido no altera la expresión de otros miRNAs, incluso dentro de la misma familia de miRNAs (Lauessergues *et al.*, 2022), por lo que se ha propuesto a los miPEPs como una herramienta útil para el análisis específico de miRNAs individuales. Cabe destacar, que debido a que la aplicación exógena de un miPEP continúa ejerciendo un efecto en su respectivo miRNA, podrían funcionar como una herramienta tanto para la investigación básica





como para el mejoramiento de especies de interés agronómico sin necesidad de recurrir a la transformación genética (Couzigou *et al.*, 2015).

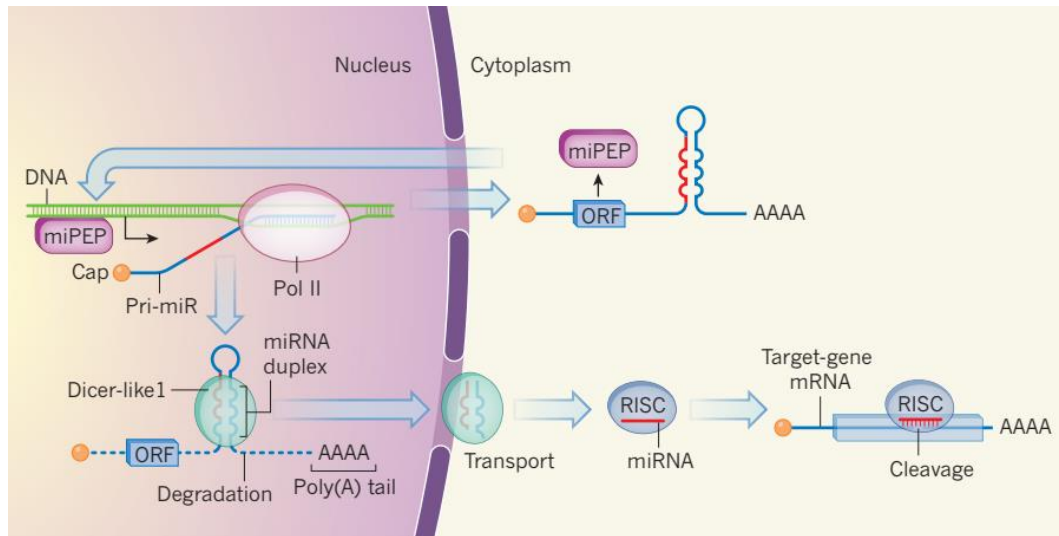


Figura 4. Esquema representativo de la biosíntesis y acción de los miPEPs en plantas y su intervención en la vía de generación de los miRNAs. Tomado de Waterhouse & Hellens, 2015.

2. Antecedentes

2.1 Los micropéptidos en las interacciones planta-microorganismo

Lauressergues y cols. (2015) detectaron los primeros miPEPs en plantas, éstos fueron miPEP171b y miPEP165a. Los análisis de expresión de miPEP171b mostraron su papel en la regulación de la formación de las raíces laterales en *M. truncatula*, mientras que la aplicación exógena de miPEP165a conduce a una mayor longitud de la raíz en *A. thaliana*. Para este último miPEP, detectaron una buena conservación en su secuencia de aminoácidos en siete especies del orden Brassicales.

El papel de los miPEPs también se ha estudiado en interacciones planta-microorganismo, aunque son escasos los reportes que existen al respecto. Couzigou y cols. (2016) reportaron que la aplicación exógena del miPEP172c induce la acumulación de miR172c, que es determinante en el número de nódulos que se forman durante la simbiosis fijadora de nitrógeno entre rizobios y *G. max*, a través del silenciamiento de su blanco, el factor de transcripción “Control del número de nódulos” (NNC1; por sus siglas en inglés “NODULE NUMBER CONTROL 1”).





También, este mismo grupo utilizó el miPEP171b como parte de su investigación sobre el miR171b, que promueve la micorrización arbuscular (Couzigou *et al.*, 2017).

Hasta ahora, no se ha documentado la participación de los miPEPs en interacciones planta-patógeno. Sin embargo, son abundantes los reportes sobre la intervención de los miRNAs en estas interacciones (ver Islam *et al.*, 2018). Por ejemplo, cuando *Gossypium hirsutum*, la planta de algodón, es infectada por el hongo patógeno del sistema vascular *Verticillium dahliae*, se incrementa la producción de miR166 y miR159, que son capaces de silenciar los transcritos de una cisteína proteasa dependiente de Ca^{2+} (Clp-1, por sus siglas en inglés “ Ca^{2+} - dependent cysteine protease”) y una isotricodermina C-15 hidroxilasa (HiC-15, por sus siglas en inglés “isotrichodermin C-15 hydroxylase”), respectivamente, enzimas fundamentales en la virulencia del hongo (Zhang *et al.*, 2016). Es posible que, estudiando la participación de los miRNA en estas interacciones bajo el enfoque de los miPEPs, se encuentre su intervención en tales procesos.

2.2 miR160 y miR393 en la simbiosis leguminosa-rizobio y patogenicidad

Se podría pensar que una interacción patógeno-planta es muy distinta de una relación planta-simbionte por las repercusiones finales que tienen en el hospedero. Sin embargo, investigaciones sugieren que la línea que separa ambas interacciones puede ser borrosa. Esta hipótesis proviene de trabajos en el campo de la simbiosis leguminosa-rizobio, ya que, por ejemplo, algunos análisis transcriptómicos realizados en leguminosas después de ser inoculadas con rizobios muestran, en principio, una mayor expresión de genes relacionados con la defensa de las plantas (Deakin & Broughton, 2009; Cao *et al.*, 2017). A su vez, existe similitud en el tipo de receptores que intervienen en el reconocimiento tanto de señales simbióticas como de señales patogénicas donde, en ambos casos, se componen de un dominio quinasa intracelular activo o inactivo asociado con dominios extracelulares con motivos de lisina (LysM-RLK) (Rey & Jacquet, 2018).

Entre los genes y moléculas que tienen un papel en ambos tipos de interacción, se ha propuesto la participación de ciertos miRNAs como miR160 y miR393 (Simon *et al.*, 2009). En la simbiosis fijadora de nitrógeno, Subramanian y cols. (2008)





reportaron una disminución de acumulación de miR160 a las 12 horas post inoculación (hpi) de *G. max* con *B. japonicum*, sugiriendo que la acumulación de sus blancos ARF10, ARF16 y ARF17 aumentaba. Por otro lado, este trabajo reporta que miR393 tiene una regulación positiva significativa a partir de las 3 hpi, verificando experimentalmente la escisión su transcrito blanco, el receptor de auxinas TIR1.

Por el lado de las interacciones planta-patógeno, se ha descrito a miR160 y miR393 como promotores de la inmunidad basal (Simon *et al.*, 2009). Li y cols. (2010) han reportado que miR160 se regula al alza en el tratamiento con Flg22 en *A. thaliana*, y la sobreexpresión de este miRNA, conduce a la deposición de calosa. La calosa es un polisacárido de pared celular con ramificaciones que interviene en la formación de engrosamientos (o papilas) como respuesta al estrés biótico y abiótico, regulando la permeabilidad de los plasmodesmos en respuesta al ataque de patógenos y generando un reforzamiento estructural para evitar la invasión (Ellinger & Voigt, 2014; Wang *et al.*, 2021). Cabe destacar que tanto en el trabajo de Li y cols. (2010) como en el realizado por Navarro y cols. (2006) se muestra que Flg22, también es capaz de regular al alza el miR393 en *A. thaliana*.

3. Justificación

Las limitantes para un desarrollo adecuado en las plantas son variadas, entre ellas la falta de nutrientes como el nitrógeno en el suelo. A su vez, el ataque de diversos patógenos puede limitar su adecuación al ambiente e incluso puede ocasionarles la muerte. Esto tiene implicaciones para la producción de la extensa variedad de especies de interés agronómico y ornamental que utilizamos.

Investigar la participación de nuevas moléculas en la simbiosis fijadora de nitrógeno puede ayudar a que, en un futuro no muy lejano, podamos aplicar biotecnología derivada de la interacción logrando que otras especies de plantas puedan fijar el nitrógeno atmosférico tal como lo realizan las leguminosas. A su vez, el uso de nuevas moléculas para combatir a los patógenos contribuye a evitar riesgos para la seguridad alimentaria, disminuyendo el impacto de las enfermedades y por tanto reduciendo la pérdida de alimentos producidos.





Con el reciente descubrimiento de moléculas como los miPEPs en plantas y sus potenciales efectos, es relevante analizar su codificación en secuencias precursoras de los miRNAs que no han sido evaluados con este enfoque, ya que algunas propiedades de los miPEPs, como su actividad específica sobre el miRNA asociado y la facilidad con la que ejercen su efecto al aplicarlos exógenamente, los convierten en candidatos para ser herramientas biotecnológicas eficaces que contribuyan a disminuir las limitantes mencionadas.

A través del estudio de los miPEPs, en este proyecto se contrastarán interacciones planta-microorganismo abordando el caso de miR160 y miR393 que, por su participación en sistemas patogénicos y simbióticos, se vuelven candidatos ideales de estudio. Esto a su vez, permitirá un mayor entendimiento de la comunicación mediada por moléculas que subyacen a las interacciones biológicas entre plantas y microorganismos.

4. Hipótesis

Los transcritos precursores de miR160 y miR393 contienen regiones que codifican para micropéptidos (miPEPs) con actividad regulatoria en las interacciones *P. vulgaris* - *R. etli* y *A. thaliana* - *B. cinerea*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Caracterizar y evaluar la conservación genética de los micropéptidos producidos por precursores de los miRNAs miR160 y miR393, así como su efecto en dos interacciones planta-microorganismo: simbiosis mutualista y patogenicidad.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la conservación de secuencias nucleotídicas y peptídicas en los transcritos precursores de miR160 y miR393 entre diferentes especies de plantas.





- Identificar los miPEPs codificados por precursores de las familias miR160 y miR393.
- Probar el efecto de la aplicación de miPEPs sintéticos en la simbiosis fijadora de nitrógeno dada entre *P. vulgaris* - *R. etli* y la enfermedad del moho gris en *A. thaliana*.

6. Metodología

6.1 Obtención de las secuencias precursoras de miRNAs

La obtención de secuencias precursoras de las familias miR160 y miR393 en *A. thaliana* y *P. vulgaris* se realizó mediante la revisión de literatura reciente (Xie *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Windels *et al.*, 2014; Formey *et al.*, 2015) y la búsqueda en bases de datos como *sRNAanno* (Chen *et al.*, 2021), *miRBase* 22 (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011) y *mirEX* (Zielezinski *et al.*, 2015).

Para la obtención de los precursores en *P. vulgaris*, se realizaron alineamientos locales mediante la plataforma *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) adjunta a la base de datos de *Phytozome v12* (Goodstein *et al.*, 2011) utilizando los parámetros por defecto y el genoma de *Phaseolus vulgaris v2.1* como genoma de referencia. Se localizaron las regiones donde los precursores (secuencias de consulta) y la base de datos presentaban similitudes en la capa *Log-scale RNA-seq* (capa con información derivada de una colección de estudios de expresión por RNA-seq), extrayendo así secuencias extendidas hacia el extremo 5' y con término en el extremo 3' donde concluye la zona de tallo-asa (**Figura 5**), llamamos a estas secuencias como "pmiRNAs". Al utilizar este tipo particular de precursores aumentamos la posibilidad de encontrar marcos de lectura abiertos (ORFs) en ensayos posteriores.

Dos de las secuencias precursoras de *A. thaliana* reportadas en la literatura correspondientes a pre-miR160b y pre-miR160c se encontraban incompletas entre el extremo 5' de precursor y la secuencia donde inicia el pre-miRNA. Obtuvimos la secuencia completa de sus pmiRNAs por medio de alineamientos locales en la





plataforma *BLAST* (Altschul *et al.*, 1997) en *Phytozome v12* (Goodstein *et al.*, 2011), utilizando el genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 como referencia.

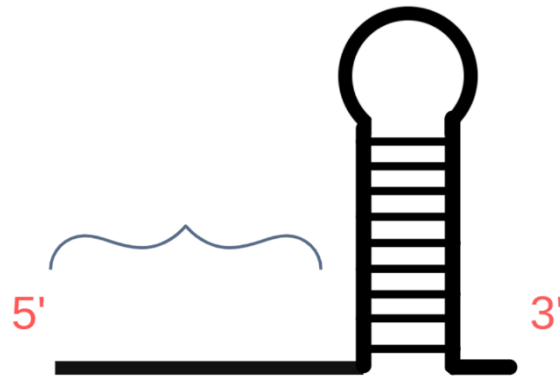


Figura 5. Representación gráfica de un precursor de miRNA con extensión hacia el extremo 5' (pmiRNA). Estos precursores fueron obtenidos a partir de las herramientas e información adjuntas en la base de datos de *Phytozome v12*.

Los pmiRNAs de ambas familias de miRNAs fueron comparados por medio de alineamientos múltiples en el programa *MAFFT* versión 7 (Kato *et al.* 2019) comprobando que contuvieran la secuencias de miRNA maduros 5p y 3p reportadas en *sRNAanno*.

6.2 Análisis de conservación en los precursores

Para evaluar el grado de conservación nucleotídica en los pmiRNAs de miR160 y miR393 en ambas especies de plantas, las secuencias se alinearon utilizando *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, se elaboró una reconstrucción filogenética mediante *MEGA versión 11* (Tamura *et al.*, 2021) utilizando el método estadístico de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). El número de reiteraciones fue de 500 y el valor del soporte del nodo (Bootstrap) igual a 100 ya que es un porcentaje de las reiteraciones, los campos restantes fueron elegidos por defecto.

6.3 Identificación de marcos de lectura abiertos (ORFs)

La identificación de ORFs en las secuencias de pmiRNAs, se realizó mediante la herramienta bioinformática *ORF Finder* de la colección de programas *Sequence*





Manipulation Suite (SMS) versión 2 (Stothard, 2000). Como parámetros, se generaron sólo los ORFs encontrados en la cadena directa, con al menos 5 codones de largo (4 aminoácidos y codón de paro) empezando por ATG en cualquiera de los 3 marcos de lectura posibles.

6.4 Prueba de sesgo de codón con el programa *COUSIN*

Se utilizó el programa *Codon Usage Similarity Index (COUSIN)* (Bourret *et al.*, 2019) para evaluar el sesgo de uso de codón en los ORFs obtenidos de acuerdo con las tablas de uso de codón de *A. thaliana* y *P. vulgaris*. Los parámetros utilizados en la página fueron los mostrados por defecto, seleccionando el código estándar como código genético y añadiendo los archivos FASTA que contenían los ORFs. Las tablas de uso de codón utilizadas como referencia se obtuvieron de <https://www.kazusa.or.jp/codon>. De acuerdo con el programa, el mejor score en un ORF fue aquel que obtuviera un valor más cercano a 1.

6.5 Prueba de sesgo de codón con *CAI*

Se obtuvo el índice de adaptación de codón (*CAI*) y el índice de adaptación de codón esperado (*E-CAI*) como otro de los ensayos para evaluar el sesgo de uso de codón en los ORFs.

Los programas utilizados provienen del *servidor CAIcal* (Puigbò *et al.*, 2008). Primero, a partir de *CAI calculation* se generó el *CAI* para cada uno de los ORFs y después se obtuvo el valor de *E-CAI* (Puigbò *et al.*, 2008) por cada grupo de ORFs que pertenecían a un mismo precursor.

Todos los parámetros utilizados fueron los señalados por defecto a excepción del código genético donde se seleccionó el estándar, se añadieron los archivos FASTA con los ORFs y las tablas de uso de codón se extrajeron de <https://www.kazusa.or.jp/codon>.

El mejor score para este ensayo lo obtuvieron aquellos ORFs (uno por precursor) que tenían un valor mayor o igual al *E-CAI*. El valor de *E-CAI* se obtuvo por cada grupo de ORFs que pertenecían a un mismo precursor.





6.6 Análisis de conservación en ORFs

Se evaluó la conservación en las secuencias peptídicas realizando una reconstrucción filogenética utilizando *MEGA-X* con los ORFs que tuvieran codón de paro y extensión fuera de la zona de tallo-asa. El modelo de sustitución fue *General Reversible Mitochondrial* (mtREV) y el método estadístico fue máxima verosimilitud.

La selección de los péptidos candidatos para síntesis y su posterior aplicación se realizó con base en las relaciones formadas dentro de la reconstrucción filogenética y de acuerdo con 7 criterios:

- 1.- Si el ORF detectado tenía un codón de paro, es decir, que potencialmente sea una proteína completa.
- 2.- Si la extensión del ORF se mantenía fuera de la región tallo-asa de los precursores.
- 3.- Si el ORF es el primero en el extremo 5' del precursor.
- 4.- Si en la literatura se ha reportado como predicción.
- 5.- Si ha sido sintetizado y probado en la literatura.
- 6.- Si en la prueba de sesgo de codones con el programa *COUSIN* presentaba un buen score.
- 7.- Si en la prueba de sesgo de codones con el parámetro CAI, el valor obtenido era mayor al E-CAI (95%) y era el más alto comparado con los ORFs para su mismo precursor.

El cumplimiento de cada uno de los criterios sumaba un punto al total. También, se tomaron como criterios indispensables que los ORFs candidatos contaran con un codón de paro y se encontraran localizados fuera de la zona tallo-asa. Así, el candidato con la mayor puntuación para cada tipo de precursor se consideró como el más adecuado para su síntesis.

6.7 Aplicación exógena de miPEPs

Los péptidos fueron sintetizados por la compañía GenScript (www.genscript.com), posteriormente fueron disueltos en DMSO en concentración 1 mM para los miPEP160a y miPEP160 7.1, 2 mM para el miPEP160b y 3 mM para el miPEP160 7.1 ORF 2. Como control negativo, se utilizó un péptido con el mismo contenido de





aminoácidos que el miPEP evaluado, pero con un rearrreglo generado al azar en la secuencia peptídica, estos péptidos son conocidos como “*scrambled*” (*scr*) de acuerdo con lo descrito por Laressergues y cols. (2015). Su aplicación en las plantas se realizó utilizando una concentración de 0.1 μ M.

6.7.1 Enfermedad del moho gris

Se mantuvieron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) en agua destilada estéril durante 3 días a una temperatura de 4°C. Posteriormente, las semillas germinaron en una mezcla de vermiculita y peat moss (1:2) durante 3 días dentro de una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16h luz / 8 h de oscuridad a una temperatura de 21°C. Finalmente, las plantas se desarrollaron durante 4 semanas en un invernadero con fotoperiodo 12h luz / 12h oscuridad, a una temperatura de 20-22 °C durante el día y una temperatura de 16°-18°C por la noche (Brazales-Cevallos *et al.*, 2022). Para la aplicación de miPEP160a, miPEP160b y sus controles negativos (péptidos “*scrambled*”), las plantas se separaron en 4 grupos independientes a los que se les asperjaron los péptidos en las hojas.

Después de 24 hrs a partir de la aplicación de los péptidos, se aplicó *Botrytis cinerea* a manera de aspersión para las plantas destinadas a ensayos de qRT-PCR y por gota (6 μ L) a las plantas destinadas para la evaluación fenotípica de la infección. La concentración de esporas del hongo fue de 5×10^4 en medio líquido de caldo papa dextrosa (PDB) de concentración 1.5g / 250mL disuelto en agua destilada estéril.

Las hojas para qRT-PCR se colectaron 12 hrs después de la aplicación del hongo y a las 72 hrs se colectaron las hojas con las que se evaluó el fenotipo después de la infección.

6.7.2 Simbiosis fijadora de nitrógeno

Se incubaron semillas de *Phaseolus vulgaris* var. G19833 en una cámara de crecimiento a 25°C en condiciones de oscuridad. Al tercer día de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas en macetas con vermiculita estéril y posteriormente fueron inoculadas con *Rhizobium etli*. Los péptidos evaluados (miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2) y sus controles *scrambled* fueron incorporados





respectivamente a las soluciones de riego, que fueron aplicadas cada dos días durante 21 días en 20 plantas (por cada péptido), alternando la disolución de los péptidos en agua destilada y solución de riego B&D sin nitrato. Durante este tiempo, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento con ambiente controlado de 25°C-28°C y un ciclo de 16h luz / 8h oscuridad (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007).

A los 21 días post-inoculación se colectaron las raíces de cada planta por separado. Del total de 20 plantas por grupo, las raíces de 6 plantas se destinaron a ensayos de qRT-PCR. Con las 14 raíces de plantas restantes, se analizó el fenotipo: número de nódulos y perímetro de los nódulos.

El número de nódulos por planta y la medida de su perímetro se obtuvieron por medio del análisis fotográfico de los nódulos recolectados de cada raíz distribuidos sobre una superficie lisa. A partir de dichas mediciones, se obtuvieron promedios para cada condición y sus respectivos errores estándar.

6.7.3 Actividad de la enzima nitrogenasa

Se evaluó la actividad de la enzima nitrogenasa como una característica fenotípica de las plantas colectadas. La actividad de dicha enzima se midió de manera indirecta por medio de la relación acetileno/etileno cuantificada mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo modelo Varian 3300. Como primer paso, se extrajeron 2 mL de aire de cada frasco que contenía raíces noduladas, posteriormente se inyectaron 2 mL de acetileno en cada uno, homogeneizando su atmósfera e incubando por ~45 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron 0.4 mL de gas por frasco para inyectarse en el cromatógrafo y obtener los volúmenes de acetileno y etileno.

6.8 Diseño de *primers* para qRT-PCR

Se diseñaron *primers* para los precursores de miR160 y blancos *ARF10* (AT2G28350.1, Phvul.005G134500.1), *ARF16* (AT4G30080.1) y *ARF17* (Phvul.009G026200.1) (**Ver anexo 12.4**) para ambas especies de plantas con el propósito de amplificar los transcritos a través de ensayos qRT-PCR.





El diseño de los precursores de miR160 se realizó utilizando la plataforma *Primer3plus*, especificando el tamaño de los amplicones en un rango de 80 a 200 pb, cuidando que éstos amplificaran un fragmento en el 5' del pmiRNA lo más cercano al comienzo de la secuencia miR160. La formación de dímeros y la temperatura de fusión ($T^{\circ}m$) se evaluaron con *Multiple Primer analyzer* de Thermo Fisher Scientific®. Finalmente, la especificidad de los *primers* se verificó con *BLAST-N*, buscando que la plataforma arrojara un solo resultado correspondiente al precursor a amplificar contra su respectiva base de datos genómica: *Phaseolus vulgaris* v2.1 o *Arabidopsis thaliana* TAIR10, con los parámetros por defecto a excepción del tamaño de palabra, reducido a 7 (adaptado a las secuencias más cortas) y sin filtro de e-value.

En el diseño de *primers* para los blancos se cuidó la especificidad intentando en la medida de lo posible que los *primers* se mapearan en la región 3' UTR del transcrito y sobrelaparan un intrón para diferenciar el cDNA con el DNA genómico. Para establecer el tamaño del amplicón, la $T^{\circ}m$ y evitar la formación de dímeros se siguió el mismo procedimiento que para los *primers* de los precursores, realizando una verificación final con *BLAST-N* en la base de datos correspondiente.

6.9 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA, se colectaron hojas de *A. thaliana* Col-0 y raíces de *P. vulgaris* G19833. El RNA se extrajo a partir de 50 mg de cada muestra con el uso del kit Norgen Total RNA purification plus kit (#48300, 48400) de Norgen Biotek Corp, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó y evaluó la pureza del RNA por nanodrop y se evaluó la integridad de éste por medio de una electroforesis de gel desnaturizante al 1% de agarosa y 0.5% de una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex).

6.9.1 Cuantificación de la acumulación de miRNA160 y sus mRNAs blancos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Se cuantificó la abundancia de miR160, sus precursores (pmiRNAs) y los mRNAs blancos (*ARFs*) en cada una de las muestras obtenidas a partir de la aplicación de los miPEPs, para ello se llevaron a cabo ensayos de qRT-PCR. El primer paso fue la síntesis de la primer hebra de cDNA a partir del RNA utilizando una transcriptasa





reversa. Sin embargo, esta enzima requiere de un oligonucleótido inicial para comenzar a generar el cDNA, los microRNAs al carecer de una cola poli-A y tener un tamaño pequeño (21-22 nt) generan limitantes para su retrotranscripción, es por ello que utilizamos la metodología *stem-loop* RT-PCR (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) para poder detectar a miR160 en este trabajo.

La técnica *stem-loop* qRT-PCR emplea un *primer* RT constituido por una secuencia universal y una secuencia de 6 nucleótidos al extremo 3', específica y complementaria del miRNA de interés. Esto permite que la secuencia mencionada se una al miRNA y reclute a la transcriptasa reversa, la cual sintetiza la secuencia complementaria restante del miRNA. Este procedimiento se puede acoplar a la retrotranscripción de los mRNA en la misma muestra al añadir oligo dT a la reacción.

Para la etapa de qPCR se diseñó un *primer forward* conformado por la secuencia del miRNA a excepción de los últimos 6 nucleótidos, también le fueron agregados 5 nucleótidos previo a la secuencia del miRNA para incrementar la T^m. El *primer reverse* es específico para la región *stem-loop* universal, generando amplificaciones a partir de esta secuencia. El resto de los mRNA fueron amplificados utilizando los *primers* específicos diseñados para estas secuencias. En cada uno de los pozos se agregó la mezcla de enzima y el fluoróforo SYBR green, que se intercala en el DNA cuando se forma una doble cadena. La fluorescencia emitida es detectada ciclo a ciclo por el termociclador de PCR en tiempo real, percibiendo así la acumulación de los diferentes transcritos.

Ya que los datos serían analizados por método comparativo de Ct (umbral de ciclos, por sus siglas en inglés) para cuantificación relativa, también se amplificaron genes con expresión constante reportada (genes de referencia) que permiten normalizar la abundancia del gen de interés. Como calibrador para miR160 se eligió al small nucleolar RNA U6 (AT5G51170) y se comparó su abundancia con miR164a en ambas interacciones. Para precursores y blancos de *A. thaliana* se seleccionaron CF-150 (AT1G72150) y UBQ10 (AT4G05320), mientras que para *P. vulgaris* se utilizaron UBQ9 (Phvul.006G110100) y HSP (Phvul.001G039700.1) como genes de referencia. En este método, se compara el Ct de la secuencia de interés contra el Ct de la referencia correspondientes a cada tratamiento ($2^{-(CT \text{ tratamiento} - CT \text{ referencia})}$)





(Schmittgen & Livak, 2008). El número de réplicas biológicas establecidas para los análisis fue igual a 3.

Una vez obtenidos los resultados, se aplicó la prueba estadística U-de Mann Whitney para comparar dos grupos de datos con un intervalo de confianza del 95%. En este caso, se comparó la abundancia de los diferentes transcritos a partir del tratamiento con un péptido o su control *scrambled* y, de esta manera, se analizó si los péptidos tenían efecto o no.

7. Resultados

7.1 Conservación nucleotídica en secuencias precursoras

A partir de la búsqueda en fuentes bibliográficas y bases de datos como *sRNAanno*, *miRBase22* y *mirEX*, se obtuvieron en total 12 secuencias precursoras (pmiRNAs) de miR160 y miR393 en ambas especies de plantas: Para *P. vulgaris* se identificaron 4 secuencias de miR160 y 3 de miR393, mientras que para *A. thaliana* se registraron 3 secuencias para miR160 y 2 de miR393.

Para evaluar la conservación de secuencias nucleotídicas entre los precursores de ambas familias de miRNA, se construyó un dendrograma a partir de las 12 secuencias precursoras encontradas. Se observa que todas las secuencias precursoras de miR160 forman un clado separado de las secuencias precursoras de miR393. Este primer clado tiene un alto valor de soporte (Bootstrap = 100), mientras que en el segundo no es claro el nivel de soporte (**Figura 6**).

Cabe destacar que el precursor de miR160 Chr 7.1 en *P. vulgaris* (pmiR160 Chr07.1 Pvu en la **Figura 6**) se encuentra en el clado de precursores miR160 de *A. thaliana* (pmiR160abc Ath) en lugar de localizarse en el clado de precursores de su misma especie.



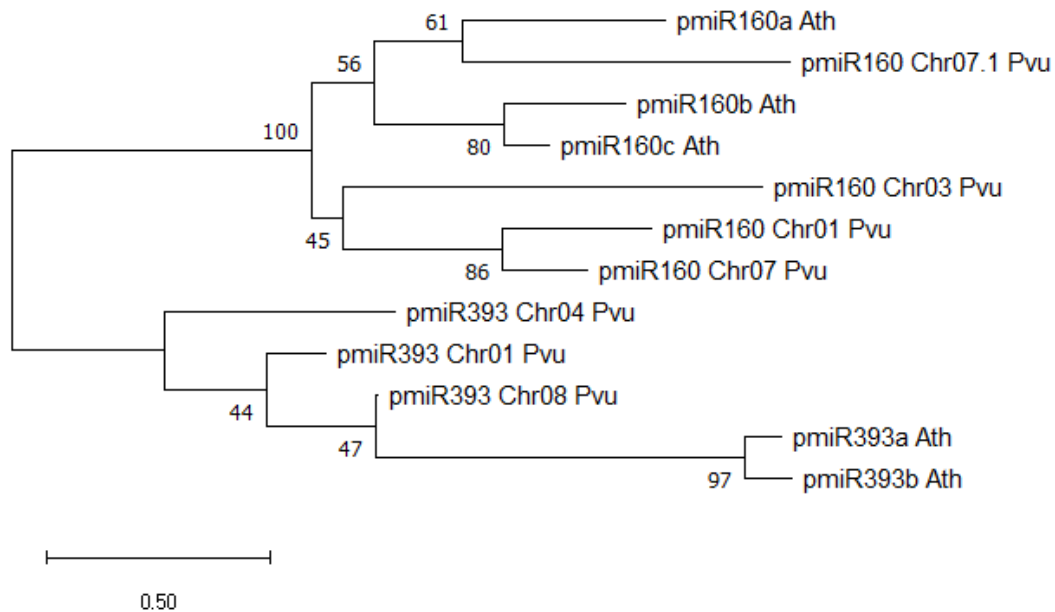


Figura 6. Dendrograma de secuencias nucleotídicas de los precursores (pmiRNAs) de las familias miR160 y miR393 en *Arabidopsis thaliana* (Ath) y *Phaseolus vulgaris* (Pvu). La reconstrucción filogenética se obtuvo utilizando el programa MEGA-X; máxima verosimilitud como método estadístico y como modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY). Los números en la base de la dicotomía de las ramas representan los valores de Bootstrap obtenidos después de 500 reiteraciones (normalizado a 100).

7.2 Identificación de los miPEPs generados por precursores de miR160 y miR393 y elección de candidatos para síntesis

7.2.1 Identificación de ORFs en los precursores de miRNAs en *A. thaliana*

En *A. thaliana* se obtuvieron 17 posibles marcos de lectura abiertos (ORF), a partir de los precursores de miR160a, miR160b y miR160c: 11 en pmiR160a, 3 en pmiR160b y 3 en pmiR160c (**Tabla 1**). De acuerdo con los 7 criterios considerados para la elección de candidatos a síntesis, el candidato elegido en el precursor de miR160a fue pmiR160a_ORF_M2O1, sumando 5 puntos en total. En el precursor de miR160b fue pmiR160b_ORF_M3O1 con 5 puntos y para el precursor de miR160c fue pmiR160c_ORF_M3O1, que también obtuvo una puntuación de 5.





Tabla 1. Matriz de puntuación con diferentes criterios para selección de marcos de lectura abiertos (ORFs) detectados en los precursores de miR160a (pmiR160a), miR160b (pmiR160b) y miR160c (pmiR160c) de *A. thaliana*. Los criterios cumplidos por cada ORF suman un punto al total.

Nombre del ORF	ORF con codón de paro*	Ubicación fuera del tallo-asa*	Primer ORF en el precursor	Reportado como predicción**	Probado experimentalmente**	Mejor score en la prueba con COUSIN	Mejor score de CAI (>E-CAI 95%)	Total
pmiR160a_ORF_M1O1	✓	✓				✓		3
pmiR160a_ORF_M1O2	✓	✓					✓	3
pmiR160a_ORF_M1O3	✓							1
pmiR160a_ORF_M1O4								0
pmiR160a_ORF_M2O1	✓	✓	✓	✓			✓	5
pmiR160a_ORF_M2O2								0
pmiR160a_ORF_M3O1	✓	✓					✓	3
pmiR160a_ORF_M3O2	✓	✓						2
pmiR160a_ORF_M3O3	✓							1
pmiR160a_ORF_M3O4	✓							1
pmiR160a_ORF_M3O5	✓							1
pmiR160b_ORF_M2O1	✓	✓						2
pmiR160b_ORF_M2O2	✓					✓		2
pmiR160b_ORF_M3O1	✓	✓	✓	✓	✓			5
pmiR160c_ORF_M1O1	✓					✓		2
pmiR160c_ORF_M3O1	✓	✓	✓	✓			✓	5
pmiR160c_ORF_M3O2	✓							1

Nota: M = Marco de lectura (1, 2 o 3), O = ORF.

*Criterios indispensables que deben cumplir los ORFs candidatos **Laressergues et al. 2015.





Con respecto a los ORFs detectados en los precursores de miR393a y miR393b en *A. thaliana*, sólo se obtuvieron tres: 1 en pmiR393a y 2 en pmiR393b. Sin embargo, ninguno de estos se localizaba fuera de la zona tallo-asa del precursor, además, todos presentaban ausencia de codón de paro. Dadas estas características, se descartaron como posibles miPEPs, por lo que no se aplicó el resto de los criterios de selección en ellos.

7.2.2 Identificación de ORFs en los precursores de miRNAs en *P. vulgaris*

Se encontraron un total de 39 ORFs a partir de los precursores de miR160 Chr 01, miR160 Chr 07, miR160 Chr 7.1 y miR160 Chr 03: 7 pertenecientes a pmiR160 Chr 01, 7 de pmiR160 Chr 07, 9 de pmiR160 Chr 7.1 y 16 de pmiR160 Chr 03 (**Tabla 2**).

De acuerdo con los criterios considerados para elección de candidatos a síntesis, el candidato para el precursor de miR160 Chr1 fue pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M2O1 con 5 puntos, en pmiR160 Chr7 hubo equivalencia de 4 puntos entre pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M1O1 y pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M3O1, mismo caso en pmiR160 Chr7.1 con pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O1 y pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O2. Por último, hubo equivalencia de 3 puntos entre cuatro candidatos de pmiR160 Chr3.

Tabla 2. Matriz de puntuación con los criterios para selección de marcos de lectura abiertos (ORFs) en los precursores de miR160 Chr 01, miR160 Chr 07, miR160 Chr 7.1 y miR160 Chr 03 de *P. vulgaris*. Los criterios cumplidos en cada ORF suman un punto al total.

Nombre del ORF	ORF con codón de paro*	Ubicación fuera del tallo-asa*	Primer ORF en el precursor	Reportado como predicción	Probado experimentalmente	Mejor score en la prueba con COUSIN	Mejor score de CAI (>E-CAI 95%)	Total
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M1O1	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M1O2								0





Nombre del ORF	ORF con codón de paro*	Ubicación fuera del tallo-asa*	Primer ORF en el precursor	Reportado como predicción	Probado experimentalmente	Mejor score en la prueba con <i>COUSIN</i>	Mejor score de CAI (>E-CAI 95%)	Total
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M2O1	✓	✓	✓			✓	✓	5
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M2O2	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M2O3								0
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M3O1	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr01_Pvu_ORF_M3O2	✓	✓						2
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M1O1	✓	✓	✓				✓	4
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M1O2	✓							1
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M1O3								0
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M2O1	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M2O2							✓	1
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M3O1	✓	✓				✓	✓	4
pmiR160_Chr07_Pvu_ORF_M3O2							✓	1
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M1O1	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M1O2	✓						✓	2





Nombre del ORF	ORF con codón de paro*	Ubicación fuera del tallo-asa*	Primer ORF en el precursor	Reportado como predicción	Probado experimentalmente	Mejor score en la prueba con COUSIN	Mejor score de CAI (>E-CAI 95%)	Total
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M2O1	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M2O2	✓							1
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O1	✓	✓	✓				✓	4
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O2	✓	✓				✓	✓	4
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O3	✓	✓						2
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O4	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr07_1_Pvu_ORF_M3O5								0
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M1O1	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M1O2	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M1O3	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M1O4	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M1O5	✓					✓		2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O1	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O2	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O3	✓	✓						2





Nombre del ORF	ORF con codón de paro*	Ubicación fuera del tallo-asa*	Primer ORF en el precursor	Reportado como predicción	Probado experimentalmente	Mejor score en la prueba con COUSIN	Mejor score de CAI (>E-CAI 95%)	Total
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O4	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O5	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O6	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M2O7	✓						✓	2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M3O1	✓	✓	✓					3
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M3O2	✓	✓						2
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M3O3	✓	✓					✓	3
pmiR160_Chr03_Pvu_ORF_M3O4	✓							1

Nota: M = Marco de lectura (1, 2 o 3), O = ORF.

*Criterios indispensables que deben cumplir los ORFs candidatos

En los tres precursores miR393, se identificaron un total de 4 ORFs: 1 perteneciente a pmiR393 Chr 04, 1 de pmiR393 Chr 01 y 2 de pmiR393 Chr 08. Todos los ORFs se localizaron dentro de la zona tallo-asa del precursor y sólo uno de ellos contaba con un codón de paro, por lo cual descartamos que alguno de ellos fuera un péptido funcional y por ello no les fueron aplicados el resto de los criterios para selección.

7.3 Conservación peptídica en secuencias de ORFs

Dado que a pesar de los criterios aplicados para la selección de candidatos aún contábamos con 12 ORFs, fue necesario llevar a cabo otro tipo de análisis para tener más certeza sobre los péptidos a sintetizar. La búsqueda de conservación en estas secuencias peptídicas a través de un alineamiento podía brindarnos información





sobre la función ya que, un alto nivel de similitud en las secuencias podría significar que hubo una presión de selección para mantener el péptido.

Con el propósito de evaluar si los ORFs generados presentaban algún grado de conservación en sus secuencias se generó un dendrograma con las 35 secuencias de ORFs que cumplieran con los criterios indispensables (**Figura 7**). Dos de las secuencias fueron descartadas por el programa durante el alineamiento (pre-miR160 Chr 03 M2O5 y pre-miR160 Chr 01 M2O1) probablemente debido a que son ORFs de tamaño reducido y no brindan suficiente información para ser alineados de manera consistente con el resto de las secuencias.

Notamos que, desde las ramas más basales del árbol, no existe soporte en las relaciones formadas (Bootstrap = 0), sólo hay valores de soporte asociados a las ramas terminales. En general, es posible que no existan regiones peptídicas conservadas entre las secuencias presentadas.

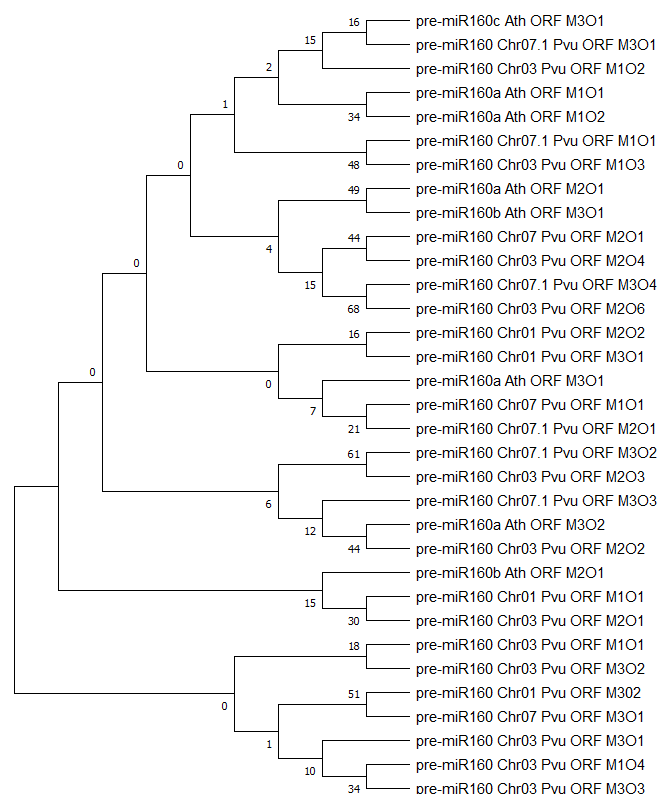


Figura 7. Dendrograma que agrupa las secuencias peptídicas de los ORFs seleccionados en ambas especies de plantas. Los números en la base de la dicotomía de las ramas representan los valores de Bootstrap obtenidos después de 500 reiteraciones.





7.4 Aplicación de miPEPs sintéticos

Con la información obtenida a partir del análisis de filogenia de precursores, de ORFs y de las matrices de puntuación, se determinó probar en *A. thaliana* el miPEP160a M2O1 y el miPEP160b M3O1 durante la enfermedad del moho gris. Para *P. vulgaris*, se evaluó el efecto de miPEP160 7.1 M3O1 y el miPEP160 7.1 M3O2 en la simbiosis fijadora de nitrógeno. Por convención, a este último miPEP de *P. vulgaris* se le denominará miPEP160 7.1 ORF2.

7.4.1 Efecto de miPEP160a y miPEP160b en la enfermedad del moho gris

Para evaluar el efecto de miPEP160a y miPEP160b en la enfermedad del moho gris, se asperjaron plantas de *A. thaliana* de 4 semanas post-germinación con los miPEPs a una concentración 0.1 μ M. 24 horas después, estas plantas fueron infectadas con esporas de *B. cinerea*. Finalmente, a las 72 horas post-infección, se calculó la incidencia y el área de lesión. La incidencia de infección en hojas de *A. thaliana* se definió como la relación entre el número de hojas que desarrollaron síntomas de infección y el número de hojas totales por planta infectadas por *B. cinerea*. Se observa que la incidencia de infección cuando se aplica el miPEP160a no difiere significativamente de la incidencia resultante al aplicar su control *scrambled* (scr) (**Figura 8B**).

Por otro lado, para evaluar si el área de lesión por el hongo se modifica al aplicar el miPEP160a en las hojas, se midió el área afectada con el programa *Image j*. Como resultado, observamos que el área de lesión cuando se aplica el miPEP160a no cambia de manera significativa en comparación con el área de lesión en las plantas en las que se aplicó el control *scrambled*.(scr) (**Figura 8A, C**)



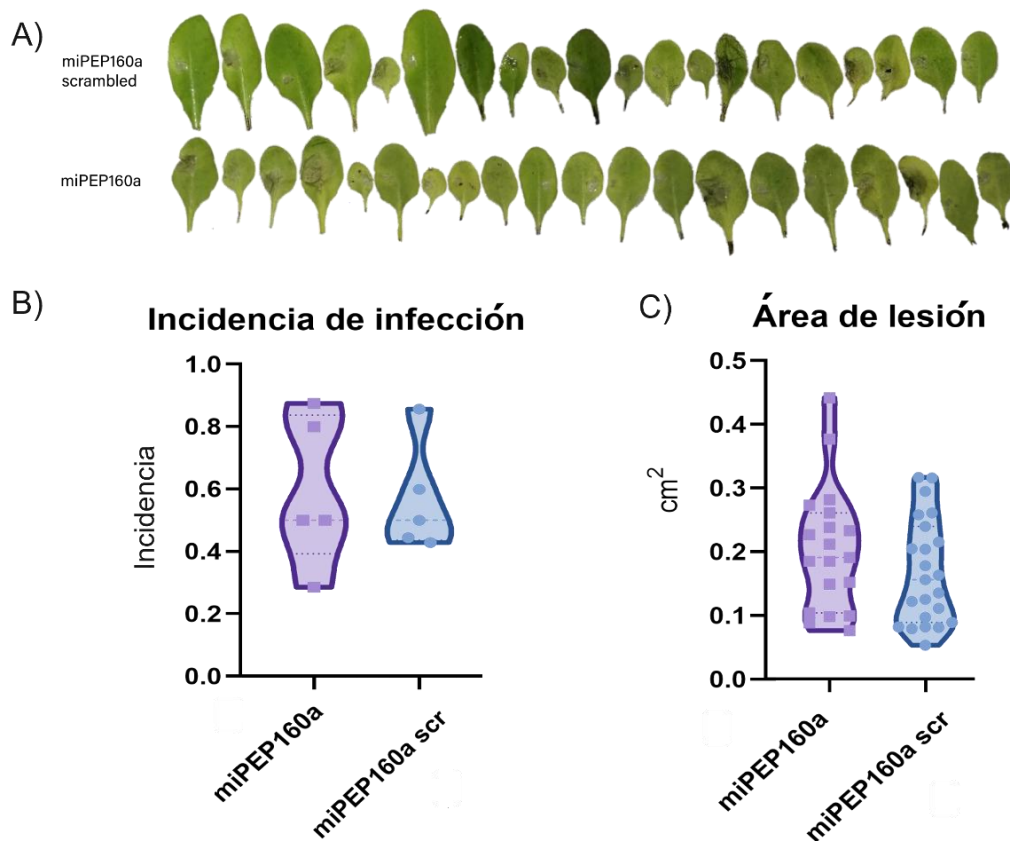


Figura 8. Fenotipo de la enfermedad del moho gris al aplicar el miPEP160a y su control *scrambled* (scr). **A)** Imágenes representativas de las lesiones causadas 72 h después de la infección con *B. cinerea* en hojas de *A. thaliana* previamente tratadas con los péptidos respectivos. Gráficas de violín con puntos que muestran **B)** la incidencia de infección y **C)** el área de lesión aplicando el miPEP160a y su control *scrambled* (scr). Cada punto representa el valor de cada uno de los datos obtenidos. De acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$), no hay diferencia significativa entre los grupos tratamiento y control (**B** y **C**).

También, se realizaron pruebas de incidencia y área de lesión con el miPEP160b. A continuación, podemos observar que no hay diferencia en la incidencia de infección entre las plantas a las que se les aplicó el miPEP y las hojas a las que les fue aplicado el control *scrambled* (**Figura 9B**). Cabe destacar, que el área de lesión al aplicar el miPEP160b disminuye significativamente a comparación del control *scrambled* (scr) ($\alpha=0.05$) (**Figura 9A, C**).



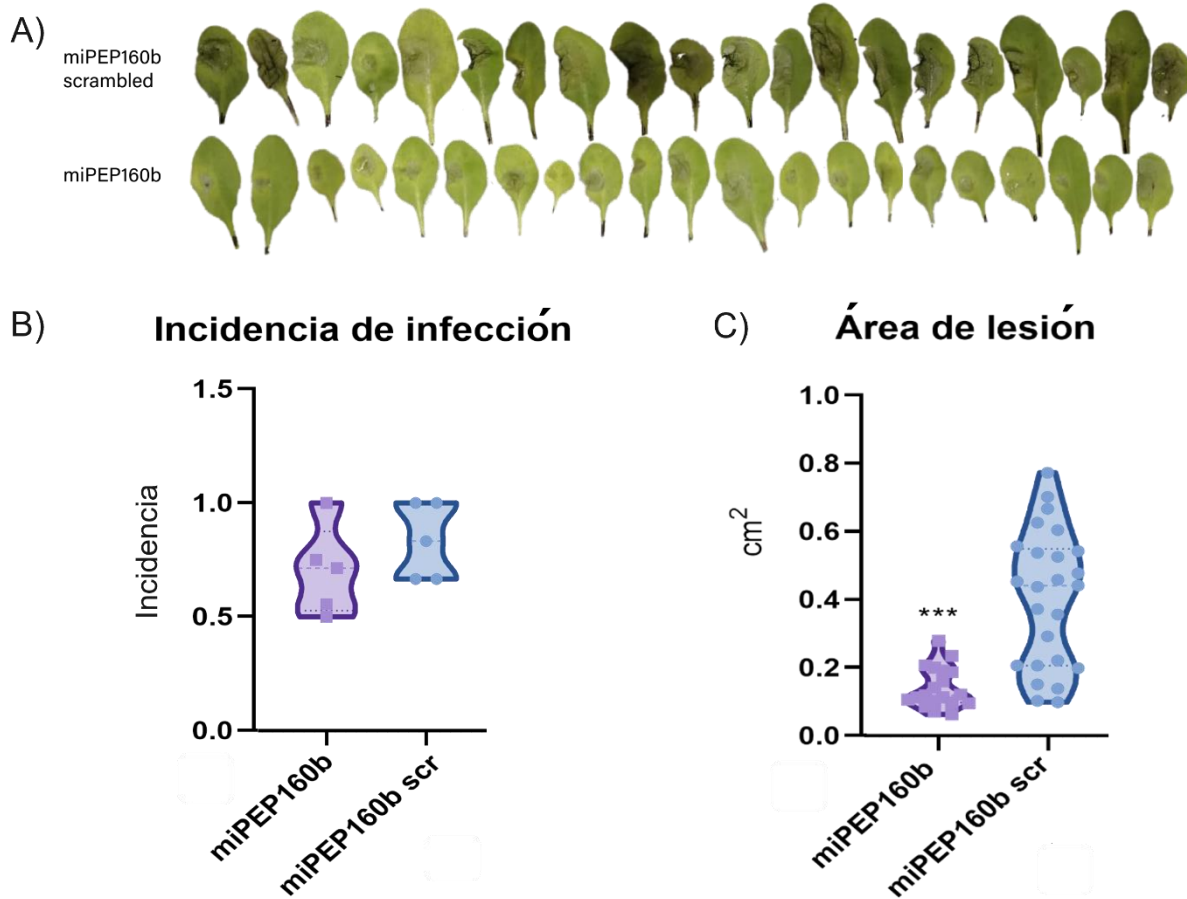


Figura 9. Fenotipo de la enfermedad del moho gris al aplicar el miPEP160b y su control *scrambled* (scr). **A)** Imágenes representativas de las lesiones causadas por *B. cinerea* en las hojas de *A. thaliana*. Gráficas de violín con puntos que muestran **B)** la incidencia de infección y **C)** el área de lesión aplicando el miPEP160b y su control *scrambled* (scr). Cada punto representa el valor de cada uno de los datos obtenidos. De acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$) no hay diferencia significativa entre los grupos tratamiento y control para la incidencia, mientras que la diferencia es significativa entre los grupos tratamiento y control para el área de lesión ($\alpha=0.001$) (**C**). Los asteriscos indican un valor p inferior a 0.001.

7.4.2 Acumulación de miR160, pmiRNAs y transcritos blanco en la enfermedad del moho gris

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, se ha reportado que los miPEPs tienen la capacidad de promover la transcripción de su precursor, permitiendo a su vez una mayor acumulación del miRNA maduro y, por lo tanto, un silenciamiento mejorado del transcrito blanco. Para determinar si el tratamiento con miPEP160a y miPEP160b en hojas de *A. thaliana* infectadas por *B. cinerea* tenía un efecto en la





acumulación de su miRNA, pmiRNA y transcritos blanco (*ARF10* y *ARF16*) se realizaron ensayos de qRT-PCR para medir la abundancia relativa de estos RNAs.

Los resultados mostraron que la aplicación del miPEP160a no influyó en el nivel de abundancia de miR160 (**Figura 10A**). A su vez, se evaluó la abundancia de miR164a, un miRNA que tiene como blancos, genes que codifican para factores de transcripción de la familia NAC (TAIR, 2021). Se eligió medir este miRNA ya que sabemos que no tiene relación alguna con la abundancia de miR160 y así poder probar si la acción que ejerce el miPEP160 es específica para miR160. La abundancia relativa de miR164a en presencia del miPEP160a no se modifica de manera significativa comparándola con el control (**Figura 10B**).

Por otro lado, también se evaluó si los precursores de miR160 (pmiR160a y pmiR160b) se veían afectados en su abundancia relativa con la aplicación del miPEP160a. Observamos que la abundancia de los precursores pmiR160a y pmiR160b durante cada condición, no es significativamente distinta de la abundancia que se obtuvo en los respectivos controles (**Figura 10C-D**).

Por último, analizamos la abundancia de los transcritos blanco de miR160: *ARF10* y *ARF16* buscando una relación con la abundancia de los RNAs ya mencionados. Encontramos que la abundancia de transcritos *ARF10* y *ARF16* después del tratamiento con el miPEP160a no es diferente de manera significativa de las mediciones correspondientes aplicando el tratamiento control (**Figura 10E-F**).



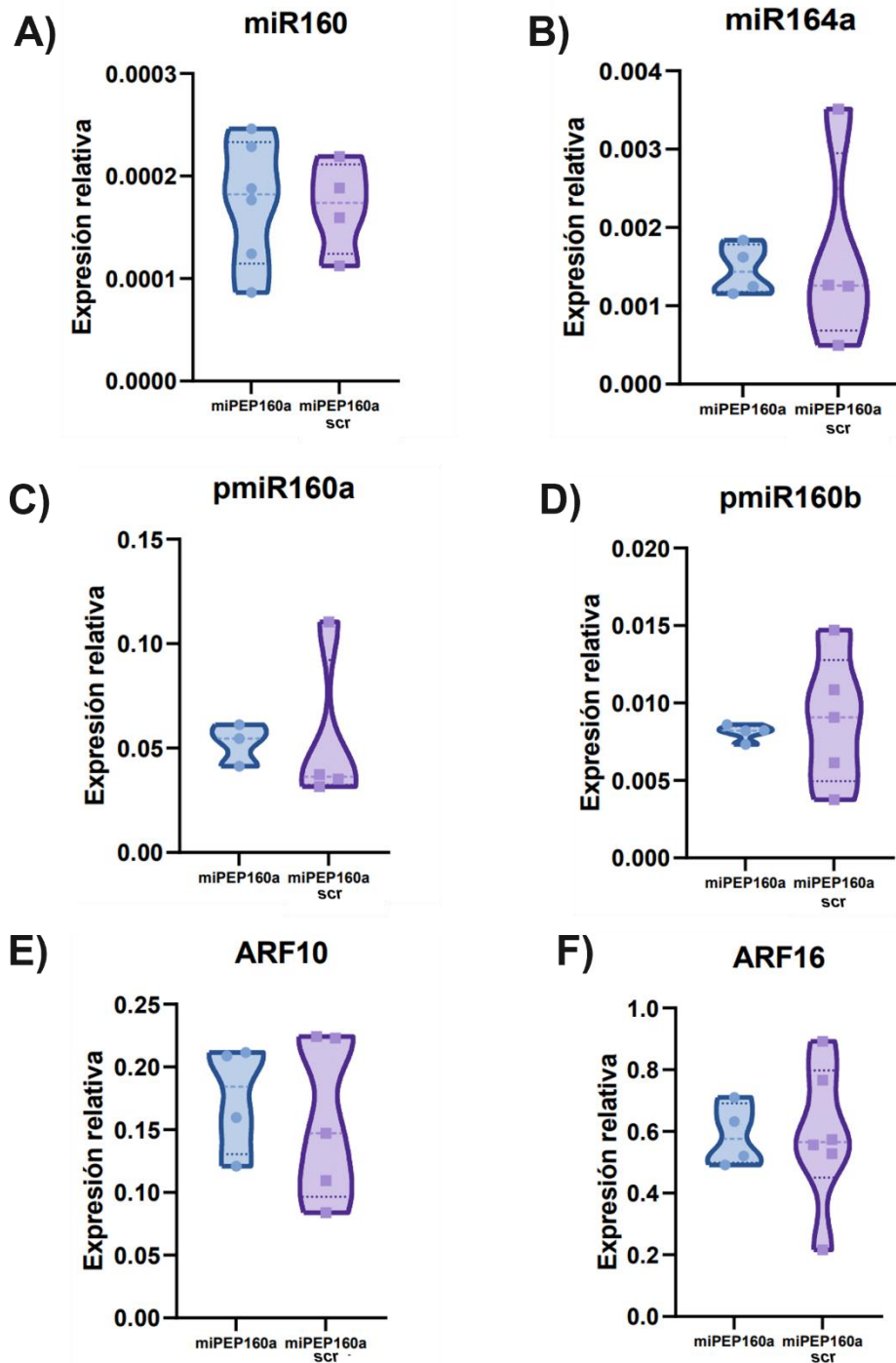


Figura 10. Abundancia relativa de miR160, miR164a, pmiRNAs y blancos en hojas de *A. thaliana* colectadas 12 horas después de su aspersión con esporas de *B. cinerea* y previo a la infección, asperjadas con miPEP160a y su control. Gráficas de violín con puntos que muestran **A)** La abundancia relativa de miR160 al aplicar el miPEP160a y su control *scrambled* (scr). **B)** Abundancia relativa de miR164a al aplicar miPEP160a y su control *scrambled*. Abundancia relativa de **C)** pmiR160a y **D)** pmiR160b al aplicar el miPEP160a y su control *scrambled*. Abundancia relativa de los transcritos blanco **E)** *ARF10* y **F)** *ARF16* al





aplicar el miPEP160a y su control *scrambled*. Cada punto en la gráfica representa el valor obtenido en una réplica técnica, el número de réplicas biológicas es igual a 3. La diferencia en el nivel de abundancia entre tratamiento y control para cada caso no es significativa de acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$). Los genes de referencia utilizados para la normalización en el análisis fueron U6 para miR160 y miR164a, CF-150 y UBQ10 para precursores y blancos.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la aplicación del miPEP160b sobre la abundancia de miR160, pmiRNAs y transcritos blanco, siguiendo el mismo procedimiento utilizado al evaluar el miPEP160a.

Se observó que la variabilidad en los datos obtenidos en el tratamiento con el miPEP160b control no permite visualizar si existe una tendencia en la abundancia de miR160 al aplicar el miPEP160b (**Figura 11A**). Los datos de abundancia en miR164a en general tienen valores similares ya sea durante la aplicación de miPEP160b o su control. (**Figura 11B**). No hay diferencia significativa en la abundancia de miR160 y miR164a entre grupos tratamiento y control.

En cuanto a la abundancia de los precursores pmiR160a y pmiR160b hubo una tendencia a la baja en ambos durante la aplicación del miPEP160b en comparación con los respectivos controles (**Figura 11C-D**), la prueba estadística utilizada mostró que esta diferencia en la abundancia no es significativa.

Por último, para ambos transcritos blanco *ARF10* y *ARF16* se detectó una disminución en la abundancia cuando aplicamos el miPEP160b (**Figura 11E-F**), tendencia similar a la de los pmiRNAs. La diferencia entre tratamiento y control para ambos casos no es estadísticamente significativa.



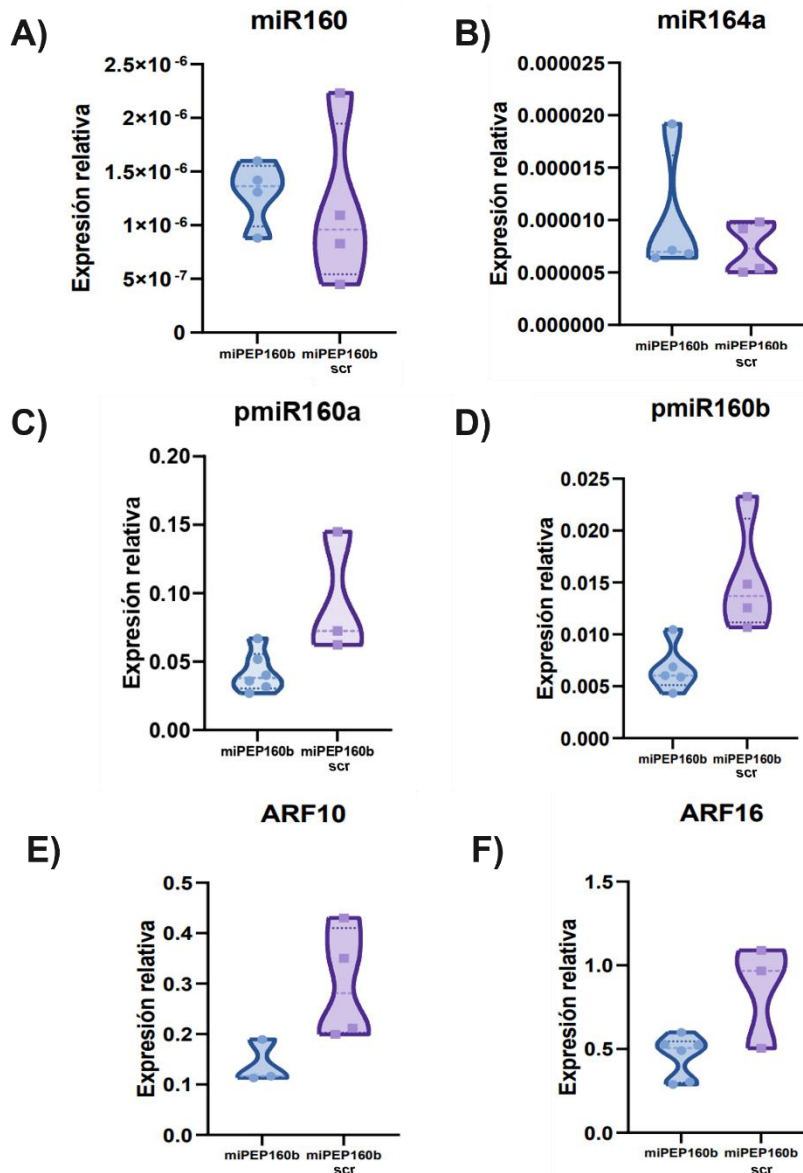


Figura 11. Acumulación relativa de miR160, miR164a, pmiRNAs y blancos en hojas de *A. thaliana* colectadas 12 horas después de su aspersión con esporas de *B. cinerea* y previo a la infección, asperjadas con miPEP160b y su control. Gráficas de violín con puntos que muestran **A)** La abundancia relativa de miR160 al aplicar el miPEP160b y su control *scrambled* (scr). **B)** Abundancia relativa de miR164a al aplicar miPEP160b y su control *scrambled*. Abundancia relativa de **C)** pmiR160a y **D)** pmiR160b al aplicar el miPEP160b y su control *scrambled*. Abundancia relativa de los blancos **E)** *ARF10* y **F)** *ARF16* al aplicar el miPEP160b y su control *scrambled*. Cada punto en la gráfica representa el valor obtenido en una réplica técnica, el número de réplicas biológicas es igual a 3. La diferencia en el nivel de abundancia entre tratamiento y control para cada caso no es significativa de acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$). Los genes de referencia utilizados para la





normalización en el análisis fueron U6 para miR160 y miR164a, CF-150 y UBQ10 para precursores y blancos.

7.4.3 Efecto de miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 en la simbiosis *P. vulgaris* - *R. etli*

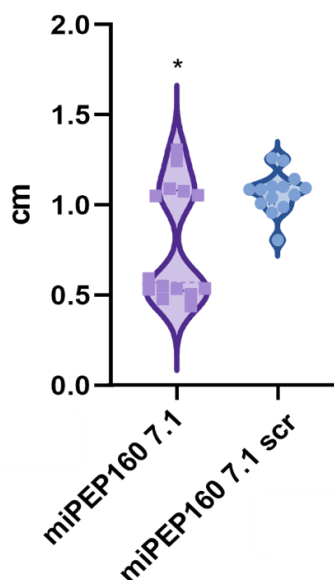
Para conocer el efecto de los micropéptidos miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 en la interacción simbiótica de *P. vulgaris* con *R. etli*, estos péptidos y sus respectivos controles *scrambled* (scr) se incorporaron en el riego de las plantas inoculadas con dichas bacterias durante 21 días. Las características que se evaluaron al terminar los tiempos de aplicación del miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 fueron:

- El número de nódulos y su perímetro.
- La actividad de la enzima nitrogenasa por planta y por peso de nódulos.

Detectamos que, el perímetro de los nódulos al aplicar el miPEP160 7.1 fue menor en comparación con el perímetro de los nódulos a los que les fue aplicado el péptido control *scrambled* (**Figura 12A-B**), esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Por otro lado, el número de nódulos al aplicar el miPEP160 7.1 no es significativamente distinto del número de nódulos encontrados en las plantas a las cuales se les aplicó el miPEP control (**Figura 12C**).



B) Perímetro de nódulos



C) Número de nódulos

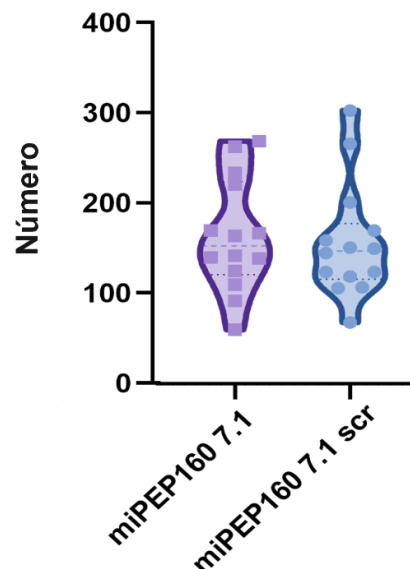




Figura 12. Fenotipo de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* y *R. etli* al aplicar el miPEP160 7.1 y su control *scrambled* (scr). Los péptidos (concentración 0.1 μ M) se regaron en las raíces de las plantas inoculadas con *R. etli*. **A)** Apariencia de 22 nódulos aleatorios (por condición) de una planta representativa del promedio de la condición. Gráficas de violín con puntos que muestran **B)** El perímetro de los nódulos y **C)** El número de nódulos observados al aplicar el miPEP160 7.1 y su control *scrambled* (scr). Cada punto representa el valor de cada dato obtenido. De acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$) la diferencia entre los grupos tratamiento y control es significativa para el perímetro de los nódulos. Por otro lado, no hay diferencia significativa en el número de nódulos entre ambas condiciones. El asterisco indica un valor p inferior o igual a 0.05.

Sabiendo que la enzima nitrogenasa es capaz de reducir acetileno en etileno, utilizamos esta propiedad como método indirecto para medir su actividad. De esta manera, notamos que la actividad de la nitrogenasa por planta y su actividad con respecto al peso (g) de los nódulos (actividad por planta/peso seco en gramos) es significativamente mayor cuando aplicamos el miPEP160 7.1 que al aplicar su control (Figura 13).

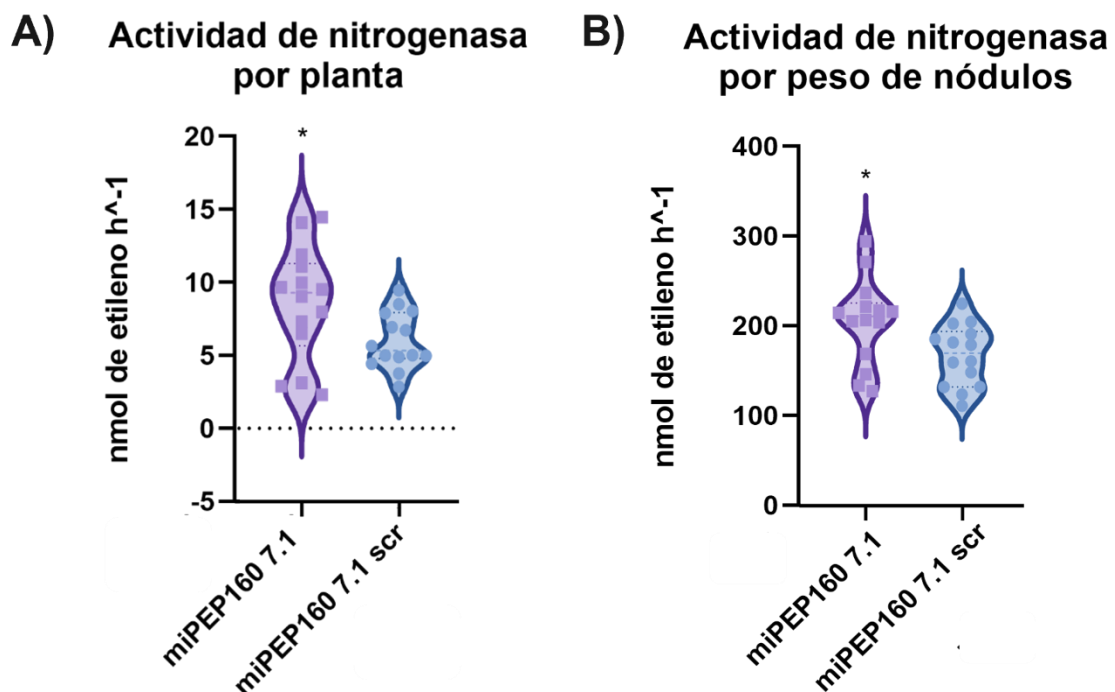


Figura 13. Actividad indirecta de la enzima nitrogenasa **A)** por planta o **B)** por peso de nódulos, aplicando el miPEP160 7.1 y su control *scrambled* (scr). La diferencia en la actividad





de la enzima entre tratamiento y control es estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$). El asterisco indica un valor p inferior o igual a 0.05.

Posteriormente, se evaluaron las características fenotípicas en las plantas a las que les fueron aplicados el miPEP160 7.1 ORF2 y su control *scrambled*. Primero, el perímetro de los nódulos no cambió significativamente al aplicar el miPEP160 7.1 ORF2, tal como podemos observar en la **Figura 14A**. De igual manera, tampoco se observó una diferencia significativa entre el número de nódulos obtenidos en ambas condiciones (**Figura 14B**). En este caso, no se presentan las fotografías de los nódulos, ya que éstas eran de baja calidad.

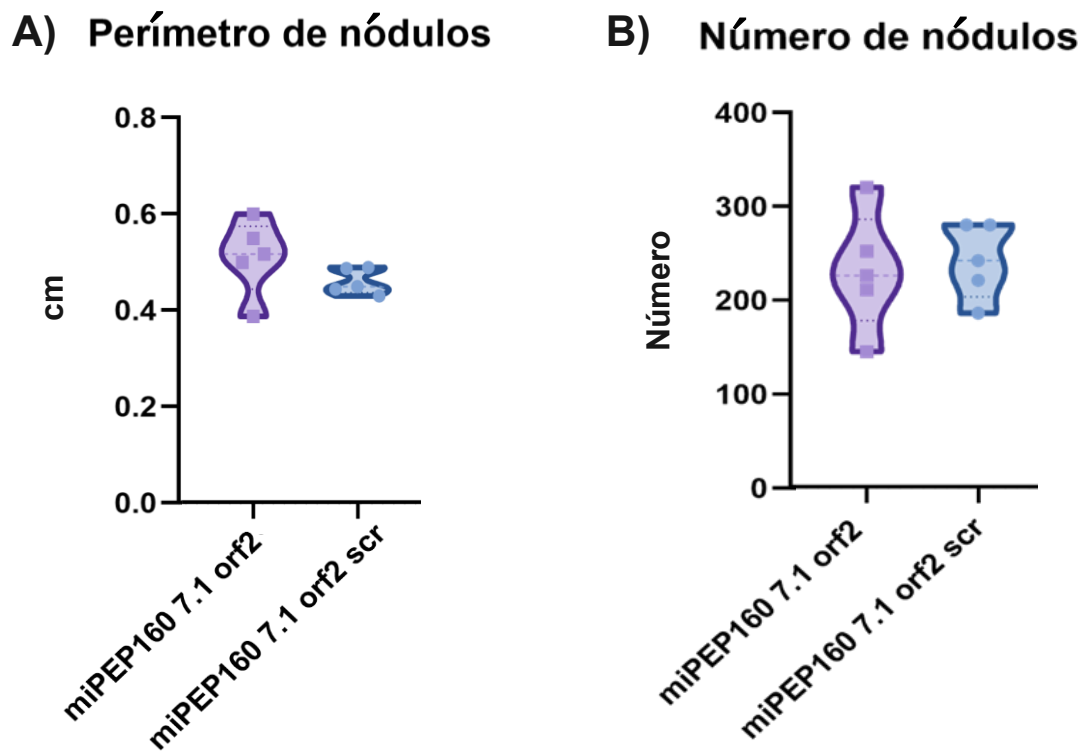


Figura 14. Fenotipo de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* y *R. etli* al aplicar el miPEP160 7.1 ORF2 y su control *scrambled* (scr). Los péptidos (concentración 0.1 μ M) se aplicaron en el riego de las plantas inoculadas con *R. etli*. Gráficas de violín con puntos que muestran **A)** El perímetro de los nódulos y **B)** El número de nódulos observados al aplicar el miPEP160 7.1 ORF2 y su control *scrambled* (scr). Cada punto representa el valor de cada dato obtenido. De acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$) la diferencia entre los grupos tratamiento y control no es significativa en la evaluación de ambas características.





Asimismo, no se detectaron diferencias significativas entre condiciones en la actividad de la enzima nitrogenasa medida tanto por planta (**Figura 15A**) como respecto al peso de los nódulos (**Figura 15B**).

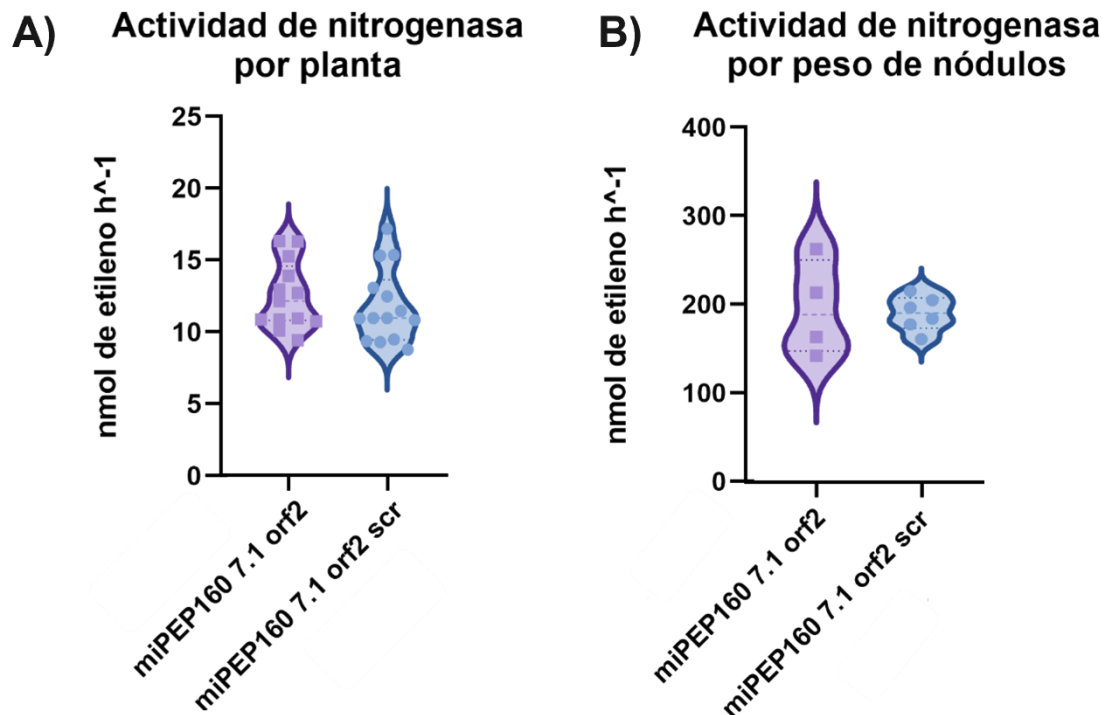


Figura 15. Actividad indirecta de la enzima nitrogenasa **A)** por planta o **B)** por peso de nódulos, aplicando el miPEP160 7.1 ORF2 y su control *scrambled* (scr). La diferencia en la actividad de la enzima entre tratamiento y control no es estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$).

7.4.4 Acumulación de miR160, pmiRNAs y blancos en la simbiosis *P. vulgaris* - *R. etli*

Debido a que no detectamos un cambio significativo en el fenotipo simbiótico de *P. vulgaris* con *R. etli* al aplicar el miPEP160 7.1 ORF2, únicamente llevamos a cabo ensayos de qRT-PCR en las plantas a las que les fue aplicado el miPEP160 7.1 y su control. El miPEP160 7.1 proviene del primer marco de lectura del precursor miR160 7.1, mientras que el miPEP160 7.1 ORF2 proviene del segundo marco de lectura abierto en este mismo precursor.





Los análisis de qRT-PCR se llevaron a cabo para medir la abundancia relativa de miR160, pmiRNAs y transcritos blanco en las raíces noduladas de *P. vulgaris* tratadas con miPEP160 7.1 y su control *scrambled* respectivamente. Se encontró que hubo una tendencia a una mayor abundancia de miR160 en el tratamiento con el péptido miPEP160 7.1. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 16A**). Medimos también la abundancia relativa de miR164a después del tratamiento con miPEP160 7.1 y su control y encontramos que la diferencia no es estadísticamente significativa (**Figura 16B**).

Con respecto a los precursores de miR160, la abundancia relativa de pmiR160a y pmiR160b cuando se aplicó miPEP160 7.1 no fue significativamente distinta de la abundancia de dichos precursores en sus respectivos controles (**Figura 16C-D**).

Finalmente, analizamos la abundancia de los transcritos blanco *ARF10* y *ARF17* al aplicar el péptido. En ambos casos observamos una menor abundancia de los blancos cuando fue aplicado miPEP160 7.1 en comparación con el control. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa (**Figura 16E-F**).



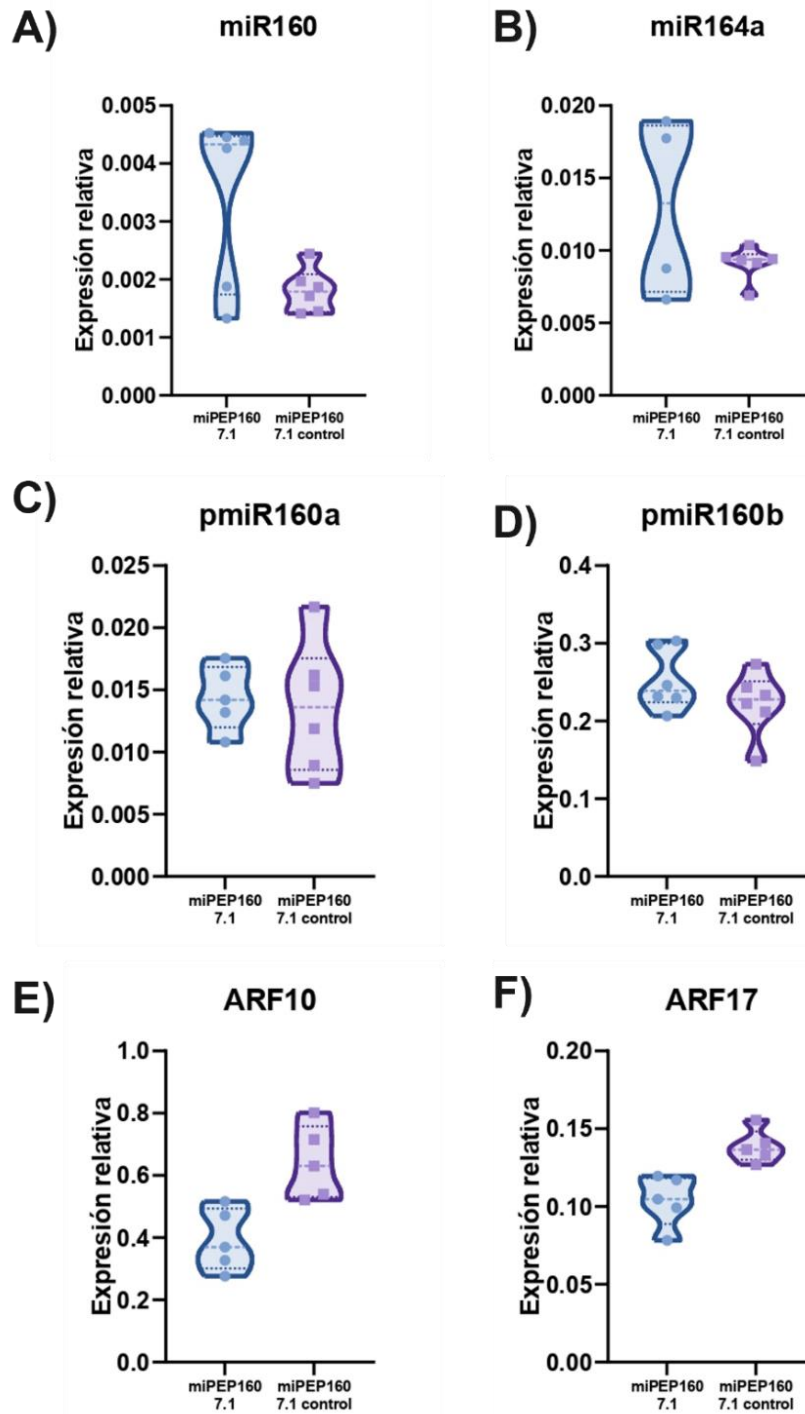


Figura 16. Acumulación de miR160, miR164a, pmiRNAs y blancos (*ARF10* y *ARF 17*) en las raíces noduladas de *P. vulgaris* al aplicar el miPEP160 7.1 y su control *scrambled* (scr). Gráficas de violín con puntos que muestran **A)** La abundancia relativa de miR160 al aplicar el miPEP160 7.1 y su control *scrambled*. **B)** abundancia relativa de miR164a al aplicar el miPEP160 7.1 y su control *scrambled*. Abundancia relativa de los precursores **C)** pmiR160a y **D)** pmiR160b. Abundancia relativa de los blancos **E)** ARF10 y **F)** ARF17. Cada punto en la





gráfica representa el valor obtenido en una réplica técnica, el número de réplicas biológicas es igual a 3. La diferencia en el nivel de abundancia entre tratamiento y control para cada caso, no es significativa de acuerdo con la prueba estadística U de Mann-Whitney ($\alpha=0.05$). Los genes de para la normalización en el análisis fueron U6 para miR160 y miR164a, UBQ9 y HSP para precursores y blancos.

8. Discusión

Mediante la búsqueda de precursores encontramos en total 12 secuencias precursoras de miRNA (pmiRNAs) de miR160 y miR393 de las especies *A. thaliana* y *P. vulgaris*. A través de la predicción *in silico* de miPEPs en ORFs de estos precursores, seleccionamos 4 miPEPs para su aplicación exógena. Identificamos si los miPEPs 160a, b, 7.1 y 7.1 ORF2 pueden tener actividad regulatoria en las interacciones planta-microorganismo, específicamente en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* - *R. etli* y la enfermedad del moho gris.

8.1 Conservación de precursores

Encontramos que, en nuestra reconstrucción filogenética, todas las secuencias precursoras de miR160 forman un clado estrechamente relacionado y separado de las secuencias precursoras de miR393. En un estudio, se había determinado que miR160 es un miRNA conservado en plantas, ya que está presente desde el musgo *Physcomitrella patens* hasta las plantas angiospermas, entre ellas *A. thaliana* (Axtell *et al.*, 2007). Dicha conservación del miRNA podría estar relacionada con lo que encontramos en los precursores de miR160, ya que también guardan una estrecha relación en su secuencia nucleotídica (Bootstrap =100).

Dentro del grupo pmiR160, observamos que las secuencias pmiR160b y pmiR160c se agrupan en el mismo clado, mientras que pmiR160a está en el clado hermano. En el análisis filogenético realizado por Liu y cols. (2010) utilizando las secuencias talloasa de miR160 en *A. thaliana*, también llegaron a resultados similares. Recientemente, Singh & Singh (2021) reportaron hallazgos parecidos al evaluar 468 secuencias de miR160 de plantas terrestres, proponiendo por medio de análisis adicionales que miR160a es el ancestro del cual se originaron miR160b y miR160c. Por otro lado, notamos que, en nuestra reconstrucción, la secuencia pmiR160 Chr 7.1





de *P. vulgaris* no se localiza en la reconstrucción con otras secuencias pmiR160 de su misma especie, e incluso se encuentra en el clado hermano de pmiR160a de *A. thaliana*, esto puede sugerir eventos parecidos a los reportados sobre miR160a, b y c de *A. thaliana*. Los precursores pmiR160 Chr 03, Chr 01 y Chr 07 podrían haberse originado a partir de eventos de duplicación de pmiR160 Chr 7.1.

Los precursores pmiR393 también se encuentran formando un grupo dentro de la reconstrucción. Sin embargo, el valor de soporte del nodo es bajo. Esto puede relacionarse con la presencia de *indels* en las secuencias nucleotídicas recabadas. En un análisis realizado en las secuencias de pri-miRNA de *M. truncatula*, se encontró que las regiones más variables en el precursor son la región del promotor y la región 3' del pri-miRNA, mientras que el miRNA y su complementario miRNA* están altamente conservados (Lauressergues *et al.*, 2015), por lo que esperaríamos encontrar que las secuencias precursoras de miR393 formaran una agrupación con mayor soporte gracias a la conservación de este fragmento. No obstante, aunque comúnmente la región del miRNA sea la más conservada dentro del precursor por la presión de selección sobre el miRNA, la conservación general de los miRNAs no es una regla. Actualmente su dinámica evolutiva sigue en discusión, porque si bien hay miRNAs conservados en las embriofitas (Fahlgren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2021), existen otros casos donde incluso entre especies íntimamente relacionadas como *A. thaliana* y *A. lyrata* no hay miRNomas “altamente superpuestos” (Fahlgren *et al.*, 2010 citado por Chávez, R., *et al.*, 2014 pp. 2).

El caso de miR393 es particular, ya que un estudio comparativo de RNAs pequeños de 31 especies de plantas se encontró que, aunque miR393 estaba presente en todos los linajes de plantas, presentaba variaciones en sus características estructurales como tamaño y cambios posicionales en los diferentes grupos (Chávez *et al.*, 2014). Podemos inferir que la falta de sustento en el grupo de precursores de miR393 es debida a la variabilidad en la secuencia más conservada del precursor que es el miRNA.





8.2 Identificación y conservación de ORFs

Analizando la presencia de ORFs dentro de los precursores de miR393, encontramos que además de ser muy escasos (ver **anexo**), éstos no cumplían con los criterios indispensables para considerar que realmente fuesen péptidos funcionales. Si conjuntamos la información de los ORFs con la relación de los pmiR393 en la reconstrucción filogenética de los precursores, podemos suponer que no se generan miPEPs funcionales al menos en estas especies de plantas. Esto puede deberse al estado evolutivo actual del precursor donde no se ha seleccionado un péptido que lo regule.

No obstante, en el trabajo realizado por Ormancey y cols. (2021) sobre identificación de miPEPs en *A. thaliana*, probaron un miPEP potencial inferido de la secuencia del precursor de miR393b (miPEP393b) que modula a la baja el crecimiento de las raíces. No obstante, entre los miPEPs probados éste no tuvo un efecto contrastante en el desarrollo de la raíz comparado con el control. En este caso no fue posible indagar más sobre el miPEP393b ya que en el trabajo no se reporta la secuencia de los miPEPs probados. Es posible que usaran otras secuencias precursoras derivadas de sus diferentes análisis, particularmente la 5'RACE que permite la caracterización de los extremos 5' de los transcritos. Para entender mejor lo que ocurre con los miPEPs provenientes de miR393 sería necesario realizar otros análisis para corroborar los resultados de este trabajo o bien los resultados reportados en la literatura.

Por otro lado, en los precursores de los miR160 de *A. thaliana* y *P. vulgaris*, logramos encontrar posibles ORFs que potencialmente codifican para miPEPs; 17 ORFs en *A. thaliana* y 39 en *P. vulgaris*. Al obtener una gran cantidad de candidatos, fue necesario establecer varios criterios de selección para quedarnos sólo con unos cuantos para ser aplicados *in vivo*. Además de los criterios indispensables, sobre todo tomamos en cuenta el primer ORF presente en la parte 5' del precursor, ya que en varios artículos se detectó por medio de diferentes ensayos que dicho ORF es el que genera un péptido funcional con efecto sobre la transcripción del precursor (Chen *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020; Laressergues *et al.*, 2015).





También tomamos en cuenta las relaciones encontradas en la reconstrucción filogenética de los precursores y la conservación de ORFs. En la primera, vimos que pmiR160a de *A. thaliana* y pmiR160 7.1 de *P. vulgaris* estaban más relacionados, seguidos de pmiR160b y c de *A. thaliana*. En el análisis de conservación, observamos que no se refleja un patrón de conservación notorio entre los diferentes ORFs encontrados en los precursores. Sin embargo, pudimos notar que los ORFs pmiR160a M2O1 y pmiR160b M3O1 tienen un cierto grado de similitud entre ellos (valor de soporte = 49) y pmiR160 7.1 M3O1 aparece más relacionado a un ORF de *A. thaliana*. Con todos estos elementos, consideramos que los ORFs señalados serían los mejores candidatos para aplicación.

8.3 Aplicación de miPEPs sintéticos y análisis de su efecto en la simbiosis *P. vulgaris* - *R. etli* y la enfermedad del moho gris

8.3.1 Análisis del efecto de miPEP160a y miPEP160b en la enfermedad del moho gris

En este trabajo, no fue detectado un efecto por parte del miPEP160a en el fenotipo ni en la abundancia de transcritos y miR160a después de la infección de *B. cinerea* en *A. thaliana*. Sin embargo, la aplicación del miPEP160b resultó en un cambio significativo del área de lesión generada por el hongo: después de la aplicación del miPEP160b había una menor lesión en las hojas, sin alterar la incidencia.

Si bien en los análisis de abundancia derivados del tratamiento miPEP160b la variabilidad en los datos obtenidos no permite visualizar si existe una diferencia significativa en la abundancia de miR160b, se observó que existe una disminución de la abundancia de sus blancos *ARF10* y *ARF16*, similar al efecto documentado en otros miPEPs sobre sus transcritos blanco, como miPEP165a, que a mayor concentración, la abundancia de sus transcritos blanco *PHAVOLUTA* (*PHV*), *PHABULOSA* (*PHB*) y *REVOLUTA* (*REV*) es menor (Lauressergues *et al.*, 2015) o miPEP172c, que disminuye la abundancia de su transcrito blanco *NNC1* (Couzigou *et al.*, 2016). Sobre los precursores evaluados, se esperaba encontrar una mayor abundancia de pmiR160b derivado de la aplicación de miPEP160b. Sin embargo, la abundancia fue menor en comparación con su control *scrambled*. Un trabajo reciente encontró que existen otras formas de procesamiento para los precursores de miRNAs, donde





poblaciones de transcritos precursores pueden no contener el miRNA y miRNA*, y en su lugar estar conformados por la secuencia que contiene el miORF, o incluso pueden estar empalmados alternativamente (Lauressergues *et al.*, 2022). Si tales poblaciones existen para el precursor miR160b, podría existir una fuga importante de transcritos durante la detección realizada en este trabajo, ya que, al momento de hacer los análisis, nos enfocamos en detectar el precursor convencional (Precursor mínimo del extremo 5' lo más cercano al miRNA sin tomar en cuenta los ORFs).

Sobre el efecto de miPEP160b en el área de lesión, se ha reportado mediante secuenciación profunda de miRNAs que miR160 puede ser regulado al alza en presencia de patógenos bacterianos (Fahlgren *et al.*, 2007). A su vez, se ha descrito el papel de miR160 en la deposición de calosa ante el tratamiento de *A. thaliana* con flg22 por medio del silenciamiento de sus transcritos blanco *ARFs*, indicando un aumento en la deposición de calosa inducido por PAMP (Li *et al.*, 2010). El depósito de calosa entre la pared celular y membrana plasmática, y su deposición en los plasmodesmos, puede funcionar como un mecanismo de defensa físico y químico al formar una barrera, dificultando así la entrada por parte de patógenos invasores (Finiti *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2021). Cabe destacar que la deposición de calosa no sólo se ha reportado como una respuesta ante patógenos bacterianos, sino también en respuesta al ataque de hongos en los sitios donde el hongo intenta penetrar las células epidérmicas (Ellinger & Voigt, 2014). En el caso de la enfermedad del moho gris, se reportó que el aumento de calosa en hojas de *A. thaliana* cuando la planta es infectada por *B. cinerea* contribuye a una menor propagación del hongo (Finiti *et al.*, 2013).

En nuestro caso, la abundancia elevada de miR160 inducida por miPEP160b podría estar reduciendo la infección causada por *B. cinerea* vía la represión de los *ARFs*, causando la deposición de calosa en la pared celular de las células vegetales como un mecanismo de defensa para evitar su propagación. Este fenómeno explicaría porqué la incidencia de infección no cambia cuando se aplica el miPEP160b comparado con el control *scrambled*, pero sí cambia el área de lesión, debido a un menor esparcimiento del hongo a causa del depósito de calosa.





Dada la intervención de las auxinas en una gran cantidad de procesos fisiológicos en las plantas, no se puede descartar que existan otras señales moleculares que permitan la disminución del área de lesión durante la enfermedad del moho gris, como la señalización ejercida por el ácido salicílico, que en la infección causada por el hongo *Phytophthora infestans* en la papa, mantiene una señalización coordinada con las auxinas para generar una respuesta de defensa (Natarajan *et al.*, 2018).

8.3.2 Análisis del efecto de miPEP160 7.1 y miPEP160 7.1 ORF2 en la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* - *R. etli*

No detectamos una diferencia en el número y perímetro de los nódulos de las plantas a las que les fue aplicado el miPEP160 7.1 ORF2, tampoco encontramos diferencias en la actividad de la enzima nitrogenasa, lo que interpretamos como un efecto nulo del péptido en la simbiosis *P.vulgaris* - *R. etli*. Sin embargo, en un trabajo reciente de Laressergues y cols. (2022) se encontró que al expresar los péptidos subsecuentes del primer ORF localizados en pri-miRNAs de *A. thaliana*, éstos aumentaban la abundancia del pri-miRNA correspondiente de la misma manera que el péptido generado por el primer ORF. En este caso, podría ser que la diferencia en los métodos, las especies o la distancia que existe de un ORF a otro, generen diferencias entre lo encontrado en la literatura y en este trabajo.

La aplicación del miPEP160 7.1 tuvo un impacto en el desarrollo del nódulo, ya que el perímetro fue menor con el tratamiento. Las auxinas, están involucradas en la nodulación de las plantas leguminosas (Subramanian *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2013), por lo que se han hecho diferentes estudios sobre cómo intervienen las moléculas implicadas en la señalización y homeostasis de auxinas durante la nodulación. Turner y cols. (2013), mediante una construcción con el promotor sintético DR5 inducible por auxinas y la secuencia para la expresión de la proteína fluorescente tdT, compararon la respuesta a auxinas durante la formación de los primordios nodulares con la respuesta durante el desarrollo de raíces laterales, sus hallazgos sugieren que hay niveles bajos de auxinas durante la formación de los primordios nodulares. Más tarde, en nódulos maduros, no se detecta la respuesta a auxinas en la zona de infección y se restringe a la zona vascular.





Se ha encontrado que ciertos miRNAs están regulados diferencialmente durante la interacción leguminosa - rizobio. Entre estos, miR160 se encontraba regulado a la baja desde la inoculación hasta 12 horas después en la simbiosis *G. max* - *B. japonicum* (Subramanian *et al.*, 2008). En otro trabajo con estas especies, se analizaron nódulos emergentes y maduros por separado, encontrando que miR160 se encuentra regulado a la baja en los primeros, pero su abundancia es alta en los nódulos maduros, por lo que se propone que, para un adecuado desarrollo de los nódulos, la abundancia de miR160 debe ser baja en un inicio. Además, la diferencia de abundancia en los nódulos emergentes y maduros indica que la regulación de los ARFs por miR160 depende de la etapa del desarrollo del nódulo, ya que se detectaron distintas respuestas a diferentes tiempos durante la nodulación (Nizampatnam *et al.*, 2015).

En este trabajo, la aplicación del péptido miPEP160 7.1 durante la simbiosis *P. vulgaris* - *R. etli* cada dos días, desde el día 5 post-inoculación hasta los 21 días post-inoculación, podría estar alterando el desarrollo normal de los nódulos debido a un alto nivel de abundancia de miR160 en los estadíos iniciales y en las etapas subsecuentes, reduciendo las señales dependientes de la espacio-temporalidad del miRNA, ocasionando un desarrollo atípico en los nódulos disminuyendo su perímetro.

Por último, detectamos un aumento significativo en la actividad de la enzima nitrogenasa al aplicar el péptido, esta respuesta podría ser consecuencia de una mayor eficiencia en la colonización de los rizobios, como se ha reportado para miRNAs como miR167 en *G. max* (Tiwari *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha reportado que la colonización de los pelos radicales y el rizado de éstos en plantas mutantes que sobre expresan miR160 durante la nodulación no cambia en comparación con los controles (Turner *et al.*, 2013). Incluso se ha visto un aumento en el número de hilos de infección que llegan a las células corticales en plantas con imitadores de blanco en tándem corto (STTM) que inhiben la actividad de este miRNA (Nizampatnam *et al.*, 2015). La diferencia de efectos podría estar dada por las especies estudiadas, ya que dichos trabajos abordaron la simbiosis entre *G. max* - *Bradyrhizobium japonicum* y en nuestro caso la simbiosis entre *P. vulgaris* - *R. etli*. En ésta última, será necesario corroborar el fenotipo observado y a su vez realizar otra serie de ensayos para





conocer cuáles son los mecanismos que subyacen un aumento en la actividad de la nitrogenasa relacionado con la aplicación del miPEP160 7.1.

9. Conclusiones

En este trabajo, analizamos la conservación de las secuencias nucleotídicas de los precursores de miR160 y miR393 en *A. thaliana* y *P. vulgaris*, e identificamos que los precursores miR160 se encuentran agrupados en un mismo clado con un alto valor de soporte (Bootstrap = 100) lo cual concuerda con la conservación de su miRNA. En el caso de miR393 vimos que la relación entre precursores no es clara aun cuando el miRNA maduro está presente en varios grupos de plantas, lo que puede deberse a variaciones en las características estructurales del miRNA maduro.

Encontramos que los precursores de miR160 y miR393 en *P. vulgaris* y *A. thaliana* contienen marcos de lectura abiertos con potencial para generar miPEPs. Sin embargo, se consideró que los escasos ORFs detectados en pmiR393 mediante predicción *in silico* no generan miPEPs. Caso contrario de los precursores miR160, en los cuales se identificó una gran cantidad de ORFs en ambas especies de plantas. Los ORFs que cumplían con los criterios indispensables no reflejaban un patrón general de conservación entre ellos, por lo que probablemente muchos de ellos no generan miPEPs funcionales.

Mostramos que existe un efecto al aplicar algunos miPEPs en las interacciones *P. vulgaris* – *R. etli* y *A. thaliana* – *B. cinerea*: La aplicación del miPEP160b redujo el área de lesión causada por *B. cinerea* en *A. thaliana*, posiblemente potenciando un mayor depósito de calosa en la planta, lo que aumentaría su resistencia a la infección. Por otro lado, la aplicación del miPEP160 7.1 lleva a la disminución del perímetro de los nódulos formados por la simbiosis *P. vulgaris* – *R. etli*, y a su vez, se registró un aumento en la actividad de la enzima nitrogenasa.

Con lo visto en este trabajo, probamos que los precursores de miRNAs pueden contener secuencias que codifican miPEP con efecto durante las interacciones planta–microorganismo, que pueden ser tanto benéficas como perjudiciales para las plantas. Esta investigación, puede ser un punto de referencia para nuevos trabajos





ya que no se había probado con anterioridad la aplicación de los miPEPs en el modelo de interacción planta - patógeno. Por otro lado, referente a la simbiosis mutualista, se desconocía el efecto de la aplicación del miPEP160 en el modelo *P. vulgaris* – *R. etli*, dadas las respuestas que observamos en este modelo, es necesario llevar a cabo pruebas adicionales que puedan brindar mayor información sobre los procesos específicos que causan los efectos observados.

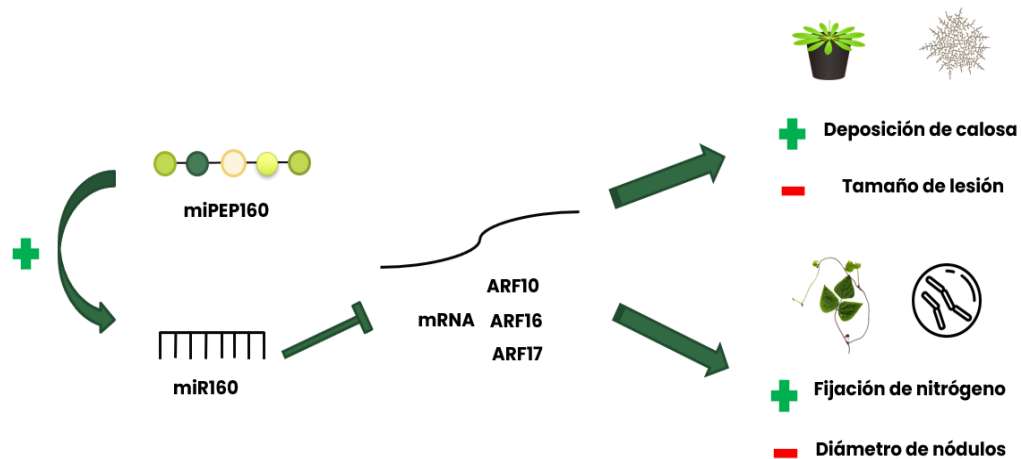


Figura 30. Regulaciones propuestas para el miPEP160 a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

10. Perspectivas

- Aplicar otras técnicas como la RACE (amplificación rápida de los extremos de cDNA) para la detección experimental de las secuencias completas de los transcritos precursores.
- Ampliar el análisis de conservación de precursores a más especies para robustecerlo.
- Indagar a fondo sobre la conservación de ORFs analizando sólo los primeros ORFs más cercanos al extremo 5' dentro de cada precursor.
- Detectar mediante western blot o ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) si los péptidos probados se traducen en las plantas estudiadas.





- Realizar ensayos para probar si existe una mayor deposición de calosa en las plantas infectadas a las que les fue aplicado miPEP160b comparado con los controles.
- Analizar a través de microscopía si al aplicar el miPEP160 7.1 los nódulos de *P. vulgaris* contienen una mayor cantidad de bacteroides.
- Diseñar ensayos *in vitro* aplicando el miPEP160b en *B. cinerea* y el miPEP160 7.1 en *R. etli* para analizar si estos péptidos tienen un efecto directo sobre el crecimiento o desarrollo de estos organismos.

11. Referencias

- AbuQamar, S., Moustafa, K., & Tran, L. S. (2017). Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 262–274. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1271767>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Axtell, M. J., Snyder, J. A., & Bartel, D. P. (2007). Common Functions for Diverse Small RNAs of Land Plants. *The Plant Cell*, 19(6), 1750–1769. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051706>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Bourret, J., Alizon, S., & Bravo, I. G. (2019). COUSIN (COdon Usage Similarity INdex): A Normalized Measure of Codon Usage Preferences. *Genome Biology and Evolution*, 11(12), 3523–3528. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz262>
- Brazales-Cevallos, D. K., Romero-Contreras, Y. J., Vences-Guzmán, M. Á., Torres, M., Aviles-Baltazar, N. Y., Sohlenkamp, C., & Serrano, M. (2022). Transcriptional characterization of the biostimulant effect of *Moringa oleifera* leaf extracts using *Arabidopsis thaliana* as a model. *South African Journal of Botany*, 144, 250-256. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.09.011>
- Breakspear, A., Liu, C., Roy, S., Stacey, N., Rogers, C., Trick, M., Morieri, G., Mysore, K. S., Wen, J., Oldroyd, G. E. D., Downie, J. A., & Murray, J. D. (2014). The root hair “infectome” of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals





- a requirement for Auxin signaling in rhizobial infection. *The Plant Cell*, 26(12), 4680–4701. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133496>
- Bustos, P., Santamaría, R. I., Pérez-Carrascal, O. M., Acosta, J. L., Lozano, L., Juárez, S., Martínez-Flores, I., Martínez-Romero, E., Cevallos, M. Á., Romero, D., Dávila, G., Vinuesa, P., Miranda, F., Ormeño, E., & González, V. (2017). Complete Genome Sequences of Three *Rhizobium gallicum* Symbionts Associated with Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(11). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00030-17>
- Cao, Y., Halane, M. K., Gassmann, W., & Stacey, G. (2017). The Role of Plant Innate Immunity in the Legume-Rhizobium Symbiosis. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 535–561. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041030>
- CEDRSSA. (2020). *Mercado del frijol, situación y prospectiva*. <http://www.cedrssa.gob.mx/>. Recuperado 31 de marzo de 2022, de http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-mercado-n-del_n-frijol-n__situacinin_y_prospectiva.htm
- Chávez, R. A., Rosas-Cárdenas, D. F. F., de Paoli, E., Accerbi, M., Rymarquis, L. A., Mahalingam, G., Marsch-Martínez, N., Meyers, B. C., Green, P. J., & de Folter, S. (2014). Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nature Communications*, 5(1), 3722. <https://doi.org/10.1038/ncomms4722>
- Chen, C., Li, J., Feng, J., Liu, B., Feng, L., Yu, X., Li, G., Zhai, J., Meyers, B. C., & Xia, R. (2021). sRNAanno—a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants. *Horticulture Research*, 8(45). <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00480-8>
- Chen, Q., Deng, B., Gao, J., Zhao, Z., Chen, Z., Song, S., Wang, L., Zhao, L., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., & Wang, S. (2020). A miRNA-Encoded Small Peptide, vvi-miPEP171d1, Regulates Adventitious Root Formation. *Plant Physiology*, 183(2), 656–670. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00197>
- Checker, V. G., Kushwaha, H. R., Kumari, P., & Yadav, S. (2018). Role of Phytohormones in Plant Defense: Signaling and Cross Talk. *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, 159–184. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_7
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>





- Couzigou, J. M., Laressergues, D., Bécard, G., & Combier, J. P. (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biology*, 12(11), 1178–1180. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094601>
- Couzigou, J., André, O., Guillotin, B., Alexandre, M., & Combier, J. (2016). Use of micro RNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *New Phytologist*, 211(2), 379–381. <https://doi.org/10.1111/nph.13991>
- Couzigou, J. M., Laressergues, D., André, O., Gutjahr, C., Guillotin, B., Bécard, G., & Combier, J. P. (2017). Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Cell Host & Microbe*, 21(1), 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.001>
- Clúa, J. (2018) *Bases moleculares de la interacción simbiótica eficiente entre Phaseolus vulgaris y Rhizobium etli*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de la Plata]. Repositorio institucional de la UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/65934>.
- Curaba, J., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2014). miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, 65(6), 1425–1438. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru002>
- Deakin, W. J., & Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 312–320. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2091>
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>
- Ellinger, D., & Voigt, C. A. (2014). Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany*, 114(6), 1349–1358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu120>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., & Sánchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of Phaseolus spp. by Agrobacterium rhizogenes. *Nature Protocols*, 2(7), 1819–1824. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>
- Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Cumbie, J. S., Givan, S. A., Law, T. F., Grant, S. R., Dangl, J. L., & Carrington, J. C. (2007). High-Throughput Sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for Frequent Birth and





Death of MIRNA Genes. *PLOS ONE*, 2(2), e219.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000219>

- Fahlgren, N., Jogdeo, S., Kasschau, K. D., Sullivan, C. M., Chapman, E. J., Laubinger, S., Smith, L. M., Dasenko, M., Givan, S. A., Weigel, D., & Carrington, J. C. (2010). MicroRNA Gene Evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(4), 1074–1089. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073999>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Finiti, I., Leyva, M. O., López-Cruz, J., Calderan Rodrigues, B., Vicedo, B., Angulo, C., Bennett, A. B., Grant, M., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2013). Functional analysis of endo-1,4- β -glucanases in response to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* reveals their involvement in plant-pathogen interactions. *Plant Biology*, 15(5), 819–831. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00701.x>
- Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620-014327>
- Formey, D., Iñiguez, L. P., Peláez, P., Li, Y. F., Sunkar, R., Sánchez, F., Reyes, J. L., & Hernández, G. (2015). Genome-wide identification of the *Phaseolus vulgaris* sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*, 16, 423 <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1639-5>
- French, E., Kaplan, I., Iyer-Pascuzzi, A., Nakatsu, C. H., & Enders, L. (2021). Emerging strategies for precision microbiome management in diverse agroecosystems. *Nature Plants*, 7(3), 256–267. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00830-9>
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., & Rokhsar, D. S. (2011). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178–D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>
- Gramzow L., Theiben G. (2019) Plant miRNA Conservation and Evolution. In: de Folter S. (eds) Plant MicroRNAs. *Methods in Molecular Biology*, vol 1932. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_3





- Islam, W., Noman, A., Qasim, M., & Wang, L. (2018). Plant Responses to Pathogen Attack: Small RNAs in Focus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 515. <https://doi.org/10.3390/ijms19020515>
- Jiang, S., Jardinaud, M.-F., Gao, J., Pecrix, Y., Wen, J., Mysore, K., Xu, P., Sanchez-Cañizares, C., Ruan, Y., Li, Q., Zhu, M., Li, F., Wang, E., Poole, P. S., Gamas, P. y Murray, J. D. (2021). NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules. *Science*, 374(6567), 625–628. <https://doi.org/10.1126/science.abg5945>
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39, D152-D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Lauressergues, D., Couzigou, J. M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G., & Combier, J. P. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520(7545), 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature14346>
- Lauressergues, D., Ormancey, M., Guillotin, B., San Clemente, H., Camborde, L., Duboé, C., Tourneur, S., Charpentier, P., Barozet, A., Jauneau, A., le Ru, A., Thuleau, P., Gervais, V., Plaza, S., & Combier, J. P. (2022). Characterization of plant microRNA-encoded peptides (miPEPs) reveals molecular mechanisms from the translation to activity and specificity. *Cell Reports*, 38(6), 110339. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110339>
- Lee, C. H., & Carroll, B. J. (2018). Evolution and Diversification of Small RNA Pathways in Flowering Plants. *Plant and Cell Physiology*, 59(11), 2169–2187. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy167>
- Leyser, O. (2017). Auxin Signaling. *Plant Physiology*, 176(1), 465-479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
- Li, Y., Zhang, Q., Zhang, J., Wu, L., Qi, Y., & Zhou, J. M. (2010). Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiology*, 152(4), 2222–2231. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151803>





- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., Chen, S., & Zhou, J.-M. (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.009>
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., & Zhang, J. Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(47). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00047>
- Lin, J., Frank, M., & Reid, D. (2020). No home without hormones: How plant hormones control legume nodule organogenesis. *Plant Communications*, 1(5), 100104. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100104>
- Liu, X., Huang, J., Wang, Y., Khanna, K., Xie, Z., Owen, H. A., & Zhao, D. (2010). The role of floral organs in carpels, an Arabidopsis loss-of-function mutation in MicroRNA160a, in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *The Plant Journal*, 62(3), 416–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04164.x>
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis *AUXIN RESPONSE FACTOR17* Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell*, 17(5), 1360–1375. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031716>
- Mera, M.; Rouanet, J.L. Contribución de las leguminosas de grano en rotación con cereales: Una revisión. *En Sustentabilidad de Cultivos Anuales: Cero Labranza y Manejo de Rastrojos*; Acevedo, E., Ed.; 2003; Volume 8, pp. 135–156.
- Monroy-Morales, E., Dávila-Delgado, R., Ayala-Guzmán, E., Gamboa-deBuen, A., & Sánchez-López, R. (2022). Visualization of the Crossroads between a Nascent Infection Thread and the First Cell Division Event in *Phaseolus vulgaris* Nodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5267. <https://doi.org/10.3390/ijms23095267>
- Moran, Y., Agron, M., Praher, D., & Technau, U. (2017). The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nature Ecology & Evolution*, 1(3). <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0027>
- Nadzieja, M., Kelly, S., Stougaard, J., & Reid, D. (2018). Epidermal auxin biosynthesis facilitates rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 95(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/tpj.13934>





- Natarajan, B., Kalsi, H. S., Godbole, P., Malankar, N., Thiagarayaselvam, A., Siddappa, S., Thulasiram, H. V., Chakrabarti, S. K., & Banerjee, A. K. (2018). MiRNA160 is associated with local defense and systemic acquired resistance against *Phytophthora infestans* infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, 69(8), 2023–2036. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery025>
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., & Jones, J. D. G. (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science*, 312(5772), 436–439. <https://doi.org/10.1126/science.1126088>
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298>
- Nizampatnam, N. R., Schreier, S. J., Damodaran, S., Adhikari, S., & Subramanian, S. (2015). microRNA160 dictates stage-specific auxin and cytokinin sensitivities and directs soybean nodule development. *The Plant Journal*, 84(1), 140–153. <https://doi.org/10.1111/tpj.12965>
- Noman, A., Aqeel, M., & Lou, Y. (2019). PRRs and NB-LRRs: From Signal Perception to Activation of Plant Innate Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1882. <https://doi.org/10.3390/ijms20081882>
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Ormaney, M., Guillotin, B., San Clemente, H., Thuleau, P., Plaza, S., & Combiér, J. (2021). Use of microRNA-encoded peptides to improve agronomic traits. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1687–1689. <https://doi.org/10.1111/pbi.13654>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2014). Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1–3), 17–42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S. (2008). CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, 3:38. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>
- Puigbò, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallvé, S. (2008). E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics*, 9(65). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-65>





- Rey, T., & Jacquet, C. (2018). Symbiosis genes for immunity and vice versa. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.010>
- Roux, J. J. L., Hui, C., Keet, J., & Ellis, A. (2017). Co-introduction vs ecological fitting as pathways to the establishment of effective mutualisms during biological invasions. *New Phytologist*, 215(4), 1354-1360. <https://doi.org/10.1111/nph.14593>
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R. y Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>
- Santamaría, R.I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O.M., Miranda-Sánchez, F., Vinuesa, P., Martínez-Flores, I., Juárez, S., Lozano, L., Martínez-Romero, E., Cevallos, M.Á., Romero, D., Dávila, G., Ormeño-Orrillo, E., González, V. (2017) Complete Genome Sequences of Eight *Rhizobium* Symbionts Associated with Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(30). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00645-17>.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D., & Trivedi, P. K. (2020). Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6, 1262–1274. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00769-x>
- Silva, L. R., Bento, C., Gonçalves, A. C., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., & Velázquez, E. (2017). Legume bioactive compounds: influence of rhizobial inoculation. *AIMS Microbiology*, 3(2), 267–278. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.2.267>
- Simon, S. A., Meyers, B. C., & Sherrier, D. J. (2009). MicroRNAs in the Rhizobia Legume Symbiosis. *Plant Physiology*, 151(3), 1002–1008. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144345>
- Singh, D., Raina, T. K., Kumar, A., Singh, J., & Prasad, R. (2019). Plant microbiome: A reservoir of novel genes and metabolites. *Plant Gene*, 18, 100177. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100177>
- Singh, G., Dukariya, G., & Kumar, A. (2020). Distribution, Importance and Diseases of Soybean and Common Bean: A Review. *Biotechnology Journal International*, 24(6), 86–98. <https://doi.org/10.9734/bji/2020/v24i630125>





- Singh, S., & Singh, A. (2021). A prescient evolutionary model for genesis, duplication and differentiation of MIR160 homologs in Brassicaceae. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 296(4), 985–1003. <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01797-8>
- Skorupska, A., Kidaj, D., & Wielbo, J. (2017). Flavonoids and Nod Factors: Importance in Legume-Microbe Interactions and Legume Improvement. *Microbes for Legume Improvement*, 75–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_3
- Stopnisek, N., & Shade, A. (2021). Persistent microbiome members in the common bean rhizosphere: an integrated analysis of space, time, and plant genotype. *The ISME Journal*, 15, 2708–2722. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00955-5>
- Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102–1104. <https://doi.org/10.2144/00286ir01>
- Subramanian, S., Fu, Y., Sunkar, R., Barbazuk, W. B., Zhu, J. K., & Yu, O. (2008). Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics*, 9(1), 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-160>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tiwari, M., Pandey, V., Singh, B., & Bhatia, S. (2020). Dynamics of miRNA mediated regulation of legume symbiosis. *Plant, Cell & Environment*, 44(5), 1279–1291. <https://doi.org/10.1111/pce.13983>
- Turner, M., Nizampatnam, N. R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S. P., Yu, O., & Subramanian, S. (2013). Ectopic Expression of miR160 Results in Auxin Hypersensitivity, Cytokinin Hyposensitivity, and Inhibition of Symbiotic Nodule Development in Soybean. *Plant Physiology*, 162(4), 2042–2055. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220699>
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>





- van Rensburg, H. C. J., Takács, Z., Freynschlag, F., Öner, E. T., Jonak, C., & van den Ende, W. (2020). Fructans Prime ROS Dynamics and *Botrytis cinerea* Resistance in *Arabidopsis*. *Antioxidants*, 9(9), 805. <https://doi.org/10.3390/antiox9090805>
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(12). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Velázquez, E., Silva, L. R., & Peix, A. (2010). Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 109–144. <https://doi.org/10.2174/157340110791233247>
- Vibrans, H. (2009, 22 junio). *Phaseolus vulgaris* - ficha informativa. CONABIO. Recuperado 31 de marzo de 2022, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.html>
- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, 136(4), 669–687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>
- Wang, S., Liang, H., Xu, Y., Li, L., Wang, H., Sahu, D. N., Petersen, M., Melkonian, M., Sahu, S. K., & Liu, H. (2021). Genome-wide analyses across Viridiplantae reveal the origin and diversification of small RNA pathway-related genes. *Communications Biology*, 4(412). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01933-5>
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms22052393>
- Waterhouse, P. M., & Hellens, R. P. (2015). Coding in non-coding RNAs. *Nature*, 520(7545), 41–42. <https://doi.org/10.1038/nature14378>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Windels, D., Bielewicz, D., Ebnetter, M., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., & Vazquez, F. (2014). miR393 Is Required for Production of Proper Auxin Signalling Outputs. *PLoS ONE*, 9(4), e95972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095972>
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., & Banfield, M. J. (2013). On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 761–776. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3118>





- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis *MIRNA* Genes. *Plant Physiology*, 138(4), 2145–2154. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062943>
- Yang, J., Lan, L., Jin, Y., Yu, N., Wang, D., & Wang, E. (2022). Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 244–267. <https://doi.org/10.1111/jipb.13207>
- Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., Fang, Y. Y., Hua, C. L., Ding, S. W., & Guo, H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2(10). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>
- Zielezinski, A., Dolata, J., Alaba, S., Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Knop, K., Stepien, A., Bielewicz, D., Pietrykowska, H., Sierocka, I., Sobkowiak, L., Lakomiak, A., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., & Karlowski, W. M. (2015). mirEX 2.0 - an integrated environment for expression profiling of plant microRNAs. *BMC Plant Biology*, 15:144. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0533-2>

12. Anexos

12.1 Secuencias de miRNA, precursores y IDs de transcritos blanco de miR160 y miR393

Nombre	Secuencia o identificador
Ath_miR160a	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Ath_miR160b	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Ath_miR160c	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Ath_miR393a	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC
Ath_miR393b	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC
Ath_pmiR160a	CCACCCTTAATTGTTTTATATAAACCATTTCTCCTCCTCTCTCCATCACCTTCAATCTCTCGATCTCTCTGGATC CCCAATCTCACCTCCATGTTTTGTTTGTGATTCCCATCTTCTCTTTTGTCTTTCCACCAATCGTCATTTAAGGCTTC AAGAACAGTAACCCCAATTCCTCCACAAGAGGGAGAGAAAACAAAAGATCTCCAATTCATTCTCGTACATGCAAA TCACAATCCATGCCATAGATTGTTTCTATTCTCCTTATTTATTGCTTGTATCTGTTTCATGCATGGACCAGGTGGAGA GAGCATTACTTAAAAATAGAATTAGCTATCTGTTTTAGGCGAATTAGTTTCCCTTACATAACCATGTATATGTCATGAC GCATATACATATGTAGATGTATATGATTATATATGTATGCCTGGCTCCCTGTATGCCATATGCTGAGCCCATCGAGT ATCGATGACCTCCGTGGATGGCGTATGAGGACCATGCATATCCTCATAATATATAA
Ath_pmiR160b	ATAACTCTCCCAAATTCCTGACCAAAAATATCCGCCACTTTCTCTCTGGTTTCATGTTTTCCCTCAATGAAATACATA CACATTTTGTATTTTAAATCAAGATCGACGTATAAGCTATCCACCAATCATACTTAAGGGTTCCTGATACATATA TACTATATATATATGGAATAATAGTCGTGCCTGGCTCCCTGTATGCCACAAGAAAACATCGATTTAGTTTCAAATCGATC ACTAGTGGCGTACAGAGTAGTCAAGCATGACCAAAGC
Ath_pmiR160c	AAAACTCTCAACATTTCTCTGACTACTTCAATTTCTCTTCCCAACAGTTAAAAAAGTTCTGATTGATTCAAGCCAAGAT CCACGTATAAAGATATGTTTCATGCGTAGAGGTTTGGTATACAACAATATACATATAATAGTTTGTGTTATGCTGGCTCC CTGTATGCCACGAGTGGATACCGATTTTGGTTTTAAATCGGCTGCCGGTGGCGTACAAGGAGTCAAGCATGA
Ath_pmiR393a	GACAAAACCCACATTGCTCTCAACTTTTAGAGTGAGAGAGAGATAGAGAGTTGAACAAATTTCTATAGCAACTAGAGGAAG GATCCAAAGGGATCGCATTGATCCTAATTAAGGTGAATTTCTCCCATATTTTCTTTATAATTGGCAAATAAATCAAAAAATTT





	GCTTGGTTTTGGATCATGCTATCTCTTTGGATTCATCCTTCGG
Ath_pmiR393b	ATCAAAGGCCTTCGAGAAAATTAACACACATTGCTCCCACCTTGAAAGAGAGAGAGTTCTTCACAGCACTAGAGAAAGG ATCCAAAGGGATCGCATTGATCCTAATTAAGCTGATTATTCCCAATAATTGTTTTTTTTTCTTCTCAATCGAAAGATGG AAGAAAAACAATTCCAAACATTTTGCTTACTTTTCCGGATCATGCGATCTCTTTGGATTCATTCTTTGG
Ath_ARF10	AT2G28350.1
Ath_ARF16	AT4G30080.1
Pvu_miR160_C hr01	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Pvu_miR160_C hr07	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Pvu_miR160_C hr07.1	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA
Pvu_miR160_C hr03	TGCCTGGCTCCCTGAATGCCA
Pvu_miR393_C hr04	TTCCAAAGGGATCGCATTGATC
Pvu_miR393_C hr01	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC
Pvu_miR393_C hr08	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC
Pvu_pmiR160_ Chr01	TTGAAAAAGTAAAGTAGGGAACAGAAAAAGAGAGAGACAAAGGTAGGTTTCAGGTAGAATTAATTACAAAGTTAGCTTTGCT TCATGCCAAATGCTAGCTTCTTAGTTGTTTCCCAAGTTAAACAGTAGCCAAAGGGTTGAGGGGTGTTTTGTCATTTG GGAGACATGGAAGGACTTGTGTTCCCTCATGCTGTATATATAACATGCTGTTCAATTGCTTCTACCTCATAGATATTACT TGCAAACCATTTTTAGCTTCAGCACCACCAATTATCTGATCTGGTCATCTCTATGCATCTCACCTTCTCCATGTTAGTGAG ATAAATATGGCTATCTTTACATTTGGTTTTATATATTACTATTAGCATACTTGGCGTGCCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGC AGAGCCCATCAGAACAGTATGGCCTTAACATAATGGCGTGCAGGAGTATGCATGTTGTTGTGTG
Pvu_pmiR160_ Chr07	GAGAGTTAAAAAGTTGGAAAAAGACATGGCTTCCACCTAAAGTATTTTCAAAGCTACCTACACTTGATGCCAAAT TCCCAACTTTAAAGCTGCTTGGTTGTTTGAAGTAGAAAACAGTAGCCTATGCAACTAAGAGGGACCCTTTTTGTCC TTTTGGTTGTGAACCTTAGATTTGGAGCACACTTCTTCTCTTTATTGTATATATGCTCCTCACTTAATCTCCCA CCTAGCTTGGATCGCTTTCAGATCAGATCCTGCACAATCTTCACTCAAGATCAACGGGTACCTTCTGCTTAATTGCAT CTTACATTTCTTAGCATATCTGTGCATATACATATCATCATCATCATCGTCATCTCCATCTTCTGCATGTT GCTCAAGGAAGTAACCTTTGTTGTGTTGTGCTGCTCCCTGTATGCCATTTGTTGACCCCATCACAATGGTCATG GCCTTACCAATGGCGTATGAGGAGTATGCATGCTGTATTGCT
Pvu_pmiR160_ Chr07.1	TTGCAGACAAAATGAGCTTCAGAGAAGAGCAAAAGCACACTTAGCTTTACGACCAGAAAAGGAGATTTCAAACAACA TAAGTCTAGCTTAGGAAATGCGTGGTTAGTAACCCAAACCCATTCCATTTCTCTCATAACTCTTCTCTTACCCC TACCTAGCTACCTTTGCTCCTTGTGTTGCTCTATATTTAGTGGGGAACTTGGCTTCAGGGTGAACCAACCAACCCC ACATCTTCCCTTTCCCTCTCAAACCACACAAACCCCACTATTATTAGCCACACCTTAATCCCCTACGTTTAG CCCATTGGTTGCTGTTTTATGCCAATTCAGTAGGGTTTTGTGGGGCTTTCAACCCCAATTTGATTATGACTTAGTT CCATCTCTATATCATCTCCCCACCCTCCATATATACTACCTCCATCCCCCTCACTCTACTCTACTACTCTCAT CCCATCTCCAATCTCTTTTTCTCCCTTTCTCCTCCCTCCCTCCACATTATCTTCTCCCATCAACCATC TATACACCTACCTTTTCATCATCATCCATCATGTATTAATCATATGGCTAGGCTATTACTTTGCAAGCTCCTTCTACT CTCAAACACTCTTTTTATGTATCATACTACTCATGCATCATACTGCCTTCCCTTATCCTTAGGATTTGGTGAGG CTAATTAGAGCTTAGTTAGAGGAGAACTTGATTTGTGCATGTATGTGTTAATTACCCACATGCATCTTATTATTA ATTAAGCAATTGATGTTGTTGTGCGCATCATGCATACATATGTGTATGTGCCCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGCAGA GCTCATCGAAGCATCAATGACCTCCGTGGATGGCGTATGAGGACCAAGCATATTCCATGTAG
Pvu_pmiR160_ Chr03	GCAGTTGCATGTGGTCCCTGAGATTGGCCAAGTGCCCTTATAAATTCCTTTAAAAATGAAATGACTAAACGGATTAGTG GTCCCAACTCCCTCATTGGCACTAAGCAGAGATATGATATACATACCTTGAGACCACACTGGAACCTTTGAAATTATG CCTTTAATCTCTTGGGGCCACAGTAGATAATTTAGAGTAACATTTGTAAGCAAGCTAAAGCTTAGGATTCATGTGGGG TACCACATATATGAAGTATAATTATTACTAATACTTTGTTTAAAAACAAGAAAGTAAATAGAAAGCCTTTTGTCTTC TGCTAGTACAGTTCTTTTCTTAATAATTAATGGTTAATATAGTTAAAGGATGAAACATACTTACACAACGGCTAG AGATATTTAATCCAGTGATGGACACTGCACAAATTTCTATTATATTAGTACTGTTTGTGGTATGGAGATGAG TTAGATGATCACATTTGTCCATATTTGATCCAGCTTCGGTTCTGGGAGAGACGGACCCAGCATCAAACCTCAGCTAA





	CGCTCACTGCAACTCTGGCCTTGTCTTATTGACTGGTTTTGGCATCGTCTGGAAATTCACACTAAGTCATTGACC CTTTTGCTAGCAGGGTAGTGCATTCAATAATAAATAAGATAATTAATTAATTGTGCTGATCAATGAAACAGTAATGATT AAAGGTTAAAGACTAAACGGTCCCATAATTAATAAAGTTTCAAGTTTCAACAAGAGAAAATTGACAGATAAGAAGCA CATCTCATATCTTACATGTAAGTGAAGGATGAAATTTTTAAAGAGGATTTGCTTGTGTGGGGAGGG AGGTTTCATCTTTCCGAGGGAAAAATCCAAAAAGACGACCTGTAACCCAGGCAGGTTTGGCTTTATCTGGTGGA ACTATTTGTTACAACCAAGGCTTGGTTGCCCTTTGCCAATTGTACCCTTAATTCTTCTTTTTCCCTCTTTTTTC GTGGATTTTCTTGTCTCTCCGCTCATTCCGCTCCTTAAATACCCCATAGGTTTATTGGTTCCAGAAGCAAAAAC TACAGAGACCTGCTGGAGCTCAAAGTCATTTTATGAGTAAGCACAAGAAGTACGAGCATTCCCTCCTCTTTGTTGGC CTTCTTTTACTCTTTCTGTCCCTCTGTTACATAATTAAGGGTACGTAGCTCTTGATTTTGTGTCAAACGAGACTGTT TCTTTCTCTCACTCATCTCATCACACTCACATGTGACGCAGTGAATTAGCTAGCATTTACCCAGTATATGTGTTAAT TAAATCTTTCTGAGTTTTGGAATCTGATACTGTATTGTTTTGATGATGCAGATTCTAGTCAAGTTCAAGATGAAAATT GTTATCTCTCCCATTTGGTGAATGATGCGCTTGCCTGGCTCCCTGAATGCCATGTAAGAAGCCTGTCAAAGAAATTGT CAGCCTTTTTATTGGCATGAGGGGAGTCATGCAGGCTAACTAGTCAA
Pvu_pmiR393_ Chr04	CGCACAATACAACCACCCTCATCCTCTCAAATTTCAAGATCAAACCTTTTTCTGTGCCTTATTGTGGTGGAGAG TTCCAAAGGGATCGCATTGATCTGATTCTTGTGGTGGATTCTGCACGATTTGCTTCACAGCTTCACTTGTATTGGA TCATGCGATCCCTTAGGAACCTTCTATCAAC
Pvu_pmiR393_ Chr01	AGCTCCACTTTGTCTTACACCAAAAGCCTCTCCCTCAAACCTCAAACCTACCCTTTCTCTCACACAACCA CAACACCCCAACAATTCAGAAGAAGAAAGGTTTGGTTATTCCACTGCAACTGGAGGAGCATCCAAAGGGATCGCAT TGATCCAAAATCCAACCTCTCATATTCTCTTCCACTCACAGTATTTGGGATCATGCTATCCCTTTGGATTCTCCTTTAG
Pvu_pmiR393_ Chr08	CCTCAAACCTCAGAGCCTTCCATCATCCACCACCCTTCTCCTTACCACAAAAGCCTTCCAGACAGAGAGAGAGTGT TAATATATATCAAACACTCAAGAATCAACTCAGAAGTGAAGTTTGGTTAATATGATTCCACTGCAACTGGAGGA GGCATCCAAAGGGATCGCATTGATCCCAAATCTCAGATTTATAAATTTTCTTCTTTCTTTCTTAATATTTGGGA TCATGCTATCCCTTTGGATTCTCCTTTGG
Pvu_ARF10	PhvuI.005G134500.1
Pvu_ARF17	PhvuI.009G026200.1

12.2 ORFs encontrados en los precursores de miR160 y miR393

12.2.2 ORFs miR160 y miR393 en *A. thaliana*

pmiR160a					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	229-351	ATGCAAATCACAATCCATGCCATAGATTGTTTCTATTCTCCTTATTT ATTGCTTGATCTGTTCATGCATGGACCAGGTGGAGAGAGCATTAC TTAAAAATAGAATTAGCTATCTGTTTTAG	40	MQITIHAIIDCFYSSLF IACICSCMDQVERAL LKNRISYLF*
1	2	376-390	ATGTATATGTCATGA	4	MYMS*
1	3	445-477	ATGCCATATGCTGAGCCATCGAGTATCGATGA	10	MPYAEPIEYR*
1	4	487-525	ATGGCGTATGAGGAGCCATGCATATCCTCATACATATAT	13	MAYEEPCISSIYIY
2	1	95-169	ATGTTTTGTTGTTGATTCCACTCTCTCTTTTGTCTTTTACCAAAT CGTCATTTAAGGCTTCAAGAACAGTAA	24	MFCLLIPIFSVFSFN RHLRLQEQ*





2	2	425-526	ATGTATGCCTGGCTCCCTGTATGCCATATGCTGAGCCATCGAGTA TCGATGACCTCCGTGGATGGCGTATGAGGAGCCATGCATATCCTC ATACATATATA	34	MYAWLPVCHMLSPS SIDDLRGWRMRSHA YPHTYI
3	1	294-326	ATGCATGGACCAGGTGGAGAGCATTACTTAA	10	MHGPGGESIT*
3	2	387-407	ATGACGCATATACATATGTAG	6	MTHIHM*
3	3	408-458	ATGTATATGTATTATATATGTATGCCTGGCTCCCTGTATGCCATATG CTGA	16	MYMYIICMPGSLYAI C*
3	4	474-497	ATGACCTCCGTGGATGGCGTATGA	7	MTSVDGV*
3	5	504-527	ATGCATATCCTCATACATATATAA	7	MHILIH*

pmiR160b					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
2	1	68-139	ATGAAATACATACACATTTTGATTTTATTTAAATCAAGATCGA CGTATAAGCTATCCACCAATCATACTTAA	23	MKYIHILILFKSR STYKLNHT*
2	2	203-271	ATGCCACAAGAAAACATCGATTTAGTTTCAAATCGATCACT AGTGCCGTACAGAGTAGTCAAGCATGA	22	MPQENIDLVS K SITSVQSSQA*
3	1	54-71	ATGTTTTCCCTCAATGA	5	MFSPQ*

pmiR160c					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	172-240	ATGCCACGAGTGGATACCGATTTTGGTTTTAAAATCGGCTG CCGGTGGCGTACAAGGAGTCAAGCATGA	22	MPRVDTFDFGFK IGCRWRTRSQA *
3	1	99-143	ATGTTTCATGCGTAGAGGTTTGGTATACAACAATATATACATA TAA	14	MFMRRLVYN NIYI*
3	2	156-203	ATGCCTGGCTCCCTGTATGCCACGAGTGGATACCGATTTTG GTTTTAA	15	MPGSLYATSGY RWFV*

pmiR393a					
Marco de lectura	No. de	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia





	ORF				
2	1	182-208	ATGCTATCTCTTTGGATTATCCTTCG	9	MLSLWIHPS

pmiR393b					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
2	1	161-232	ATGGAAGAAAAACAAATTCCAAACATTTTGCTTACTTTCCG GATCATGCGATCTCTTTGGATTATCCTTT	24	MEEKQIPNILLT FPDHAISLDSFF
3	1	207-233	ATGCGATCTCTTTGGATTATCCTTTG	9	MRLSLWIHSL

12.2.3 ORFs de miR160 y miR393 encontrados en *P. vulgaris*

pmiR160 Chr01					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	190-282	ATGCTGTATATATAACATGCTGTTCAATTGCTTCTACCTCATAGATATTAC TTGCAAACATTTTAGCTTCAGCACCACCAATTATCTGA	30	MLYIYNMLFNC FYLIDI TCKPFLASAPPII*
1	2	397-471	ATGCCATTTGCAGAGCCCATCAGAACAGTGATGGCCTTAACTAATGGCGTG CGAGGAGTCATGCATGTTGTTGTG	25	MPFAEPIRTVMALTN VRGVMHVVV
2	1	83-97	ATGCCAAATTGCTAG	4	MPNC*
2	2	296-370	ATGCATCTCACCTTCTCCATGTTAGTGAGATAAATATGGCTATCTTTACATT TGGTTTTATATATTACTATTAG	24	MHLTFFHVSEINMAIF TFGFIYYY*
2	3	440-472	ATGGCGTGCAGGAGTCATGCATGTTGTTGTG	11	MACEESCMLLC
3	1	168-206	ATGGAAGGACTTGTTCTTCATGCTGTATATATATAA	12	MEGLVFLHAVYI*
3	2	315-329	ATGTTAGTGAGATAA	4	MLVR*





pmiR160 Chr07					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	28-90	ATGGTCTTCCACCTAAAGTATTTTCAAAGCTACCTACACTTGATGCCAAATT CCCAACTTTAA	20	MVFHLKYFQSYLHLMPSQL*
1	2	436-489	ATGCCATTTGTTGACCCCATCACAATGGTCATGGCCTTACCAAATGGCGTATGA	17	MPFVDPITMVMALPNGV*
1	3	496-510	ATGCATGCTGTATTG	5	MHAVL
2	1	212-226	ATGCTCCTCACTTAA	4	MLLT*
2	2	386-511	ATGTTGCTCAAGGAAGTAACCTTTGTTGTGTTGTGTCCTGGCTCCCTGTA TGCCATTTGTTGACCCCATCACAATGGTCATGGCCTTACCAAATGGCGTAT GAGGAGTCATGCATGCTGTATTGC	42	MLLKEVTFVVLCAWLP VCHLLTPSQWSWPYQ MAYEESCMLYC
3	1	129-239	ATGCAACTAAGAGGGACCCTTTTGTCCCTTTTGGTTGTGAACCTTAGATTTT GGAGCACACTTTCTTTCTTTTATTGTATATATGCTCCTCACTTAATTCCTC CACCTAG	36	MQLRGTFLVLLVNF FWSTLSFLLLYICSSLN SST*
3	2	486-512	ATGAGGAGTCATGCATGCTGTATTGCT	9	MRSHACCIA

pmiR160 Chr 7.1					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	589-690	ATGGCTAGGTCTATTACTTTGCAAGCTCCTTCTACTCTCAAACACTCTTTTT TATGTATCATACTACTCATGCATCATACTGCCTTCTTATCCTTAG	33	MARSITLQAPSTLKHSL LCIIHTLMHHTCLPYP*
1	2	793-921	ATGTTTGTGTCGCATCATGCATACATATGTGTATGTGCTGGCTCCCTG TATGCCATTTGCAGAGCTCATCGAAGCATCAATGACCTCCGTGGATGGCG TATGAGGAGCCAAGCATATTCATGTAG	42	MFVCRIMHTYVYVPGS LYAICRAHRSINDLRG WRMRSQAYSM*
2	1	743-781	ATGTATGTGTTAATTACCCACATGCATCTTATTATTAA	12	MYVFNYPHASY*
2	2	821-898	ATGTGTATGTGCTGGCTCCCTGTATGCCATTTGCAGAGCTCATCGAAGC ATCAATGACCTCCGTGGATGGCGTATGA	25	MCMCLAPCMPFAELIE ASMTSVDGV*
3	1	12-44	ATGAGCTTCAGAGAAGAGCAAAGCACACTTAG	10	MSFREEQKHT*





3	2	333-347	ATGCCAATTCAGTAG	4	MPIQ*
3	3	642-710	ATGTATCATACATACACTCATGCATCATACATGCCTTCCTTAGGAT TTGGTGAGGCTAATTAG	22	MYHTYTHASYMPSLSL GFGEAN*
3	4	747-785	ATGTGTTTAATTACCCACATGCATCTTATTATTAATTAA	12	MCLITHMHLIIN*
3	5	888-920	ATGGCGTATGAGGAGCCAAGCATATTCCATGTA	11	MAYEEPSIFHV

pmiR160 Chr 03					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	154-183	ATGCCTTTAATCTCTGGGGCCACAGTAG	9	MPFNLLGPQ*
1	2	409-546	ATGGACACTGCACAAATTTCTATTATATTAGGACTGTTTGATGGTGATGG AGTATGAGTTAGATGATCACATTTGTCCATATTTTGATCCAGCTTCGGTTCT GGGAGAGACGGACCCAGCATCAAACCTCAGCTAA	45	MDTAQIFYIYIRYCLMV MEYELDDHICPYFDPA SVLGETDPSIKLS*
1	3	697-711	ATGATTAAGGTAA	4	MIKG*
1	4	1126-1218	ATGAGTAAAGCACAAAGAACTGAGCATTCCCCTCCTCTTTGTTGGCCTTCTT TACTCTTTCTGTCCCTCTGTACATAATTAAGGGTACGTAG	30	MSKAQELSIPLLFVGLL LLFLSLCYIIKGT*
1	5	1369-1461	ATGATGCAGATTCTAGTCAAGTTCAAGATGAAAATTGTTATCTCTCCATTG GTGAAATGATGCGCTTGCTGGCTCCCTGAATGCCATGTAA	30	MMQILVKFKMKIVISPIG EMMRLPGSLNAM*
2	1	113-130	ATGATATACATACCTTGA	5	MIYIP*
2	2	227-256	ATGTGGGTACCCACATATATGAAGTATAA	9	MWGTHIYEV*
2	3	365-409	ATGAAACATACTTACACAACGGCTAGAGATATTTAATCCAGTGA	14	MKHTYTTARDILIQ*
2	4	473-622	ATGATCACATTTGTCCATATTTTGATCCAGCTTCGGTTCTGGGAGAGACGG ACCCGAGCATCAAACCTCAGCTAACGCTCACTGCAACTCTGGCCTTGCTTA TTGACTGGTTTTGGCATCGTCTGGAAATTCATCACACTAAGTCATTGA	49	MITFVHILIQRFWERR TPASNSANAH CNSGLV LLTGFGIVVKFITLSH*
2	5	818-832	ATGAAAAATTTTTAA	4	MKNF*
2	6	1316-1339	ATGTGTTAATTAATCTTTCTGA	7	MCLIKSF*
2	7	1451-1522	ATGCCATGAAGAAGCCTGTCAAAGAAATTGTCAGCCTTTTTATTTGGCAT GAGGGAGTCATGCAGGCTAA	23	MPCKKPVKIVSLFIWH EGSHAG*





3	1	60-104	ATGACTAAACGGATTAGTGGTCCCAACTCCCTCATTGGCACTAA	14	MTKRISGPNLIWH*
3	2	246-344	ATGAAGTATAATTATTACACTAATACTTTGTTTAAAAACAAGAAGTAAAATAGA AGCCTTTTGTCTTCTGCTAGTACAGTTCTTTTCTCTTAATAATTAA	32	MKYNYTNTLTKTRSKI EAFCLLLVQFFSLNN*
3	3	345-368	ATGGTTAATATAGTTAAAGGATGA	7	MVNIVKG*
3	4	1500-1526	ATGAGGGGAGTCATGCAGGCTAACTAG	8	MRGVMQAN*

pmiR393 Chr 04					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
3	1	159-185	ATGCGATCCCTTAGGAACTTTCTATCA	9	MRSLRNFLS

pmiR393 Chr 01					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
2	1	212-238	ATGCTATCCCTTTGGATTTCCTTTA	9	MLSLWISPL

pmiR393 Chr 08					
Marco de lectura	No. de ORF	Segmento de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	No. aminoácidos	Secuencia
1	1	133-225	ATGTATTCCACTGCAACTGGAGGAGGCATCCAAAGGGAT CGCATTGATCCCAAATCTCAGATTATAAAATTTTCTTCC TTTCTTTTCTTAA	30	MYSTATGGGIQ RDRIDPKSQIYK FFLPFFS*
3	1	237-263	ATGCTATCCCTTTGGATTCTCCTTTG	9	MLSLWIPPL





12.3 MiPEPs sintéticos aplicados durante la enfermedad del moho gris y en la simbiosis fijadora de nitrógeno *P.vulgaris* - *R. etli*.

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica	Tamaño (aa)
miPEP160a	ATGTTTTGTTTGTGATTCCCATCTTCTCTTTTGTCTTT TCACCAAATCGTCATTTAAGGCTTCAAGAACAGTAA	MFCLLIPIFSFVFSNRLRLQEQ	24
miPEP160a control	TTGTTGATTTTTCTGTCCATTTCCAACAGTTTATGAAT ATCCCCTCACTTAGGGAATGTCGTCCATTATTTTAA	LLIFSVHFQQFMNIPSLRECRPLF	24
miPEP160b	ATGTTTTCCCCTCAATGA	MFSPQ	5
miPEP160b control	TCCCAACCTTTTATGTGA	SQPFM	5
miPEP160 7.1	ATGAGCTTCAGAGAAGAGCAAAAGCACACTTAG	MSFREEQKHT	10
miPEP160 7.1 control	TTCGAAACTAAGATGCACGAGAGAAGCAATAG	FETKMHERSQ	10
miPEP160 7.1 ORF2	ATGCCAATTCAGTAG	MPIQ	4
miPEP160 7.1 ORF2 control	ATTCAGCCAATGTAG	IQPM	4

12.4 Solución de riego B&D

Solución A	2M CaCl ₂
Solución B1	1M KH ₂ PO ₄
Solución B2	1M K ₂ HPO ₄
Solución C	20mM Citrato de Hierro (Fe)
Solución D	0.5M MgSO ₄ ·7H ₂ O
	0.5M K ₂ SO ₄
	2mM MnSO ₄
	4mM H ₃ BO ₃
	1mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O
	4mM CuSO ₄ ·5H ₂ O
	0.2mM CoSO ₄ ·7H ₂ O
	0.2mM Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O





12.5 Primers utilizados en los ensayos qRT-PCR

Nombre	Secuencia
miR160-SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGGCAT
miR164a-SL	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCACG
U6-SL	GTGCAGGGTCCGAGGTTTTGGACCATTCTCGAT
miR160-F	GAAGCTGCCTGGCTCCCTGT
miR164a-F	GAGTGGAGAAGCAGGGCA
U6-F	GAGAAGATTAGCATGGCCCCT
Rev universal SL	GTGCAGGGTCCGAGGT
ath-pmiR160a-F	CTCTGGATCCCCAATCTCAC
ath-pmiR160a-R	TCTCTCCCTCTTGTGGAGGA
ath-pmiR160b-F	GGTTCATGTTTTCCCCTCAA
ath-pmiR160b-R	GATTGGTGGATAGCTTATACGTCG
ath-ARF10-F	GATATTGGTGGCGACAACG
ath-ARF10-R	CAAAGGCCACTGCTTATTCC
ath-ARF16-F	TGCATCAGGTTTGGAAACAG
ath-ARF16-R	CTGCGTATTTGATGGCTCCT
pvu-pmiR160a-F	TGCTTCATGCCAAATTGCTA
pvu-pmiR160a-R	GTCCTTCCATGTCTCCCAA
pvu-pmiR160b-F	CATGTGACGCAGTGAATTAGCT
pvu-pmiR160b-R	GCGCATCATTTACCAATG
pv-q005G134500-F (ARF10)	TCTGAGTGATTCAAGCAGCAA
pv-q005G134500-R (ARF10)	TCTTAGATGCCACGCAACAG
pv-q009G026200-F (ARF17)	CGGAAAGAACAACCTGTTCAA
pv-q009G026200-R (ARF17)	TTCAGAAGGGTGGTCAGCTT
CF150-F	CCGACAAGGAGAAGCTTAACAAGTT
CF150-R	CGGCAGATTTGGATGGACCAGCAAG
Ubiquitina-F	ATGCAGATCTTCGTGA
Ubiquitina-R	TAGTCAGCCAAGGTCCT
qUBQ-F	GCTCTCCATTTGCTCCCTGTT
qUBQ-R	TGAGCAATTTTCAGGCACCAA
HSP-F	CGGGGAGAGAAAGAGAGAAGA
HSP-R	AACACAAACTTCCGCATGAAC





12.6 Protocolo de extracción RNA total con el kit Norgen Total RNA purification plus kit (#48300, 48400)

- Todas las centrifugaciones y reacciones se realizan a temperatura ambiente
- Todo el material (puntas, tubos, pipetas, gradillas) debe ser libre de RNAsas
- Ensamblar y rotular una columna gDNA (**azul**) con un tubo recolector, una columna RNA (**gris**) con un tubo recolector y un tubo de elución (incluido en el kit)
- Se inicia la extracción con **50 mg** de tejido en un tubo rotulado

1.- Preparar una mezcla de *Buffer RL* + B-mercaptoetanol (600 uL + 6 uL /tubo)

1.1.- Agregar **600 µL** de **buffer RL** a cada tubo

1.2.- Homogeneizar en vórtex una vez agregado el volumen

1.3.- Agregar **6 µL** de **B-mercaptoetanol** a cada tubo

1.4.- Vortexear

2.- Centrifugar **2 min** a más de 3500 g (**8000 g**)

3.- Transferir **600 uL** del sobrenadante al ensamble columna gDNA + tubo

4.- Centrifugar **1 min** a **14000 g**

5.- Tirar la columna gDNA

6.- Agregar **60 µL** de etanol al 96-100% por cada **100 µL** de flowthrough

7.- Vortexear para homogeneizar

8.- Transferir hasta **600 µL** al ensamble columna RNA + tubo

9.- Centrifugar **1 min** a más de 3500 g (**8000 g**)

10.- Tirar el flowthrough

11.- **Repetir** desde el **paso 8** hasta que todo el lisado haya pasado por la columna

12.- Agregar **400 µL** de *Wash solution A* a la columna

13.- Centrifugar 1 min a más de 3500 g (8000 g)

14.- Tirar el flowthrough

15.- **Repetir** desde el **paso 12** dos veces

16.- Centrifugar **2 min** a más de 3500 g (**8000 g**) para secar la columna

17.- Transferir la columna a un tubo de elución

18.- Agregar **50 µL** de *Elution solution A* a la columna

19.- Centrifugar **2 min** a **200 g** seguido de **1 min** a **14000 g**





20.- Guardar la elución de RNA en hielo para un uso rápido, a 4 °C para una noche, a -20°C para unos días y a -70 °C para un largo plazo

12.7 Protocolo de electroforesis en gel desnaturizante

- El gel debe estar al 1% de agarosa
- En el cuarto de electroforesis todo lo que esté fuera de la zona libre de BrET hay que tocarlo con guantes para BrET.

1.- Pesar **1.2 g** de agarosa

2.- Agregar la agarosa a **120 mL** de Buffer TAE en el cuarto de electroforesis

3.- Calentar en el microondas por **2 min**

4.- Esperar a que se enfríe un poco o enfriar en agua el matraz

5.- Agregar cloro al 100% a una concentración máxima de 0.5 del volumen total (**600 µL**)

6.- Homogeneizar

7.- Vacear la mezcla

8.- Agregar 12 µL de bromuro de etidio y homogeneizar

9.- Poner el peine

10.- Esperar aproximadamente 15 minutos a que el gel solidifique

11.- Preparación de muestras (mientras solidifica el gel)

Colocar en tubos rotulados libres de RNAsas:

- 2-4 µL de muestra dependiendo de las concentraciones de RNA
- 6 µL agua
- 8 µL buffer de carga*

12.- Retirar el peine del gel

13.- Comenzar a cargar las muestras con la pipeta y puntas del cuarto.

14.- Cargar 5 µL del ladder en el primer y último pozo

15.- Cerrar con la tapa dejando los electrodos bien puestos y conectar los cables.

Usar un voltaje de 90v

16.- Esperar de 30 a 45 min para observar el gel en el transiluminador.





12.8 Protocolo stem-loop RT-PCR

- Usar puntas libres de RNAsas
- Trabajar en un lugar libre de RNAsas

Muestras:

miPEP160a control	1,2,3
miPEP160a	1,2,3
miPEP160b control	1,2,3
miPEP160b	1,2,3
miPEP160 7.1 control	1,2,3
miPEP160 7.1	1,2,3

- 4 muestras control:
 - 1 control RT Ath y 1 control RT Pvu: no se agrega SuperScriptIII RT
 - 1 control RNA Ath y 1 control RNA Pvu: no se agrega muestra de RNA, en su lugar se agrega agua libre de nucleasas
- Total: 22 muestras**

1.- Preparación de muestras RNA

1.1 Preparar las muestras de acuerdo con la muestra de menor concentración, llegando a un volumen final de **10 µL** por tubo utilizando agua libre de nucleasas.

2.- Preparación de reactivos preRT

Se mezclan para cada tubo:

1 µM oligos SL	1 µL del mix
oligo DT (500 ng/µL)	1 µL
10 mM dntp mix	1 µL
Muestra RNA	<u>10 µL</u>
	13 µL Total

3.- Incubar 10 min a 65°C (termociclador pre-RT) y después directamente en hielo mínimo **2 min**.

4.- Reactivos RT

Para cada muestra se agrega:

5X First Strand Buffer	4µL
0,1 MDTT	2µL
RNAseOut (40 U/µL)	0,1µL





SuperScriptIII RT (200 U/ μ L) 1 μ L
Total 20 μ L

5.- En un termociclador:

30 min. a 16°C

30 sec. a 30°C

30 sec. a 42°C x 60 ciclos

1 sec. a 50°C

5 min. a 85°C (inactivación enzima)

6.- Guardar la elución de RNA en hielo para un uso rápido, a 4°C para una noche, a -20°C para unos días y a -70 °C para un largo plazo

12.9 Protocolo qPCR

Consideraciones:

- Usar puntas libres de RNAsas
- Trabajar en un lugar libre de RNAsas

Muestras RNA

1.- Diluir las muestras 1/40

2.- Vortexear

Mix *primers* + Sybr

- Los *primers* deben prepararse a una concentración de 10 μ M
- Cada pozo de la placa de 96 (12x8) debe tener:

Primer Forward 10uM 0.5 μ L

Primer reverse 10uM 0.5 μ L

Sybr green 5 μ L

Nota: Revisar si los *primers* están preparados, si no, agregar el volumen necesario de agua libre de nucleasas que indica cada tubo para llegar a la concentración señalada.

Preparación de placa

- Cuidar las muestras de la luz

6.- Colocar 6 μ L del mix correspondiente en los pozos de acuerdo con las tablas

7.- Colocar 4 μ L cDNA 1/40 correspondiente a cada pozo

8.- Cubrir placa y sellar

9.- Centrifugar a 1500 rpm x 3 min

10.- Procesar en el equipo qPCR:





- Abrir software 7300 Syst Software
- Seleccionar pozos
- Agregar etapa de disociación
- Agregar volumen de la muestra
- Guardar trabajo e iniciar

