



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Identificación y caracterización de un microRNA
presente en condiciones de estrés en plántulas de frijol
(*Phaseolus vulgaris* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA BEATRIZ PÉREZ MORALES

T U T O R

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó como parte del laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología (UNAM), bajo la dirección del Dr. José Luis Reyes Taboada y con apoyo de los proyectos:

PAPIIT: IN-227706

CONACYT: J48740-Q

*A quien no posee el don de
maravillarse ni entusiasmarse,
más le valdría estar muerto
porque sus ojos están cerrados.*

Albert Einstein (1879-1955)

*En el fondo, los científicos
somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queramos
durante toda la vida.*

Lee Smolin, físico teórico y
Cosmólogo estadounidense.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Reyes, Pepe, mil gracias por creer siempre en mí y darme la oportunidad de trabajar contigo, gracias por todo el apoyo y la dedicación para conmigo. Y por motivarme a continuar en el grupo.

A la Dra. Alejandra Covarrubias, gracias por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el grupo y por confiar en mí. Gracias por los valiosos comentarios para la mejora del trabajo y por la motivación para continuar con el posgrado

A la M. en C. Catalina Arenas, Caty, mil gracias por todas tus enseñanzas y por los consejos que me han ayudado mucho. Gracias por brindarme tú amistad y por confiar en mí.

A la Dra. Tzvetanka Dimitrova y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar el trabajo.

Gracias a los miembros del laboratorio 20 por brindarme su amistad y su apoyo en el laboratorio.

DEDICATORIAS

A mi mamá por que es un gran ejemplo de fortaleza. Gracias por apoyarme y siempre confiar en mí, aunque a veces cometa errores. Gracias por todo tu amor y por ser más que una madre, una amiga.

A mi abuela y a mi tía por todo el cariño y confianza. Gracias por consentirme tanto.

A toda mi familia por alentarme siempre a seguir adelante y por la confianza.

A la familia Coral-Canto por creer en mí y por el apoyo brindado siempre. Gracias por compartir esta gran experiencia conmigo. Gracias por permitirme ser parte de su familia.

A Laura por ser la gran amiga que eres y has sido durante todo este tiempo y por compartir conmigo esta gran aventura. Gracias por desvelarte junto conmigo algunas veces, esperando a que terminara de trabajar.

A Migue, por ser uno de mis mejores amigos, por compartir parte de esto conmigo. En muy poco tiempo te he tomado un gran cariño, gracias por todo.

A mis amigos: Vero, Mario, Mónica, Ale, Flor, Marco, Cris, Citla, Carmen, Esther y Sandy por los grandes momentos compartidos. Gracias por seguir siendo mis amigos y por que forman parte especial en mi vida. Los quiero mucho.

A mis amigos de la facultad: Marisol, Cis, Luis Alberto, Ángel, Paty, David, Luis Felipe, Xavier, Rafa, Ángel V., Omar, Gaby, Mayra, Sandra, Ana y Delia por compartir conmigo una de las mejores etapas de mi vida. Gracias por el apoyo, la confianza y los consejos brindados. Los quiero mucho niños.

A Marina, Rosy, Sonia, Fer, Carlos, Daniel por su amistad y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos del IBt: Amiel, Monse, Magda, Cris, Natasha, Faty, Esteban y Alfonso, por su amistad y por los buenos consejos en momentos de desesperación.

A Perla por brindarme tu amistad y por la confianza que me has brindado. Gracias por hacer las clases tan divertidas.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
Biogénesis de los microRNAs	2
Los microRNAs de plantas y la respuesta a estrés	7
ANTECEDENTES	10
Bibliotecas de RNAs pequeños	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
Objetivo general	12
Objetivos particulares	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Germinación	14
Tratamiento con ácido abscísico (ABA)	14
Tratamiento de sequía severa	15
Extracción de DNA genómico para PCR	15
Amplificación del precursor de miR-ABA1 mediante PCR con gradiente de temperatura	16
Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	17
Clonación del producto de PCR de 133 pb usando el Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen)	17
Transformación de células competentes TOP10 y DH5 α de <i>E. coli</i> por electroporación	18
Extracción de DNA plasmídico: lisis alcalina	18
Extracción de RNA	19
Análisis tipo Northern blot para microRNAs	19
Northern Blot para mRNAs	20

Infiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> con <i>Agrobacterium</i>.	20
RESULTADOS	22
Análisis de las secuencias de RNAs pequeños de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	22
MiR-ABA1 se expresa como transcrito de 22 nt	25
Identificación del pre-miR-ABA1 en <i>Phaseolus vulgaris</i>	28
MiR-ABA1 se acumula en hojas de frijol infectadas con el virus del mosaico común de frijol (BCMV)	34
CONCLUSIONES	41
PERSPECTIVAS	42
ANEXOS	43
REFERENCIAS	47

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico (del inglés <u>A</u> bscicic <u>A</u> cid)
AGO	Argonauta
BCMV	Virus del mosaico común de frijol (del inglés <u>B</u> ean <u>C</u> ommon <u>M</u> osaic <u>V</u> irus)
dsRBD	Dominio de unión a RNA de doble cadena (del inglés <u>d</u> ouble <u>s</u> trand <u>R</u> NA <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
dsRNA	RNA de doble cadena.
EST	Marcador de secuencia expresada (del inglés <u>E</u> xpressed <u>S</u> equence <u>T</u> ag).
HC-Pro	Proteinasa componente-auxiliar (del inglés <u>H</u> elper <u>C</u> omponent- <u>P</u> roteinase)
LEA	Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (del inglés <u>L</u> ate <u>E</u> mbryogenesis <u>A</u> bundant)
miRNA	MicroRNA.
miRNA*	MicroRNA estrella, es la secuencia parcialmente complementaria al miRNA presente en el precursor.
nt	nucleótido(s)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena (del inglés <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
pre-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	miRNA primario
PTGS	Silenciamiento post-transcripcional de genes (del inglés <u>P</u> ost <u>T</u> ranscriptional <u>G</u> ene <u>S</u> ilencing)
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA (del inglés <u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds)
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (del inglés <u>R</u> NA <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex)
sRNA	RNA pequeño (del inglés <u>s</u> mall RNA)
siRNA	RNA pequeño de interferencia (del inglés <u>s</u> mall <u>i</u> nterference RNA)
snRNA	RNA nuclear pequeño (del inglés <u>s</u> mall <u>n</u> uclear RNA)
snoRNA	RNA nucleolar pequeño (del inglés <u>s</u> mall <u>n</u> ucleolar RNA)

RESUMEN

Dado nuestro interés en los mecanismos de regulación que participan en la respuesta de las plantas a estrés, en este trabajo se explora la participación de los microRNAs como moléculas reguladoras de este proceso; ya sea a través de vías dependientes o independientes del ácido abscísico (ABA).

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA pequeñas (19-24 nt) que participan en diferentes procesos como diferenciación celular, desarrollo, respuesta a estrés y cambios ambientales. En plantas, el miRNA se une de manera complementaria a su mRNA blanco lo que conlleva al corte o inhibición de la traducción del mismo. El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona vegetal que regula: la síntesis de proteínas y lípidos de almacenamiento, dormancia de la semilla, participa durante la tolerancia a la desecación y también regula muchas de las respuestas de la planta ante estrés hídrico causado por sequía, salinidad y frío. En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado algunos miRNAs de respuesta a estrés; sin embargo, se conoce poco al respecto en otras especies vegetales.

Utilizamos frijol como modelo de estudio de estrés hídrico por ser una planta de interés agrícola y alimenticio principalmente. Pensamos que es importante conocer cuáles miRNAs están involucrados en su adaptación a ambientes estresantes y si estos son específicos de leguminosas. En el laboratorio se han generado bibliotecas de RNAs pequeños a partir de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv Negro jamapa y Pinto Villa) tratadas con ABA y se han identificado miRNAs descritos en otras plantas, así como nuevos miRNAs. En este trabajo se analizó la expresión de uno de estos últimos, denominado miR-ABA1, en respuesta a sequía y a ABA. Mediante análisis tipo Northern blot se observó una mayor acumulación de miR-ABA1 en las condiciones de estrés analizadas con respecto a las plántulas control. Un análisis similar mostró que miR-ABA1 esta presente en otras leguminosas pero no en plantas como *A. thaliana*, *Nicotiana benthamiana* y *Oryza sativa*. Tomando como base la secuencia de miR-ABA1, se realizó una búsqueda en las bases de datos de marcadores de secuencias expresadas (ESTs), que nos permitió encontrar ESTs de *Glycine max*, *Medicago truncatula* y *Gossypium raimondii* que contienen la secuencia de miR-ABA1. El plegamiento de cada una de estas secuencias mostró una estructura secundaria con la secuencia de miR-ABA1 en uno de los brazos del tallo, lo que sugiere que el EST corresponde al precursor de miR-ABA1. Con la información obtenida de estos ESTs se clonó el precursor de miR-ABA1 a partir de

DNA genómico de frijol. La mayoría de los miRNAs de plantas se unen de manera casi perfectamente complementaria a su mRNA blanco. Por tanto, la predicción de los blancos de los miRNAs mediante una búsqueda por homología en las bases de datos de ESTs representa una alternativa para asignar las funciones biológicas de los miRNAs. Mediante los algoritmos BLAST y miRanda se logró predecir los blancos de miR-ABA1. Entre éstos se encontró un EST que contiene una región totalmente complementaria a miR-ABA1 y que codifica una proteína de “splicing” (U1-70k). Nuestros resultados sugieren que miR-ABA1 es un miRNA específico de leguminosas cuya abundancia se regula por la falta de agua, por lo que proponemos que sus blancos estarían involucrados en la respuesta a estrés hídrico.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo se pensó que los genes que tenían como producto un RNA no codificante (ncRNA), no tenían función alguna y por lo tanto, se consideraron como “fósiles moleculares” porque únicamente apoyaban la idea del origen de la vida a partir de RNA. Sin embargo, con el transcurso del tiempo se fueron descubriendo cada vez más RNAs no codificantes para proteínas (tRNA, rRNA, snRNA) y mediante el surgimiento de nuevas estrategias tanto computacionales como experimentales (Olivas et al., 1997; Argaman et al., 2001; Huttenhofer et al., 2001; Rivas et al., 2001; Wassarman et al., 2001) fue que se logró determinar que la función altamente especializada de estas moléculas. Con lo que surgió una nueva visión del “mundo del RNA” y se ha demostrado que algunas moléculas de ncRNA están involucradas en funciones que requieren de un reconocimiento secuencia-específico de otra secuencia de ácidos nucleicos (Bonnet et al., 2004).

El descubrimiento de los RNAs pequeños no codificantes data de 1990, cuando se describió el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) en plantas. Fue entonces que dos grupos de investigación (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990) reportaron que la sobreexpresión del gen que codifica para la chalcona sintasa (*CHS*) - que determina el color de las flores en las petunias- contrario a lo esperado, hacia que las plantas transgénicas produjeran flores blancas y no flores de un color morado más intenso; además observaron que en algunas de estas plantas transgénicas el nivel del RNA mensajero (mRNA) de *CHS* no cambiaba en el núcleo pero sí en el citoplasma y, que sólo el mensajero de *CHS* estaba degradado, lo que sugería fuertemente que el mecanismo se llevaba a cabo a nivel post-transcripcional y que además era del tipo secuencia-específico (Dalmay, 2006). A este fenómeno se le denominó “cosupresión” mismo que no encontró una explicación plausible en ese momento (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990). Posteriormente, se empleó el término silenciamiento génico post-transcripcional o PTGS (acrónimo del inglés Post Transcriptional Gene Silencing) para describir diferentes mecanismos de silenciamiento inducidos por transgenes, virus u otros factores. Varios años más tarde, se realizaron observaciones muy similares en *Caenorhabditis elegans* (Dalmay, 2006). En 1999 se descubrió una clase de RNAs pequeños de 25 nt en plantas de tomate que mostraban la inducción de PTGS de un gen endógeno, estos RNAs pequeños se detectaban sólo en las plantas que fueron silenciadas (Jones et al., 1999). Posteriormente, se encontraron RNAs de tamaño similar

en animales y hongos, a los cuales se les llamó siRNAs o RNAs pequeños de interferencia (Zamore et al., 2000; Catalanotto et al., 2002).

En 1993, dos grupos de investigación, uno dirigido por V. Ambros (Lee et al., 1993) y el otro por G. Ruvkun (Ruvkun et al., 2004), observaron que un RNA pequeño de 22 nt de longitud, derivado de un gen llamado *lin-4*, suprimía la expresión de *lin-14*, un gen que se encarga de controlar el tiempo de desarrollo larvario en *C. elegans*. Los resultados obtenidos mostraron que mutaciones en el locus de *lin-4* alteraban el tiempo de desarrollo larvario en *C. elegans* (Lee et al., 1993; Bonnet et al., 2004). Por lo que en 2001, *lin-4* fue reconocido como el fundador de una nueva clase de RNAs pequeños no codificantes a los que se les denominó microRNAs (miRNAs) (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001) y, a partir de ese momento se han identificado cientos de miRNAs en varios organismos, incluyendo nemátodos (*C. elegans*), insectos (*Drosophila melanogaster*), peces (*Danio rerio*) y mamíferos (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Homo sapiens*) (Zhang et al., 2006). Sin embargo, tuvieron que transcurrir 10 años a partir del descubrimiento de los miRNAs en animales para que los miRNAs fueran identificados en plantas. En 2002, diversos grupos descubrieron varios miRNAs de plantas, mediante la clonación de RNAs pequeños, (Jones, 2002; Llave et al., 2002; Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Rhoades et al., 2002; Zhang et al., 2006). Algunos años después, las nuevas tecnologías aplicadas a la secuenciación, reemplazaron a las técnicas de secuenciación tradicionales. Así, por ejemplo Lu et al. (2005a) empleó el método de secuenciación masiva en paralelo para identificar RNAs pequeños en *Arabidopsis*. Otro método de secuenciación masiva es la “pirosecuenciación” que al igual que la secuenciación masiva en paralelo, permite obtener en un sólo análisis miles de secuencias a partir de distintas plantas, de mutantes, de tejidos y/o a partir de distintos estadios del desarrollo (Vazquez et al., 2004b; Xie et al., 2005; Alvarez et al., 2006).

Biogénesis de los microRNAs

Los RNAs pequeños se encuentran ampliamente distribuidos tanto en eucariontes como en procariontes. Se pueden agrupar dentro de dos categorías: miRNAs y siRNAs, los cuales se distinguen por su biogénesis más que por su acción (Mallory & Vaucheret, 2006) Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante, la mayoría de 19-24 nucleótidos de longitud, mismos que se encargan del silenciamiento post-transcripcional de los transcritos de los genes que tienen como blanco (Willmann & Poethig, 2007).

La síntesis de un miRNA se inicia en el núcleo, en donde es transcrito por la RNA Polimerasa II a partir de un gen (Lee et al., 2004), por lo que se encuentra poliadenilado en el extremo 3', y tiene un cap en el extremo 5', el cap es una metilación que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosina (Fig. 1). Además, se ha visto que los miRNAs no sólo pueden originarse a partir de las regiones traducibles de un gen (exones), sino que también pueden provenir de los intrones de algunos genes (Chiou et al., 2006). A este transcrito, el cual contiene una estructura de tallo-asa se le denomina transcrito primario del miRNA (pri-miRNA), (éste proceso ocurre tanto en animales como en plantas). En animales, esta estructura es procesada por una enzima llamada Drosha, una RNasa de tipo III que requiere de una proteína que posee un dominio de unión a RNA de doble cadena (dsRBD), conocida como Pasha en *Drosophila*, Pash-1 en *C. elegans* y DGCR8 en mamíferos (Denli et al., 2004; Han et al., 2004a; Landthaler et al., 2004), para poder procesar eficientemente el pri-miRNA y liberar una estructura de tallo-asa de ~70 nt, que será el precursor del miRNA (pre-miRNA). Esta estructura tiene un fosfato en el extremo 5' y en el extremo 3' quedan dos nucleótidos sobresalientes, que es una característica de un corte hecho por una RNasa de tipo III.

El corte por Drosha define tanto el extremo 5' como el extremo 3' del miRNA maduro (Lecellier et al., 2005). El pre-miRNA es translocado del núcleo al citoplasma por la Exportina5/RanGTP, que reconoce de manera específica la estructura del precursor. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por Dicer (RNasa de tipo III), para lo cual requiere de una proteína acompañante con un dominio de unión a RNA de doble cadena, Loquacious (Loqs) en *Drosophila* y TRBP en humanos. El corte por Dicer es en ambas cadenas, por lo que se libera una cadena doble de RNA de ~21 nt, la cual tiene la misma estructura de un siRNA de cadena doble, a excepción de que el miRNA está apareado parcialmente a una secuencia complementaria llamada miRNA*, que se encuentra en el brazo opuesto del tallo del pre-miRNA (Willmann & Poethig, 2007), formándose así el dúplex miRNA:miRNA*. A partir de este dúplex se selecciona una de las cadenas – la del miRNA – que va a asociarse al complejo de silenciamiento (RISC), mientras que la hebra del miRNA* va a ser degradada (Lecellier et al., 2005). El que una de las dos hebras del dúplex se degrade y la otra no depende de la estabilidad termodinámica de los extremos del dúplex miRNA:miRNA*, es decir, la cadena cuyo extremo 5' sea menos estable que correspondería a la del miRNA maduro, va a ser la que se asocia al complejo RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Dicha inestabilidad termodinámica está dada por dos factores, el primero es que los miRNAs

tienden a empezar con un uracilo y, el segundo son los apareamientos que generan pequeñas burbujas presentes en estos dúplex. Es interesante mencionar que estas estructuras son importantes en estas moléculas; ya que favorecen la unión de la hebra del miRNA maduro con el complejo RISC (Lecellier et al., 2005), cuyo principal componente es una proteína que forma parte de la familia de proteínas llamada Argonauta 1 (AGO 1).

Todos los miembros de esta familia poseen un dominio central llamado PAZ y un dominio carboxilo terminal llamado PIWI, este último tiene una estructura tridimensional muy parecida a la de la RNasa H (que es la enzima encargada de cortar la cadena de RNA en un híbrido de RNA-DNA) por su actividad de endonucleasa (Rivas et al., 2005). El número y la diversidad de proteínas AGO difiere entre los organismos; por ejemplo, en levadura (*Schizosaccharomyces pombe*, sp.) sólo se ha identificado una proteína AGO, mientras que en los insectos (*D. melanogaster*) se han reconocido dos, en mamíferos (*Homo sapiens*) existen cuatro y en los nemátodos (*C. elegans*) se han encontrado cinco.

El proceso de maduración de los miRNAs difiere en las plantas con respecto a lo que sucede en los animales debido a que no se tiene un homólogo de Drosha, pero se ha demostrado que Dicer-Like 1 (DCL1) que también es una RNasa de tipo III, es la enzima encargada de cortar el pri-miRNA (Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Matzke et al., 2004; Xie et al., 2004) y liberar el pre-miRNA que en plantas presentan longitudes variables. Como en el caso de los animales, en las plantas DCL1 necesita de una proteína que tenga un dominio de unión a RNA de doble cadena para procesar eficientemente al pri-miRNA, esa proteína es HYL1 (Han et al., 2004b; Matzke et al., 2004; Vazquez et al., 2004a). Una vez que se ha formado el pre-miRNA, DCL1/HYL1 procesan nuevamente dicha estructura para dar lugar al dúplex miRNA:miRNA* (Fig. 1). A diferencia de los miRNAs de animales, los miRNAs de plantas son metilados por una proteína llamada HUA ENHANCER 1 (HEN1) en los extremos 3' (Yu et al., 2005). Esta enzima contiene dos dominios de unión a RNA de doble cadena y se está conservada en hongos (Park et al., 2002). Posteriormente el dúplex miRNA:miRNA* es exportado del núcleo al citoplasma por HASTY (HST), un ortólogo de la Exportina 5 (Lecellier et al., 2005; Park et al., 2005). El miRNA maduro se va a unir al complejo de silenciamiento, llamado RISC (Hammond et al., 2000). En *A. thaliana* se han identificado 10 proteínas AGO, en tanto que en arroz (*Oryza sativa*) se han descrito 18 (Morel, 2002 y Nonomura, 2007), de las cuales se ha visto que sólo AGO1 es requerida para unirse al miRNA y "llevarlo" a su mRNA blanco para catalizar su degradación (Vaucheret et al., 2004; Vazquez et al., 2004b; Baumberger & Baulcombe, 2005; Qi et al., 2005); en el caso de los animales, la gran mayoría de los

miRNAs inhiben la traducción del mRNA, más que promover su degradación, mientras que en las plantas sucede lo contrario, debido a que principalmente tienen una complementariedad casi perfecta con su blanco (Bartel, 2004).

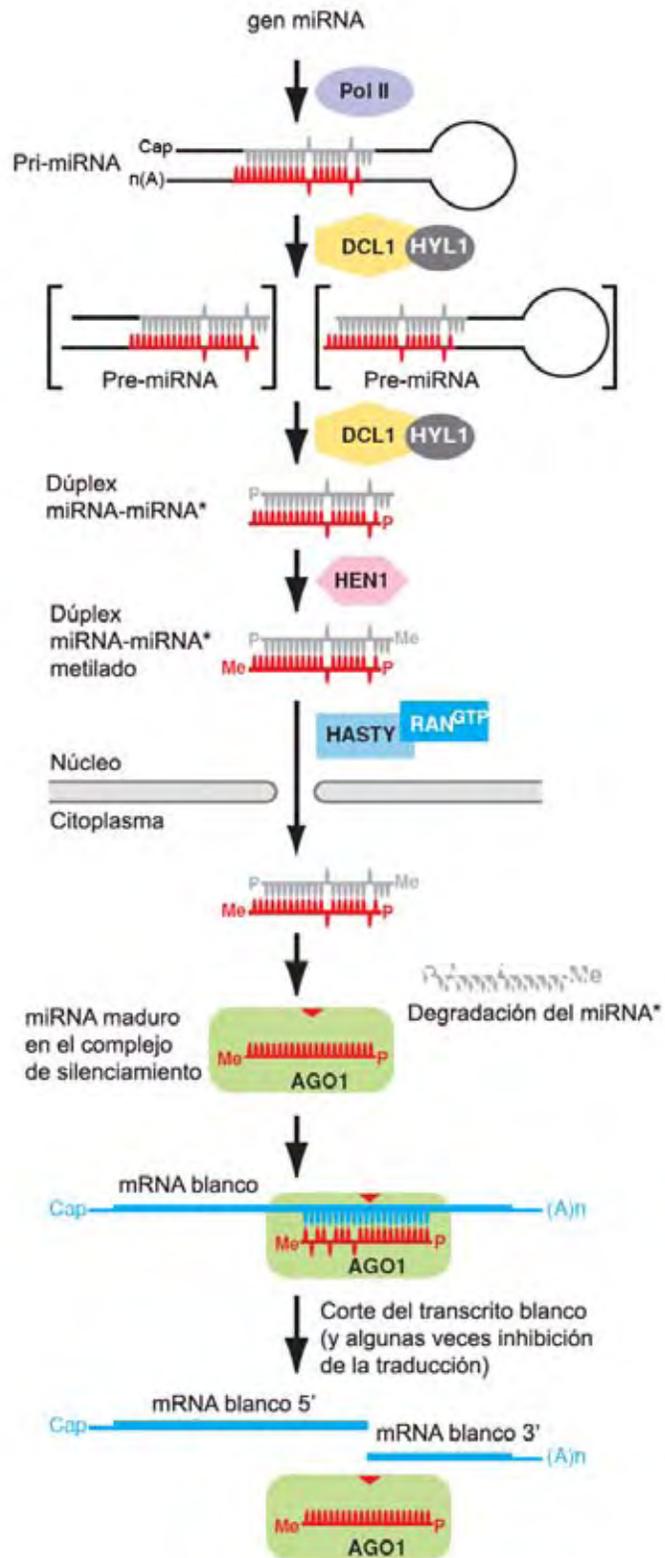


Figura 1. Biogénesis de los microRNAs en plantas (Jones-Rhoades et al., 2006).

Los microRNAs de plantas y la respuesta a estrés

Debido a que las plantas son organismos de naturaleza sésil, es decir, que no pueden “moverse” para evadir situaciones de estrés tienen que contender con las cambiantes condiciones del medio ambiente en el cual se desarrollan (Lu & Huang, 2008). El déficit hídrico es uno de los factores ambientales más comunes que interfiere tanto con el desarrollo como con el crecimiento normal de las plantas. Además, éste es el principal componente de distintos estreses, tales como: la sequía, la salinidad y las temperaturas bajas por lo que tiene un efecto negativo significativo en la productividad de las plantas (Bray, 1997; Colmenero-Flores et al., 1997). Sin embargo, cabe hacer notar que el déficit hídrico es un componente normal en algunos procesos del desarrollo en las plantas, como ocurre durante el desarrollo de la semilla o del polen (Bray, 1997).

Dentro de la diversidad de respuestas de las plantas para adaptarse al déficit hídrico está la inducción específica de genes; algunos de los cuales se expresan durante el proceso de embriogénesis cuando ocurre la desecación de la semilla y los embriones entran en un periodo de dormancia (Colmenero-Flores et al., 1997) para posteriormente, poder germinar cuando las condiciones del medio les sean favorables. Por ello, las plantas tuvieron que desarrollar mecanismos finamente regulados, tanto moleculares como bioquímicos para contender con los cambios en la disponibilidad de agua, ya sea ocasionados por el medio ambiente o por sus requerimientos en programas de desarrollo. La duración de la respuesta a dicho evento va a depender del tipo de estrés al cual se encuentren sometidas, a la duración del mismo y a su severidad (Bray, 1997).

Las respuestas a condiciones de estrés en las plantas están reguladas por múltiples vías de señalización (Singh et al., 2002). Una de las principales vías que participan durante la respuesta a estrés por sequía es la mediada por la fitohormona ácido abscísico (ABA) (Bray, 1993). ABA regula muchos de los aspectos agronómicamente importantes del desarrollo de la planta que incluyen la síntesis de proteínas de almacenamiento y lípidos en la semilla, promueve la tolerancia a la desecación y la dormancia de la semilla, y también regula las fases de transición de embrión a crecimiento vegetativo y de crecimiento vegetativo a reproductivo (Finkelstein et al., 2002). Además, regula algunos aspectos de las respuestas fisiológicas ante estrés ambiental como la sequía o la inducción osmótica del cierre de estomas, la inducción a la tolerancia a distintos tipos de estrés causados por sal, hipoxia, déficit hídrico y frío, y en respuesta a heridas o a patógenos (Finkelstein et al., 2002).

La aplicación exógena de ABA a tejidos vegetativos no estresados puede simular (en cierta medida) los efectos de la sequía en las plantas, incluyendo la inducción de genes de respuesta a déficit hídrico (Bray, 1993). La inducción de genes de respuesta a estrés ocurre principalmente a nivel transcripcional y la regulación espacial y temporal de los patrones de expresión forma parte primordial de la respuesta de las plantas al estrés (Singh et al., 2002). Entre aquellos genes que se inducen en respuesta a estrés hídrico, se encuentran los que codifican para un grupo de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés) que forman parte de un grupo más amplio llamado hidrofilinas (Garay-Arroyo et al., 2000). Estas fueron descritas por vez primera hace ya más de 20 años, en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*), como aquellas que se acumulaban en altas concentraciones en los embriones, durante la etapa tardía del desarrollo de la semilla, es decir, antes de la desecación (Hundertmark & Hinch, 2008). Las proteínas LEA también se acumulan en tejidos vegetativos expuestos a ABA exógeno, así como a deshidratación, estrés osmótico y bajas temperaturas (Soulages et al., 2002).

Se ha visto que los miRNAs de plantas tienen como blanco genes involucrados en la señalización por hormonas, en el metabolismo, en la transcripción o incluso en su propia maquinaria de biosíntesis y en respuesta a estrés biótico y abiótico (Zhang et al., 2005; Willmann & Poethig, 2007). En 2004, Jones-Rhoades y Bartel identificaron un grupo de miRNAs nuevos conservados en *A. thaliana* y *O. sativa*. Así mismo, pudieron predecir los blancos de dichos miRNAs que, en su mayoría, correspondían a factores de transcripción relacionados con el desarrollo; sin embargo, se encontraron con que algunos de estos miRNAs tienen como blanco genes relacionados con la respuesta a condiciones de estrés tales como: superóxido dismutasa, lacasas y ATP sulforilasas. Un caso particular es el de miR395 que mostró una mayor expresión en condiciones de deficiencia de sulfato, lo cual indicaba que los miRNAs también podían inducirse en respuesta a condiciones ambientales (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Dalmay, 2006). Esto permitió entonces que más miRNAs regulados por condiciones de estrés ambiental fuesen intencionalmente identificados. En ese mismo año Sunkar y Zhu lograron clonar RNAs pequeños a partir de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a diversos tipos de estrés abiótico lo que les permitió identificar miRNAs que presentaban patrones de expresión diferenciales (Sunkar & Zhu, 2004). Por ejemplo, miR393 se inducía fuertemente por tratamientos por frío, deshidratación, NaCl y ABA; miR397b y miR402 se inducían poco con los mismos tratamientos, mientras que miR319c sólo se inducía por frío pero no por el

resto de los tratamientos; sin embargo, miR389a se regulaba negativamente por todos los tratamientos (Phillips et al., 2007). Posteriormente, Reyes y Chua demostraron que miR159 se acumula en respuesta a ABA durante la germinación de semillas de *Arabidopsis* y regula los transcritos de MYB101 y MYB33, tanto *in vitro* como *in vivo* (Reyes & Chua, 2007). También se demostró que los niveles de miR159 también estaban modulados por ácido giberélico (GA) durante el desarrollo de las anteras (Achard et al., 2004). Esta no es la única función de los miRNAs en la respuesta adaptativa de las plantas al medio ambiente, ya que también se ha demostrado su participación en la adaptación a estrés mecánico (Lu et al., 2005b).

ANTECEDENTES

Bibliotecas de RNAs pequeños

A partir del descubrimiento de RNAs pequeños antisentido asociados al silenciamiento post-transcripcional en plantas, inducido por transgenes y en respuesta a una infección viral (Jones et al., 1999), varios grupos de investigación demostraron que los RNAs pequeños, incluidos los miRNAs, podían ser identificados mediante su clonación y secuenciación a partir de la separación por tamaño de RNA total (Elbashir et al., 2001; Lau et al., 2001), esta técnica se empleó en la identificación de miRNAs de animales (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee & Ambros, 2001). Esta metodología consiste en la ligación secuencial de adaptadores a los fragmentos de RNA aislados y purificados de un gel de acrilamida; el RNA ligado en sus extremos a los adaptadores, se usa para llevar a cabo una reacción de transcripción reversa (RT), después de la cual el cDNA generado es utilizado en reacciones de PCR (acrónimo del inglés Polymerase Chain Reaction) para amplificar los fragmentos de interés. Una vez realizada la reacción de PCR, se concatenan varios fragmentos de cDNA, esto con la finalidad de obtener varias secuencias en un mismo vector, que se clonan y se secuencian (Fig. 2) (Alonso et al., 2003).

En nuestro laboratorio, se han identificado una serie de posibles miRNAs nuevos en frijol, provenientes de una biblioteca de RNAs pequeños generada a partir de plántulas de frijol sometidas a tratamientos de sequía (Arenas *et al.* sometido). Posteriormente, se continuó con la búsqueda de otros miRNAs presentes en frijol mediante la construcción de otra biblioteca ahora a partir de plántulas tratadas con ABA. Lo que sentó la base para realizar el presente trabajo a partir de la realización del análisis de las secuencias obtenidas de dicha biblioteca. Adicionalmente en nuestro laboratorio, se han desarrollado una serie de herramientas experimentales que permiten avanzar en el estudio de estos miRNAs en frijol. Ejemplos de estas herramientas son: la construcción de vectores con genes reporteros para determinar la actividad de un determinado miRNA sobre su mRNA blanco, o bien, el uso de raíces transgénicas de frijol, generadas con *Agrobacterium rhizogenes*, para analizar la funcionalidad de los miRNAs.

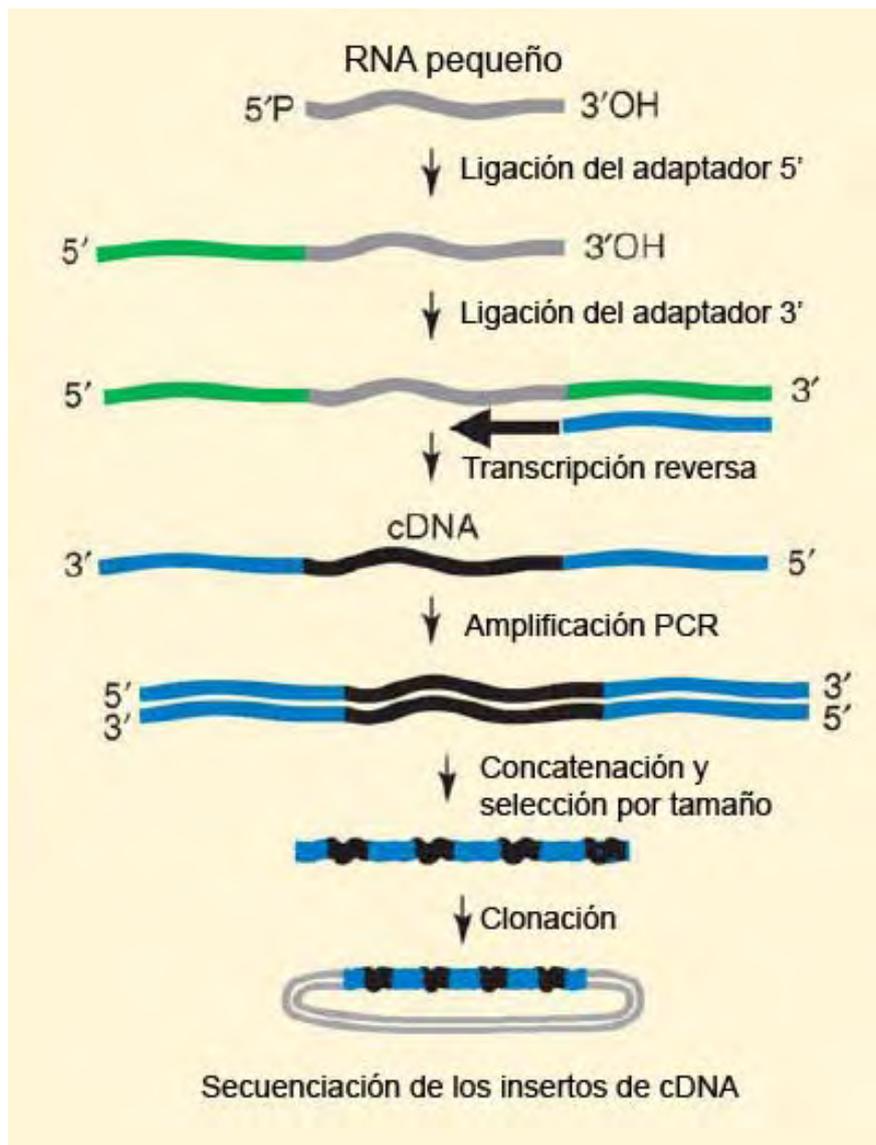


Figura 2. Bibliotecas de RNAs pequeños. A partir de la extracción de RNA total mediante una electroforesis en acrilamida se seleccionan por tamaño los RNAs pequeños (20-22nt), a los cuales se les ligan unos adaptadores en ambos extremos para posteriormente realizar una reacción de transcripción reversa y amplificar los fragmentos obtenidos mediante PCR que posteriormente se concatenan y se clonan en un vector para tener un mayor número de secuencias por clona (Alonso et al., 2003).

HIPÓTESIS

- *Phaseolus vulgaris* codifica microRNAs (especie-específicos) que son importantes en la respuesta a la limitación de agua.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Aislar y caracterizar un microRNA de frijol expresado en respuesta al ácido abscísico (ABA).

Objetivos particulares

- ❖ Analizar las secuencias obtenidas de la biblioteca de RNAs pequeños construida a partir de plántulas de frijol tratadas con ABA.
- ❖ Identificar y caracterizar un RNA pequeño que cumpla con las características de los miRNAs.
- ❖ Determinar los niveles de expresión del miRNA en algunas condiciones de déficit hídrico (sequía) o por tratamiento con ABA.
- ❖ Investigar la presencia del miRNA en otras leguminosas y plantas modelo.
- ❖ Aislar el precursor del miRNA de frijol.
- ❖ Identificar el blanco del miRNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la biblioteca de RNAs pequeños generada anteriormente en el laboratorio, durante el proyecto de tesis de doctorado de la estudiante Catalina Arenas Huertero (Posgrado en Ciencias Bioquímicas, IBT-UNAM) se estableció una estrategia experimental para cumplir con los objetivos del presente trabajo. La biblioteca con la que se trabajó se obtuvo a partir de plántulas de frijol de cuatro días sometidas a un tratamiento durante 12 y 24 hrs con ABA 100 μ M, utilizando el método previamente descrito (Elbashir et al., 2001) como se ilustra en la Figura 2.

Búsqueda en las bases de datos de ESTs y predicción de la estructura secundaria de las secuencias de ESTs

Las secuencias obtenidas de la biblioteca de RNAs pequeños se analizaron con el programa 4Peaks (<http://mekentosj.com/4peaks/>). Todas las secuencias extraídas de las bibliotecas con una longitud mayor o igual a 18 nt se compararon utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que se encuentra disponible en el servidor del NCBI (National Center for Bio**te**chnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). La búsqueda se realizó utilizando las bases de datos de ESTs y de nr para el subgrupo Viridiplantae mediante Blastn 2.2.18 (Zhang et al., 2000)

El método de BLAST permite buscar secuencias homólogas, para lo cual considera la identidad o similitud entre ellas, misma que se expresa con el valor de E que determina la probabilidad de que la similitud entre dos secuencias sea azarosa, así que mientras más cercano sea este valor a cero, éste es más significativo (Altschul et al., 1997). Para las secuencias de ESTs que tuvieron un mejor apareamiento (apareamientos entre nucleótidos n/n , $n-1/n$, $n-2/n$ y $n-3/n$, en donde n es igual a la longitud de la secuencia de interés) y que correspondían a alguna especie de la familia Leguminosae, se predijo y generó la estructura secundaria, usando el programa mFold 3.2 que se encuentra disponible en la siguiente dirección <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold> (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003). Las estructuras secundarias se analizaron manualmente, para localizar la ubicación de la secuencia del posible miRNA. La predicción de los blancos se realizó mediante la búsqueda de secuencias complementarias a la secuencia del RNA pequeño, en la base de datos de ESTs, así

como también se realizó otro análisis utilizando el algoritmo de miRanda (Enright et al., 2003) el cual se modificó un poco, ya que este programa fue diseñado para predecir blancos en animales.

Material vegetal

Se utilizaron distintos órganos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de las variedades Negro Jamapa y Pinto villa: semillas, embriones, plántulas y hojas. Semillas de *Medicago. truncatula*, hipocótilo y raíz de plántulas de *Glycine. max*, *Arachis hypogea*, *Pisum sativum*, *Nicotiana. benthamiana*, *Oryza. sativa*, *Acacia cochliacanta* y *Arabidopsis. thaliana*.

Germinación

Las semillas se lavaron con una solución de cloro 50% (v/v) con Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0.5%, durante 3 minutos, y se enjuagaron con agua destilada para retirar el exceso de cloro. Posteriormente se cubrió el fondo de una charola con toallas de papel humedecidas con agua destilada estéril sobre las cuales se colocaron las semillas y se les agregó un poco más de agua, se cubrieron las charolas con papel aluminio, y se pusieron a germinar en un cuarto de crecimiento en condiciones de oscuridad a una temperatura de 28°C, durante cuatro días; una vez transcurrido este tiempo, se colectaron las plántulas que tenían un tamaño similar. Este mismo procedimiento se realizó para las semillas de las otras especies; sin embargo, para aquéllas cuyas semillas son muy pequeñas, éstas se pusieron a germinar en cajas de Petri a las cuales se les colocó papel filtro en el fondo.

Tratamiento con ácido abscísico (ABA)

Durante este tratamiento, las plántulas de frijol de 4 días de germinación seleccionadas se transplantaron a vermiculita y se les agregó la misma cantidad de agua (5 ml/ gr. vermiculita) tanto a las plántulas control como a las que fueron sometidas al tratamiento. A las plántulas que fueron sometidas al tratamiento con ABA (Sigma) se les agregó la fitohormona en una concentración final de 100µM. Se permitió que la vermiculita absorbiera toda el agua posible para estar en capacidad de campo y posteriormente se retiró el exceso de agua. Las charolas se pesaron diariamente, agregando agua para

reponer el volumen perdido mediante evaporación. Dichas plántulas se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 27°C durante 36 horas y colectando tejido en distintos tiempos (0, 2, 12, 18, 24 y 36 horas) posteriores al inicio del tratamiento. El tejido colectado (hipocótilo y raíz) se congeló de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta ser utilizado.

Tratamiento de sequía moderada

Las condiciones de limitación de agua se impusieron a plántulas de frijol de 4 días de germinación que fueron transplantadas a vermiculita con cantidades distintas de agua. En el caso de las plántulas control, se les agregaron 5 ml de agua destilada estéril por cada gramo de vermiculita, mientras que a las plántulas sometidas a sequía, se les agregó la doceava parte del agua agregada a las plántulas control (415µl/gr. de vermiculita). Las plántulas se mantuvieron en oscuridad durante 48 horas a una temperatura de 27°C, colectando material vegetal a las 0, 12, 18, 24, 36 y 48 horas respectivamente posteriores al inicio del tratamiento. Únicamente se colectaron el hipocótilo y la raíz, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Tratamiento de sequía severa

En este caso las plántulas control se mantuvieron en la charola en la cual se pusieron a germinar y se les mantuvo bien irrigadas (>89% de humedad relativa) mientras que las plántulas que fueron sometidas al tratamiento por sequía severa se mantuvieron en una charola durante 12 hrs. con humedad controlada (~60%). Ambas plántulas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 27 °C. Se colectaron únicamente el hipocótilo y la raíz los cuales inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70°C hasta su uso. El tejido se colectó a las 2, 4, 8 y 12 horas posteriores al inicio del tratamiento.

Extracción de DNA genómico para PCR

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Lukowitz et al. (2000). Se maceró en mortero y con nitrógeno líquido el tejido de la planta

a utilizar, y se colocó un poco (~50-100mg de tejido molido) en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se agregó 300 µl de amortiguador CTAB 2X (2% (w/v) / NaCl 1.4M / Tris-HCl pH 8.0 100mM / EDTA 20mM), se mezcló con vórtex y se dejó incubando durante varias horas (~2 hrs.) a 65°C, una vez transcurrida la incubación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 300 µl de cloroformo frío, se mezcló con vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf limpio y se le agregaron 300 µl de isopropanol frío se mezcló invirtiendo el tubo y se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad. Se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó muy bien con 500 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad. Se removió cuidadosamente el etanol y se dejó secar la pastilla durante 5-10 minutos a 45°C, una vez transcurrido este tiempo se resuspendió la pastilla en 100 µl de agua MQ fría y estéril.

Amplificación del precursor de miR-ABA1 mediante PCR con gradiente de temperatura

Se diseñaron oligonucleótidos (Anexos, Tabla 1) con base en el alineamiento de las secuencias de *G. max* y *M. truncatula* reportadas en la base de datos de ESTs, los cuales se usaron sobre DNA genómico de frijol (extraído de hojas) y, mediante reacciones de PCR en gradiente de temperatura, se obtuvo un fragmento de ~133 bp con los oligonucleótidos miRA1-c1 y miRA1-sAS1 (Anexos, Fig. S1), una vez obtenida la banda del tamaño esperado, se realizó una segunda reacción de PCR de mayor volumen (100 µl) con el cual se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% del cual se cortó la banda de interés y se purificó. El DNA obtenido se almacenó a 4°C para su posterior uso. Las condiciones del PCR fueron las siguientes:

		94°C	3 minutos
35 ciclos	}	94°C	30 seg.
		61°C	30 seg.*
		72°C	30 seg.
		72°C	3 minutos

*Esta es la temperatura a la cual se obtiene un producto de amplificación único más definido, y se determinó mediante un PCR en gradiente de temperatura, basado en la Tm de los oligos. Las temperaturas usadas fueron: 56, 58, 61, 64 y 67°C.

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Se escindió el fragmento del gel con la banda de interés y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml que se guardó a -70°C durante 10 minutos. Se perforó un tubo eppendorf de 500 µl y se colocó un poco de poliéster en el fondo del mismo, a su vez este tubo se colocó dentro de otro de 1.5 ml. Se introdujo la banda en el tubo previamente perforado y se centrifuga durante 10 mins. a 7500 rpm. Se añadió al sobrenadante 1µl de glucógeno (20µg/µl), la mitad del volumen de acetato de amonio (7.5 M), 3 volúmenes de etanol al 100% y se colocó una hora en hielo ó una hora a -20°C ó 30 minutos a -70°C, o bien se dejó toda la noche a -20°C. Después se centrifugó 15 minutos a 4°C a 14,000 rpm. Se quitó el sobrenadante y la pastilla se lavó con la mitad de volumen de etanol al 70%. Se centrifugó 3 mins. a 14,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar por unos minutos. Finalmente se resuspendió en un volumen apropiado (aproximadamente ¼ del volumen inicial) con H₂O o con TE (Tris-HCl pH7.5 10mM, EDTA 1mM).

Clonación del producto de PCR de 133 pb usando el Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen)

Para la clonación del producto de PCR se utilizó el vector TOPO. La clonación se llevó a cabo preparando la siguiente reacción de clonación.

E. coli electrocompetentes

Reactivo	Volumen
Producto de PCR fresco	2.0 µl
Solucion de sal diluida 1:4	0.5 µl
Vector TOPO	0.5 µl
Volumen final	3.0 µl

La reacción de clonación se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo la reacción se colocó en hielo y se realizó la transformación de las células, para lo cual se utilizaron 1.5 – 2.0 µl de la reacción de clonación.

Transformación de células competentes TOP10 y DH5 α de *E. coli* por electroporación

Las células competentes se dejaron descongelar inmersas en hielo. Se agregaron 1.5 – 2.0 μ l de la reacción de clonación a las células y se mezcló cuidadosamente. Se transfirió a una celda de 0.4 cm evitando formar burbujas y se sometieron a un choque eléctrico de 2.5 V en un electroporador (Bio-Rad), inmediatamente después de dar el choque eléctrico se les agregaron 250 μ l de medio SOC (peptona tripsica de caseína 20g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 0.58 g/l, KCl 0.19 g/l MgCl₂ + MgSO₄ 20mM, glucosa 20 mM) a las células. Se transfirió la solución a tubos eppendorf y se recuperaron las células durante 1 hora a 37°C con agitación constante, esto para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibiótico. Transcurrido el tiempo de recuperación de las células, se sembraron 125 μ l de dichas células en cada caja Petri de LB sólido con kanamicina (35 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Extracción de DNA plasmídico: lisis alcalina

Se inocularon 5 ml de medio LB al cual se le agregó el antibiótico para el cual tiene resistencia la cepa usada y se crecieron a 37°C toda la noche. Se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de solución I (Glucosa 50 mM; Tris-HCl pH 8.0 25mM; EDTA 10 mM y RNasa 10 μ g/ml) y una vez resuspendida se añadieron 200 μ l de solución II (NaOH 0.2N y SDS 1%) recién preparada, se mezcló por inversión hasta obtener una solución viscosa y clara, la cual se incubó a temperatura ambiente por no más de 3 minutos. En seguida se agregaron 150 μ l de solución III (Acetato de potasio 3 M y ácido acético 11.5%) y se mezcló invirtiendo los tubos hasta que se formó un precipitado blanco de SDS-proteína. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. En este paso el volumen del sobrenadante debe ser de ~400 μ l, al cual se le agregaron 100-120 μ l de acetato de amonio 10M, cuya concentración final deberá ser de 2-2.5M, se mezcló invirtiendo los tubos. Se agregaron ~500 μ l de isopropanol, se invirtieron los tubos varias veces para mezclar y se centrifugó durante 3 minutos. El sobrenadante se decantó y se adicionó 1 ml de etanol 70% a la pastilla obtenida y se

mezcló por inversión. Se centrifugó 3 minutos y el sobrenadante se decantó. Los tubos se colocaron sobre una toalla de papel para quitar el etanol que pudo haber quedado en los tubos y la pastilla se secó en durante 3-5 minutos a 60-65°C y una vez que la pastilla se tornó translúcida se resuspendió en 30-50 μ l de amortiguador TE (Engbrecht et al., 2001).

Cuando las muestras se enviaron a secuenciar se empleó el Kit comercial QIAprep Spin miniprep (QIAGEN) para la extracción de DNA.

Las muestras se llevaron a la Unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología.

Extracción de RNA

La obtención de RNA total se realizó usando TRIZOL (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial, con las siguientes modificaciones: el paso de lavado final con etanol al 70% se sustituyó por un lavado con etanol al 100% y se resuspendió en 30-40 μ l de formamida 100%. Todo el procedimiento se llevó a cabo usando tubos siliconizados.

Análisis tipo Northern blot para microRNAs

Se preparó un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15%, urea 7M en TBE 1X, y se corrieron ~10 μ g de RNA total en amortiguador TBE 0.5X a 30mA, durante 40 minutos aproximadamente. Posteriormente se realizó una transferencia en semi-seco, utilizando una membrana de nylon "Hybond-N+" (Amersham), durante 35 minutos a 100mA con amortiguador TBE 0.5x. Una vez terminada la transferencia, se fijó el RNA a la membrana con luz UV en un Stratalinker-UV usando las condiciones estándar, tres veces. La membrana se prehibridó con solución Ultrahyb-Oligo (Ambion) por lo menos durante 1hr a 42°C (10ml de solución por cada membrana de 10x10cm) para evitar hibridaciones inespecíficas. La hibridación se realizó durante toda la noche (por lo menos 10 horas), bajo las mismas condiciones que la prehibridación, a la cual se agregó la sonda marcada radioactivamente. Después de la hibridación, la membrana se lavó dos veces con SSC 2X /SDS 0.1% durante 30min a 42°C y se expuso en una película o en una pantalla sensible a fósforo y la señal fue detectada usando el Typhoon 9410 (Amersham) y cuantificada con el software Image Quant.

Para el marcaje de la sonda se preparó la siguiente reacción en hielo: 4-5 μl γP^{32} -ATP (13 o más pmol de ATP), 1 μl Oligonucleótido (10 pmol) ASmiR-ABA1 (ver tabla 1), 1 μl 10x amortiguador, 1 μl T4 cinasa de polinucleótido (NEB) y se agregó H_2O para tener un volumen final de 10 μl , la reacción se incubó a 37°C durante una hora, una vez transcurrido este tiempo, se purificó la sonda, usando una columna de sephadex G25 (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Northern Blot para mRNAs

Se preparó un gel de agarosa al 1% en MAE 1x (MOPS 0.2M/Acetato sódico 50 mM y EDTA pH7.0 10mM) y formaldehído (2.2%). Se cargó la misma cantidad de RNA de cada una de las muestras, con amortiguador de carga (azul de bromofenol, xilencianol, formamida 95%, EDTA 5% y bromuro de etidio). Las muestras se separaron a 80 V constantes con amortiguador MAE 1x hasta que el frente de corrida alcanzó tres cuartas partes del gel. Posteriormente se transfirió a una membrana de nylon "Hybond-N+" (Amersham) por capilaridad durante toda la noche, con SSC 20x (NaCl 3M/Citrato de sodio 0.3M) como solución de transferencia. Una vez transcurrida la transferencia, se fijó el RNA a la membrana con el Stratalinker-UV usando las condiciones estándar, tres veces. Se tiñó la membrana con azul de metileno para verificar la integridad del RNA. Posteriormente se prehibridó la membrana usando un amortiguador de hibridación de fosfatos (PSE) durante una hora. Dicho amortiguador contiene SDS 7% /Fosfato sódico pH 7.2 0.3M y EDTA 1mM, se prepara un stock 10X y se utiliza 1X. La sonda se marcó radiactivamente con [$\gamma^{32}\text{P}$] dCTP usando el kit RediPrime II Random Primer Labelling System (Amersham). Una vez transcurrido el tiempo de prehibridación, se agregó la sonda marcada al amortiguador de hibridación de fosfatos (PSE) y se dejó hibridando toda la noche a 64°C. Después, de la hibridación, se lavó la membrana dos veces durante 30 minutos con SSC 2x/SDS 0.1% a 64°C y se expuso en una película o en una pantalla sensible a fósforo y la señal fue detectada usando el Typhoon 9410 (Amersham) y cuantificada con el software Image Quant.

Infiltración de hojas de *N. benthamiana* con *Agrobacterium*.

La construcción de DNA utilizada para este experimento se realizó utilizando el sistema Gateway (Invitrogen) para sobreexpresión en plantas y se utilizó el vector binario

pBA-DC (Anexos, Fig. S3) para la expresión transitoria en *N. benthamiana* como se describe en Zhang et al, 2006.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* c58 se sembró en cajas Petri con medio LB que contenía el antibiótico de selección apropiado. De las colonias que crecieron se inocularon 3ml en medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección adecuado y se crecieron durante 48 horas a 28°C con agitación constante (300 rpm). De estos cultivos se tomó 1 ml y se transfirió a un matraz con 50 ml de medio LB con 10mM MES pH 5.6 y se le añadieron 20 µl de acetosiringona 100 mM. Las bacterias se dejaron crecer durante 16 horas a 28°C. Una vez que las bacterias alcanzaron una $O.D._{600} = 1$ se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm, la pastilla obtenida se resuspendió en 50 ml de $MgCl_2$ 10 mM y 75 µl de acetosiringona 100 mM y las bacterias se dejaron incubando a temperatura ambiente y sin agitación durante 3 horas.

La infiltración se realizó utilizando jeringas de 3 ml (sin aguja). Se escogieron las hojas más anchas, la jeringa se colocó en el haz de la hoja y se presionó un poco colocando un dedo en el envés de la hoja, y se presiona (empuja) el émbolo de la jeringa, la suspensión con *Agrobacterium* entonces se empezó a filtrar en el espacio intracelular de la hoja. Una vez concluida la infiltración, las plantas se dejaron en una cámara con luz durante 48 hrs. Transcurrido este lapso de tiempo se colectaron las hojas infiltradas en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C para su análisis posterior.

RESULTADOS

Análisis de las secuencias de RNAs pequeños de *Phaseolus vulgaris* L.

De la biblioteca de ABA construida a partir de plántulas de frijol de 4 días, tratadas durante 12 y 24 horas con ABA (100 μ M), se obtuvieron 266 secuencias de 42 clonas.

Un análisis mediante el algoritmo de BLAST, permitió identificar que de las secuencias clonadas; 110 (~41.3%) correspondían a tRNAs o rRNAs. Para identificar miRNAs, se realizó una búsqueda en la base de datos de ESTs mediante Blastn 2.2.18 (Zhang et al., 2000) y se encontró que del resto de las secuencias clonadas; 29 (~11%) correspondían a miRNAs (Anexos, Tabla 2) que se ha reportado se encuentran ampliamente conservados a lo largo del reino vegetal, algunos desde briofitas hasta eudicotiledóneas (Willmann & Poethig, 2007). Interesantemente, se identificaron 3 secuencias (~1.1%) que tuvieron similitud con ESTs de otras leguminosas principalmente (Fig. 3), por lo que se consideraron como posibles miRNAs (Anexos, Tabla 3). A estas secuencias se les denominó como miR-ABA (por provenir de una biblioteca realizada con plántulas sometidas a un tratamiento por adición de ABA exógeno) seguido de un número (asignado de acuerdo al orden en que se identificaron). De estas secuencias, el presente trabajo se enfoca sólo en la caracterización de miR-ABA1.

Como se puede observar en la Tabla 3 en la sección de anexos, para miR-ABA1 se identificaron dos ESTs de leguminosas (*Glycine max* (457 nt); gi:151401735 y *Medicago truncatula* (577 nt); gi:14881796) y uno perteneciente a algodón (*Gossypium raimondii* (862 nt); gi:48806810) que contenían su secuencia, por lo que se predijeron las estructuras secundarias de cada uno de ellos (Fig. 4) mediante el programa mFold 3.2 (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003). Se observó que la secuencia de miR-ABA1 se encontraba en uno de los brazos del tallo de la estructura secundaria de estos ESTs, lo que concuerda con la idea de que estos ESTs corresponden al precursor de miR-ABA1. Cabe mencionar que la secuencia de miR-ABA1 sólo difiere en un nucleótido en *M. truncatula* y en *G. raimondii*, con respecto a *G. max* (Fig. 3).

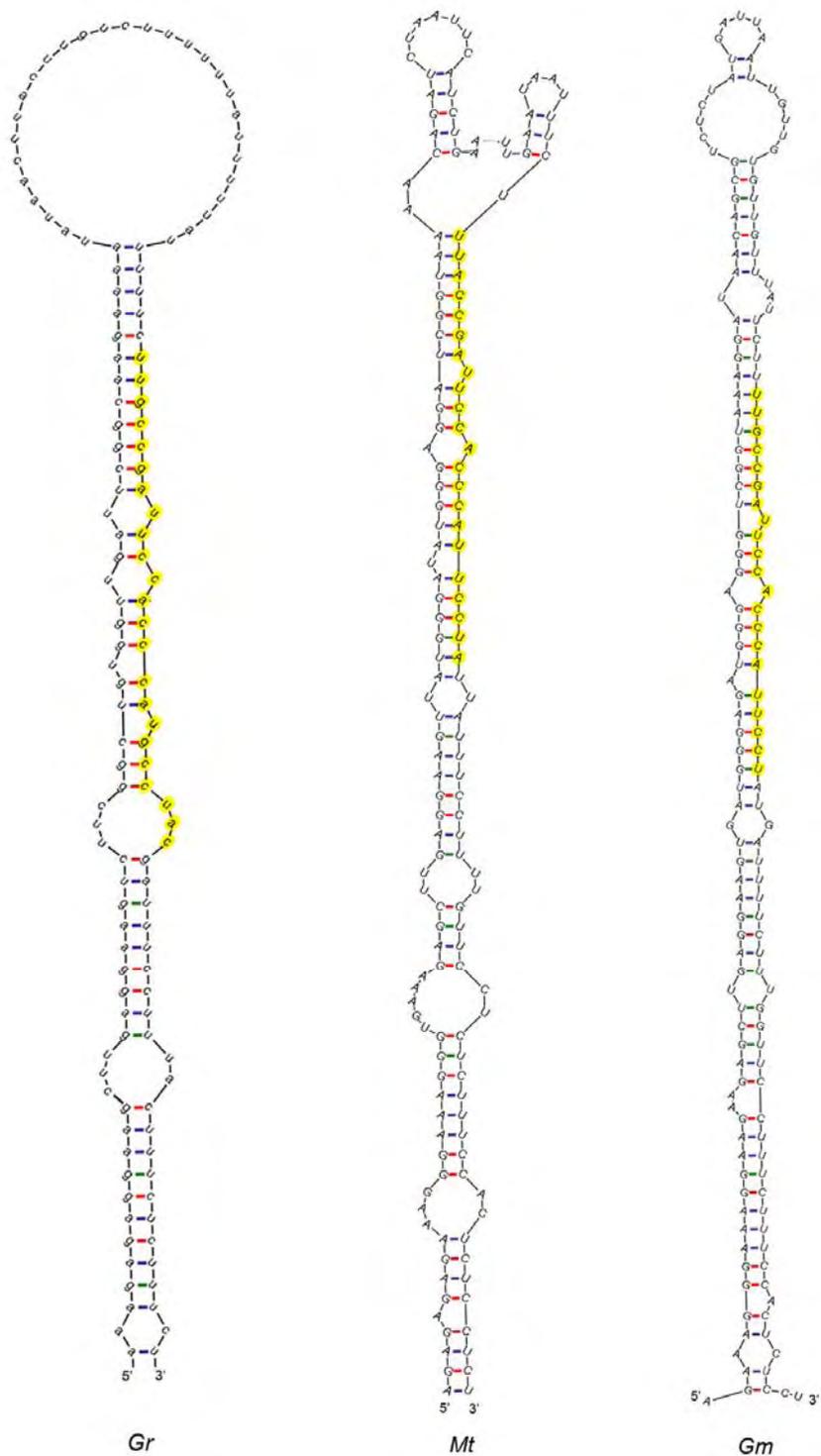


Figura 4. Estructura secundaria de los ESTs de *G. raimondii*, *G. max* y *M. truncatula*.

Se muestra parte de la estructura de tallo y asa, plegada con el programa mfold. En amarillo se indica la posición de la secuencia de miR-ABA1. Gr; *Gossypium raimondii*, Gm; *Glycine max* y Mt; *Medicago truncatula*.

MiR-ABA1 se expresa como transcrito de 22 nt

En base a los datos anteriores, se realizó un análisis tipo “Northern blot” para detectar la expresión de miR-ABA1 como transcrito de 22nt, ya que éste es uno de los criterios requeridos para designar a un miRNA. Por lo que para este análisis se utilizó RNA total de plántulas de frijol var. Negro jamapa de 4 días de germinación en condiciones de riego óptimo y sometidas a estrés por ABA (100 μ M) exógeno. Se encontró que miR-ABA1 se expresa como transcrito de 22 nt y su abundancia es ligeramente mayor en las plántulas sometidas a estrés (ABA) con respecto a las plántulas control (Fig. 5). Lo que sugiere que la expresión de miR-ABA1 podría estar regulada por estrés abiótico.

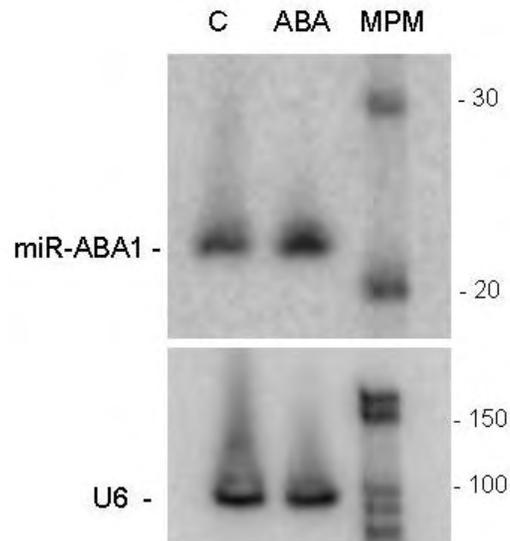


Figura 5. MiR-ABA1 incrementa su expresión en condiciones de estrés medida por ABA. Northern blot que muestra la expresión de miR-ABA1 en condiciones de riego óptimo y ABA. La concentración final de ABA fue de 100 μ M, el RNA se extrajo a partir de plántulas de 4 días, sin cotiledones y el tratamiento se realizó durante 48 horas. La hibridación para detectar U6 snRNA se utilizó como control de carga y se indica como U6 en la figura.

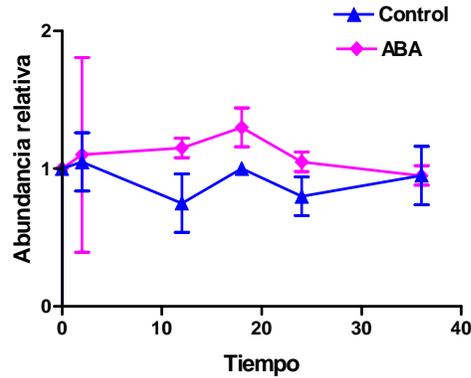
La expresión de miR-ABA1 está regulada por déficit hídrico y ABA

Para determinar de forma detallada cómo está dado el patrón de expresión de miR-ABA1 en respuesta al tratamiento por ABA y en respuesta a condiciones de déficit hídrico (sequía moderada y sequía severa) se realizaron análisis tipo Northern blot utilizando RNA total de plántulas de 4 días (hipocótilo y raíz), germinadas sin tratamiento de estrés, en toallas de papel saturado con agua (27°C) y transplantadas a vermiculita en condiciones de irrigación óptima o tratadas con ABA 100 μ M durante 36 horas, o con sequía moderada regadas con la doceava parte del agua que se utilizó para las plántulas control por 48 horas. Cada uno de los tratamientos se realizó dos veces de forma independiente.

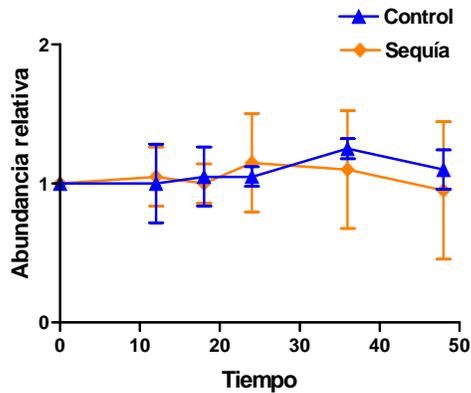
Se encontró que la abundancia del transcrito de miR-ABA1 incrementa ligeramente con respecto a las plántulas control en respuesta a tratamientos por ABA, detectándose una mayor acumulación a las 18 horas, posteriores al inicio del tratamiento (Fig. 6a). En cuanto a lo que se refiere al tratamiento por sequía moderada, no se observaron cambios notables en el nivel de expresión de miR-ABA1 con respecto al control (Fig. 6b). Por lo que se realizó un tratamiento de sequía más severo, en el cual las plántulas control no se transplantan a vermiculita sino que se mantienen bien irrigadas en toallas de papel con una humedad relativa >89%, mientras que las plántulas sometidas al tratamiento, se dejan deshidratar en una cámara húmeda (~60% de humedad relativa). Este experimento también se llevó a cabo dos veces de forma independiente. En este caso, se observó un incremento en la acumulación del transcrito para miR-ABA1 con respecto al control, a las 8 horas posteriores al inicio del tratamiento (Fig. 6c).

Para validar la respuesta de las plántulas a los tratamientos, se realizó un Northern blot para determinar la expresión del gen PvLEA18 para cada una de los tratamientos anteriores, se eligió este gen debido a que se ha demostrado responde a sequía y a ABA. Y se observó una mayor acumulación del transcrito de la PvLEA18 en las plántulas sometidas a los distintos tratamientos (Anexos, Fig. S2).

a)



b)



c)

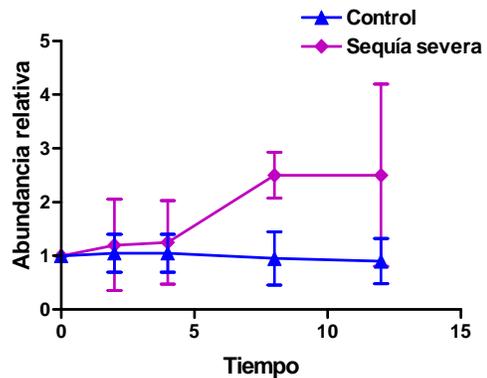


Figura 6. Análisis de la expresión de miR-ABA1 por efecto de tratamientos de sequía y ABA.

a) Plántulas de 4 días regadas con ABA 100 μ M durante 36 horas. b) Cinética de sequía realizadas durante 48 horas con plántulas de 4 días, regadas con 1/12 del agua necesaria para estar en capacidad de campo con respecto a las plántulas control. c) Sequía severa durante 12 horas, las plántulas control se mantuvieron irrigadas con agua suficiente para estar en capacidad de campo, mientras que las plántulas expuestas a sequía severa se mantuvieron con un control de humedad de aproximadamente 60% en una cámara aislada. Todos los experimentos se realizaron en un cuarto de crecimiento a 28°C dos veces. Se extrajo RNA total de cada punto y la abundancia de miR-ABA1 se determinó mediante un análisis tipo Northern Blot normalizado por la abundancia de U6 snRNA. Las gráficas se realizaron utilizando el programa Prism 3

MiR-ABA1 se acumula durante la embriogénesis y en otras leguminosas

Para determinar la acumulación de miR-ABA1 en diferentes tejidos y estadios del desarrollo de frijol, se realizó un análisis tipo Northern blot. Se observó que miR-ABA1 se expresa en hojas, botones florales, germinados y plántulas (Fig. 7). En raíz nodulada y tallo la acumulación del miRNA es menor respecto a lo que se observa en etapas de desarrollo embrionario, siendo el embrión seco donde se observó la mayor acumulación (Fig. 7). Esta es una etapa de desarrollo en la cual los tejidos del embrión se ven sometidos a condiciones de limitación de agua muy severas. Lo que concuerda con los resultados obtenidos durante los tratamientos por sequía severa. De la misma manera y con un análisis similar, se observó que miR-ABA1 se expresa en otras leguminosas (*G. max*, *M. truncatula*, *Arachis. hypogea* y *Acacia. cochliacanta*) y no en otras especies vegetales como *A. thaliana*, *Oryza sativa* y *Nicotiana benthamiana*. (Fig. 8), lo cual sugiere que miR-ABA1 es específico de leguminosas, a pesar de que no se logró detectar su expresión en *Lotus japonicus* y *Pisum sativa*

Identificación del pre-miR-ABA1 en *Phaseolus vulgaris*

G. max y *M. truncatula* son leguminosas que pertenecen a la subfamilia Papilionoideae por lo que se encuentran filogenéticamente muy cercanas al género *Phaseolus* que también se encuentra dentro de esta subfamilia (Cronk et al., 2006). Las secuencias de los EST con homología a miR-ABA1 de estas dos leguminosas se alinearon, lo que nos permitió diseñar oligonucleótidos (Anexos, Tabla 1) para aislar el pre-miR-ABA1 a partir de DNA genómico de frijol (Fig. 9), mediante PCRs. Para establecer las condiciones finales de la PCR, primero se realizó una PCR en gradiente de temperaturas, tomando en cuenta las distintas temperaturas de alineamiento calculadas para cada uno de los oligos. El resultado de dicha PCR fue la amplificación de hasta tres bandas para dos de las combinaciones de oligos, dentro de las cuales se encontraba una banda de ~133 pb que correspondía al tamaño esperado (Fig. 9a); una banda del mismo tamaño se logró amplificar de forma específica en una de las combinaciones de oligos probadas (Fig. 9b), sugiriendo que esta banda contiene la secuencia de interés.

Se realizó una PCR con los oligonucleótidos c1-sAS1 (carriles 12-16, Fig. 9a), usando una T_m de 61°C con lo cual se logró amplificar la banda del tamaño esperado (Fig. 9a), la banda se cortó del gel y se purificó para extraer el DNA.

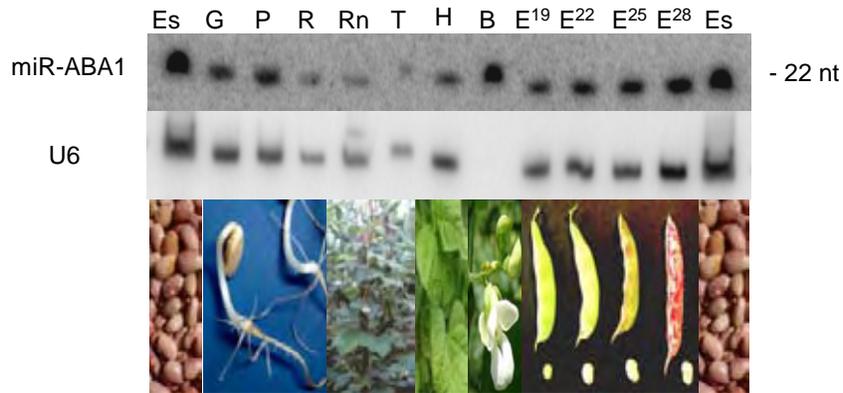


Figura 7. MiR-ABA1 es abundante durante el desarrollo del embrión. Northern blot que muestra los niveles de expresión de miR-ABA1 en diferentes tejidos de frijol var. Pinto villa. ES, embrión seco; G, germinado de 4 días; P, plántula; R, raíz; RN, raíz nodulada; T, tallo; H, hoja; B, botones florales; E¹⁹, E²², E²⁵, E²⁸, embrión de 19, 22, 25 y 28 días respectivamente. La hibridación para detectar U6 snRNA se utilizó como control de carga y se indica como U6 en la figura.

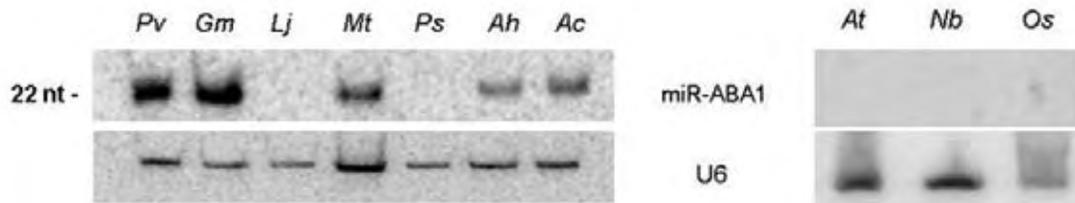


Figura 8. MiR-ABA1 se expresa únicamente en leguminosas. Northern blot que muestra la expresión de miR-ABA1 en distintas especies de leguminosas y en plantas modelo. El RNA se extrajo de plántulas sin cotiledones, germinadas a 25°C. *Pv*, *Phaseolus vulgaris*; *Mt*, *Medicago truncatula*; *Gm*, *Glycine max*; *Lj*, *Lotus japonicus*; *Ps*, *Pisum sativum*; *Ah*, *Arachis hypogaea*; *Ac*, *Acacia cochliacanta*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Nb*, *Nicotiana benthamiana* y *Os*, *Oryza sativa*. La hibridación para detectar U6 snRNA se utilizó como control de carga y se indica como U6 en la figura.

Para verificar que se tenía DNA después de la precipitación, se corrieron 10µl del precipitado en un gel de agarosa 2% (Fig. 9b). Con el DNA obtenido de la precipitación, se realizó la reacción de clonación usando el vector pENTR/SD/TOPO para transformar células electrocompetentes de *E. coli* (TOP10). Se realizó una PCR con 20 de las colonias transformadas, seleccionadas al azar, usando los oligos T3 y T7 del vector, de las cuales se enviaron a secuenciar las colonias 8,13 y 18. El inserto de cada una de las colonias corresponde al precursor de miR-ABA1 de frijol (Fig. 10), con solamente un cambio de nucleótido en la última base dentro de la secuencia que corresponde al miR-ABA1*(Fig. 11), en las colonias 13 y 18 este último nucleótido corresponde a una adenina (A) esta secuencia se denominó Pv_b, mientras que para la colonia 8 esta cambia por una guanina (G) y se observa en la Fig. 11 (Pv_a).

La secuencia del precursor de miR-ABA1 de frijol, es muy parecida a la de *G. max* y difiere un poco más de la de *M. truncatula*; sin embargo, la región en donde se encuentra el miRNA está muy conservada en las tres especies (Fig. 11)

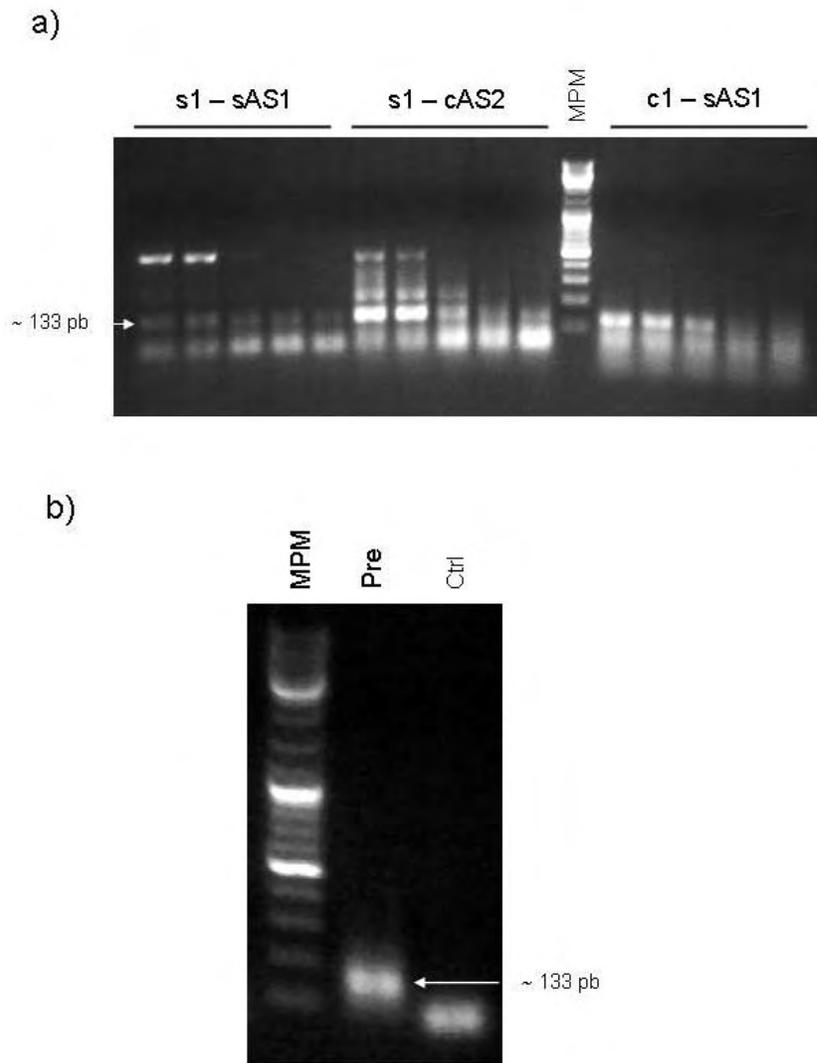


Figura 9. Amplificación de pre-miR-ABA1 en *P. vulgaris*.

a) PCR en gradiente (56, 58, 61, 64 y 67°C, respectivamente) para amplificar pre-miR-ABA1 (indicado por una flecha blanca) usando las diferentes combinaciones posibles de oligos y determinar las mejores condiciones de amplificación. MPM; marcador de peso molecular.

b) Se muestra una electroforesis en la cual se observa una única banda de ~133pb (indicada por una flecha blanca) que correspondería al precursor de miR-ABA1 en el primer carril (Pre), mientras que en el segundo se observa el control negativo (Ctrl) y una banda de menos de 100 pb que corresponde a los oligonucleótidos libres.

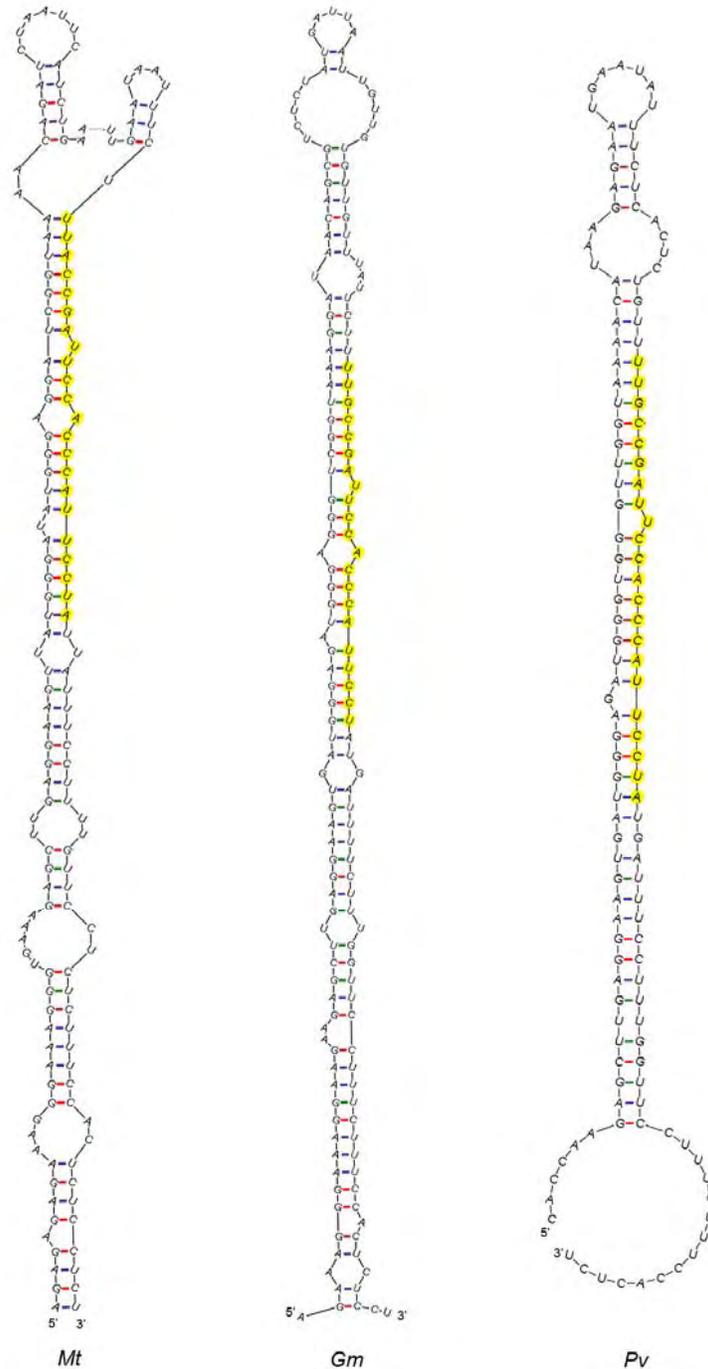


Figura 10. La secuencia del pre-miR-ABA1 en frijol forma una estructura de tallo-asa. En amarillo se muestra la secuencia de miR-ABA1. La secuencia del precursor de *P. vulgaris* se aisló mediante PCR usando oligonucleótidos diseñados con base en las secuencias de *G. max* y *M. truncatula*. Las secuencias correspondientes a cada uno de los precursores en las distintas especies se plegaron mediante el programa mFold

Expresión de miR-ABA1 en un sistema heterólogo (*N. benthamiana*)

Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el vector pBA-DC (Fig. S3) (Zhang et al., 2006), que contenía las dos secuencias del pre-miR-ABA1 de frijol (Fig. 11) para validar que las secuencias obtenidas fuesen capaces de guiar el procesamiento del pre-miR-ABA1. Mediante un análisis tipo Northern blot se detectó la expresión de miR-ABA1 en cada una de las hojas infiltradas. Se observó la expresión de miR-ABA1, lo que sugiere que el proceso de maduración de miR-ABA1, corresponde al de cualquier otro miRNA y que no hay diferencia en el procesamiento de las dos secuencias del pre-miR-ABA1 (Fig. 12).

MiR-ABA1 se acumula en hojas de frijol infectadas con el virus del mosaico común de frijol (BCMV)

Se ha visto que los virus que infectan a las plantas han desarrollado proteínas que son supresores del silenciamiento, que les permite contender con las respuestas de silenciamiento de RNA que las plantas han desarrollado para “defenderse” del ataque de estos virus (Lakatos et al., 2006). La proteinasa-componente auxiliar (HC-Pro) de los potivirus fue la primera proteína viral que se identificó como un supresor de transgenes y silenciamiento de RNA inducido por virus (Lakatos et al., 2006). Se ha reportado que HC-Pro contiene dos sitios de unión a RNA de doble cadena, es capaz de secuestrar miRNAs en su forma de dúplex (Garcia et al., 2006; Shibolet et al., 2007), esto con el fin de evadir la respuesta de defensa de la planta ante la infección viral. Sin embargo, se ha visto que los niveles de miRNAs en plantas infectadas con potivirus incrementan ante una infección viral y sorprendentemente también se ha observado un incremento en los niveles de expresión del miRNA* (Shibolet et al., 2007). Durante el trabajo de tesis de doctorado de Catalina Arenas, se infectaron plantas adultas de frijol de las variedades Negro 8025 y Pinto mestizo con BCMV por tanto se tenía ya un análisis tipo Northern blot para este experimento, dicha membrana se volvió a hibridar contra miR-ABA1. En el análisis tipo Northern blot como era de esperarse se observó una mayor acumulación de miR-ABA1 en las hojas de las plantas que fueron infectadas con respecto a las plantas que no fueron infectadas (Fig. 13).

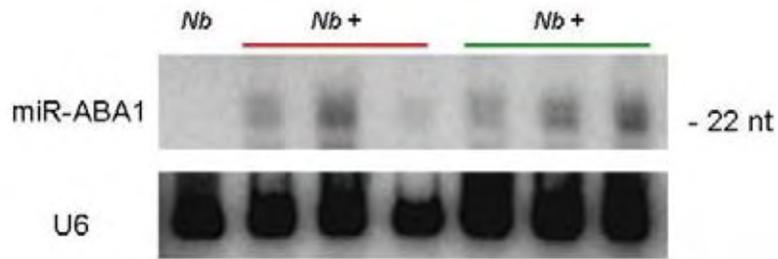


Figura 12. Expresión de miR-ABA1 en hojas de *N. benthamiana*. Northern blot que muestra la expresión de miR-ABA1 en hojas independiente de *N. benthamiana* infiltradas con *A. tumefaciens* que llevaban el vector pBA-DC con el pre-miR-ABA1a (rojo) y pre-miR-ABA1b (verde)

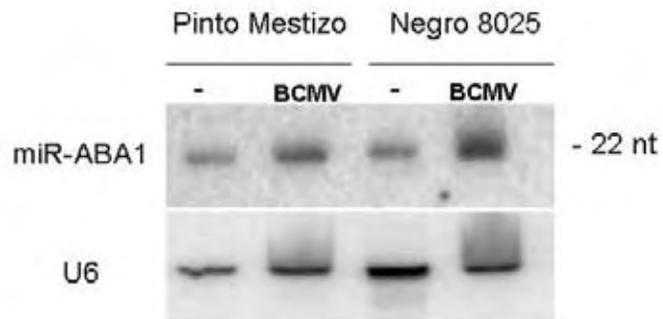


Figura 13. MiR-ABA1 se acumula en plantas infectadas con BCMV. Northern Blot que muestra la acumulación de miR-ABA1 en dos variedades de frijol en respuesta a la infección por el virus del mosaico común de frijol (BCMV). Se infectaron hojas de plantas adultas. La hibridación para detectar U6 snRNA se utilizó como control de carga y se indica como U6 en la figura.

Predicción de los posibles mRNAs blanco de miR-ABA1

Se ha demostrado que en las plantas el mRNA blanco de un miRNA contiene a lo largo de su secuencia, sitios perfectamente o casi perfectamente complementarios al miRNA, lo que repercute preferencialmente en la degradación del mRNA blanco por corte del mismo y de esta manera el miRNA regula a nivel post-transcripcional a su blanco; aunque también lo puede hacer mediante la represión de la traducción cuando la complementariedad entre el mRNA:miRNA no es perfecta, como sucede en animales. Por lo que la predicción de los blancos de los miRNAs en plantas, se puede hacer mediante una búsqueda por similitud en las bases de datos de ESTs

En esta búsqueda, se encontró un EST de *P. vulgaris* que contenía la secuencia de miR-ABA1 en antisentido, el cual corresponde a una proteína de “splicing” muy conservada en plantas, llamada U1-70k. Este dato sugiere que dicha proteína podría ser el blanco de miR-ABA1 y que por lo tanto, estaría involucrada en la respuesta a estrés hídrico. Sin embargo, mediante otro análisis bioinformático realizado en el laboratorio con el programa miRanda (Enright et al., 2003) se logró predecir otros blancos para miR-ABA1, entre los que se encontró nuevamente a U1-70k (Anexos, Tabla 4).

DISCUSIÓN

Las leguminosas ocupan el segundo lugar en orden de importancia alimenticia para el humano dentro de la familia Leguminosae (Graham & Vance, 2003). Dentro de esta familia, el frijol común (*P. vulgaris*) es uno de los cultivos más importantes en Latinoamérica ya que constituye la principal fuente de proteína en la dieta de la población y comprende el 50% de las leguminosas consumidas en todo el mundo (Broughton et al, 2003). Si embargo, los cultivos se ven afectados por la sequía, un factor ambiental muy importante que limita la productividad y desarrollo del frijol. El estrés abiótico causado por sequía, salinidad, frío y temperaturas extremas regula la expresión de cientos de genes en plantas tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Lu & Huang, 2008). Se han identificado miRNAs involucrados en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Sunkar & Zhu, 2004; Fujii et al., 2005; Lu et al., 2005b; Sunkar et al., 2006; Reyes & Chua, 2007)

Por lo anterior, el principal objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar un miRNA de frijol expresado en respuesta a tratamientos por ABA y sequía.

Previamente en el laboratorio se construyó una biblioteca de RNAs pequeños a partir de plántulas de frijol tratadas con ABA 100 μ M. Por lo que se comenzó con el análisis bioinformático de estas secuencias. Mediante dicho análisis se pudieron descartar todas las secuencias que correspondían a rRNA o tRNAs y a fragmentos de degradación de mRNAs; así como también se lograron identificar una serie de miRNAs que habían sido reportados previamente para otras especies vegetales y que se encontraban ampliamente conservados a lo largo del reino vegetal (Anexos, Tabla 2). Del mismo modo se logró identificar otro grupo de seis secuencias que tenían homología con otras secuencias correspondientes a leguminosas y/o alguna otra especie vegetal. Lo cual sugería que estas secuencias pudieran ser nuevos miRNAs de leguminosas. Previamente, los miRNAs se definieron como RNAs no codificantes que deben cumplir con una combinación de criterios que cubren la expresión y biogénesis de los mismos (Ambros et al., 2003). Así que para determinar si estas seis secuencias correspondían a miRNAs se realizó su detección mediante análisis tipo Northern blot en el cual se observó que sólo se expresaban como transcritos de 21-22 nt miR-ABA1, miR-ABA2 y miR-ABA6; de las cuales sólo se abordó el análisis de miR-ABA1 en el presente trabajo. Otro apartado dentro de los criterios que definen a un miRNA es el que estipula que el miRNA debe provenir de una biblioteca de RNAs pequeños, como fue el caso de miR-ABA1, miR-

ABA2 y miR-ABA6. Además para tener un mayor detalle acerca del patrón de expresión de miR-ABA1 se realizaron tres experimentos en los que se sometieron plántulas de frijol a estrés por sequía moderada y severa, así como a estrés por ABA. El gen de la PvLEA18 fue utilizado como control de la respuesta de las plántulas a los distintos tratamientos, ya que se sabe que este gen se expresa en condiciones de estrés por sequía y ABA (Anexos, Fig. S1) y aunque se detecta ligeramente en plántulas control se ha demostrado que también se acumula durante el desarrollo normal de la semilla, particularmente en las regiones de crecimiento de las plántulas y durante el desarrollo de plántulas etioladas crecidas bajo condiciones de irrigación óptima (Colmenero-Flores et al., 1999).

Se observó que la acumulación de miR-ABA1 en respuesta a estrés por sequía severa y a ABA incrementó, mientras que en condiciones de sequía moderada no se observó ningún cambio considerable en la abundancia del transcrito para miR-ABA1. Lo que sugiere que miR-ABA1 responde más rápido a estreses muy severos, mientras que para lo que se refiere a ABA, es necesario probar distintas concentraciones de la fitohormona en distintos estadios del desarrollo para medir la abundancia de miR-ABA1. Esto puede ser debido a que las plántulas aún tienen una cantidad considerable de ABA endógeno, por lo que el ligero aumento de expresión de miR-ABA1 que se observó en ese experimento pudiera deberse a una saturación en el sistema. Sin embargo, en otro experimento se observó que la acumulación de miR-ABA1 es mayor durante la embriogénesis respecto de lo que se observa en otros tejidos y estadios del desarrollo (Fig. 6) lo que correlaciona perfectamente con que se haya detectado una mayor acumulación del transcrito en condiciones de sequía severa, ya que durante la formación de la semilla la pérdida de agua es drástica. Cabe mencionar que U6 no se logró detectar en tejido proveniente de botones florales, lo cual sugiere que los RNAs más grandes por alguna razón se están degradando más que los pequeños en este tejido, ya que miR-ABA1 sí se detectó y además en los otros tejidos también se logró detectar la señal para U6.

Ninguno de los criterios de expresión son suficientes para que un candidato pueda definirse como un nuevo miRNA, debido a que la evidencia de la expresión por sí sola no excluye a los siRNAs. Por lo tanto se requiere cumplir tanto con los criterios de expresión así como con los de biogénesis. Para ello es necesaria la conservación filogenética del miRNA, así como de su precursor. Por lo que respecta a la conservación de miR-ABA1, se demostró que se expresa en otras leguminosas, más no en otras especies vegetales

probadas (Fig. 7). Empero, no se logró la detección de miR-ABA1 en *P. sativum* y *L. japonicus*, esto puede deberse a que en estas especies, miR-ABA1 no se expresa en el tejido que se utilizó para este experimento (hipocótilo y raíz) o bien se expresa en otro estadio del desarrollo; otra explicación posible es que la secuencia de miR-ABA1 en *P. sativum* y *L. japonicus* tenga los suficientes cambios como para que no fuera posible detectarlo.

Los ESTs al ser secuencias parciales de cDNA provenientes de genes que se expresan resultan ser una herramienta factible para predecir y/o confirmar miRNAs identificados a partir de bibliotecas de RNAs pequeños, esto resulta muy útil sobre todo para aquellos organismos de los que no se tiene secuenciado el genoma (Zhang et al., 2005). Los precursores de miR-ABA1 en *G. raimondii*, *G. max* y *M. truncatula* se lograron predecir mediante una búsqueda en las bases de datos de ESTs y la estructura secundaria reveló que la secuencia de miR-ABA1 se encontraba en uno de los brazos del tallo de dicha estructura. Con base en la información obtenida de los ESTs de *Glycine* y *Medicago* se pudo clonar el precursor de miR-ABA1 de frijol.

Mediante la transformación transitoria de *N. benthamiana* usando la secuencia del pre-miR-ABA1 de frijol, se demostró que se genera miR-ABA1 maduro, esto indica que la secuencia clonada corresponde al precursor de miR-ABA1 y que concuerda con la vía de biogénesis descrita para los miRNAs.

Otra estrategia experimental que nos permitió demostrar que miR-ABA1 es un miRNA, fue infectar hojas de plantas adultas con el virus del mosaico común del frijol (BCMV), que como mecanismo de contradefensa de la planta ante una infección, codifica proteínas como la proteína componente-auxiliar de proteínasa (HC-Pro) que reprime la vía de silenciamiento de RNA (Chen et al., 2004), y reduce la acumulación de siRNAs, mientras que por el contrario se incrementa la acumulación de miRNAs (Mallory et al., 2002). De manera que como era de esperarse, en las hojas que fueron infectadas se detectó una mayor abundancia en el transcrito de miR-ABA1 con respecto a las hojas que no fueron infectadas con el virus.

Los mecanismos de regulación que se han descrito para los miRNAs, son a nivel post-transcripcional mediante el corte del mRNA blanco por el miRNA o bien, la represión de la traducción. En plantas la mayoría de los miRNAs interactúan con su mRNA blanco a través de la unión perfecta o casi perfectamente complementaria para cortarlo (Bartel, 2004). Es por esto que resulta fácil predecir los blancos de los miRNAs de plantas, en el

presente trabajo se realizaron dos búsquedas bioinformáticas una en la base de datos de ESTs mediante BLAST y la otra utilizando el algoritmo miRanda para buscar en las bases de datos de leguminosas, encontrándose en ambos casos un transcrito que contiene un sitio de unión perfectamente complementario a miR-ABA1, dicho transcrito codifica para una proteína de “splicing” llamada U1-70k por lo que se considera que puede ser blanco potencial de miR-ABA1, esto sugiere entonces, que la participación de miR-ABA1 durante procesos de limitación de agua muy severos estaría participando en el control del procesamiento de algunos mRNAs a través de la regulación de U1-70k. Sin embargo, el análisis mediante el algoritmo miRanda también predijo otros blancos que a pesar de no tener un sitio perfectamente complementario a miR-ABA1 no se puede descartar que alguno de estos sea el blanco de miR-ABA1 por lo que se tendría que validar cada uno de estos.

En conclusión, en esta tesis se identificó un RNA pequeño que cumple con las características que definen a un miRNA y se demostró que responde a condiciones de sequía y a la hormona ABA, al cual denominamos miR-ABA1.

CONCLUSIONES

- miR-ABA1 es un microRNA ya que:
 - Se puede detectar mediante análisis tipo Northern blot en la región de 22 nt. y se aisló de una biblioteca de RNAs pequeños.
 - Es procesado a partir de una estructura de tallo y asa.
 - Su secuencia se encuentra en uno de los brazos del tallo del precursor.
 - En transformantes transitorias de *N. benthamiana* se procesa como un producto de 22 nt.
 - miR-ABA1 está presente en la familia Leguminosae a excepción de *Lotus japonicus* y *Pisum sativum*.
- En plantas infectadas con el virus del mosaico común de frijol (BCMV) se acumula el miRNA maduro
- Se acumula en respuesta a condiciones de estrés hídrico mediado por ABA
- La abundancia de miR-ABA1 aumenta durante condiciones de sequía severa y durante el desarrollo de la semilla.
- Mediante análisis bioinformáticos se logró la predicción de algunos blancos de miR-ABA1.

PERSPECTIVAS

- ❖ Analizar la expresión de miR-ABA1 en otras condiciones de estrés abiótico, por ejemplo: frío o congelamiento, deficiencia de nutrientes, estrés oxidativo.
- ❖ Explorar la expresión de miR-ABA1 en otras especies vegetales (dicotiledóneas y monocotiledóneas) además de *G. raimondii*.
- ❖ Mediante hibridación *in situ* determinar en semilla o embriogénesis los tejidos en los cuales se expresa miR-ABA1.
- ❖ Dilucidar la secuencia del promotor del gen de miR-ABA1 para estudiar su expresión.
- ❖ Determinar si la abundancia del transcrito de U1-70k correlaciona inversamente con la abundancia de miR-ABA1.
- ❖ Validar mediante un análisis 5' RACE el corte del mRNA blanco de miR-ABA1.
- ❖ Determinar la función del miRNA "*in vivo*" sobreexpresando o silenciando a miR-ABA1 en plantas de frijol o soya.

ANEXOS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia
ASmiRABA1	5' TAGGAATGGGTGGAATCGGCAA 3'
miRA1-s1	5' AGAAAGGGAAAGGAAGAAGAG 3'
miRA1-sAS1	5' AGAGTGGAAAGAAAGGAACCAAAG 3'
miRA1-c1	5' CACC-AAGAGCTTGAGGAAGTGATGGG 3'
miRA1-c2	5' CACC-GAGGAAGTGATGGGAGATGG 3'
miRA1-cAS2	5' GAGGAGAGTGGAAAGAAAGGAACC 3'

Tabla 2. miRNAs conservados en frijol (*P. vulgaris* L.)

miRNA (# veces clonado)	Función	Blanco (familia de genes)	Referencia
miR-159 (2)	Patrón floral y de hojas	MYBs	
miR-160 (1)	Polaridad de los órganos, desarrollo vascular y meristemático. Respuesta a auxina	ARF	
miR-166 (5)	Respuesta a auxina y morfogénesis de hoja y tejido vascular	HD-ZIP III (PHV, leaf 1)	(Mallory & Vaucheret, 2006)
miR-167 (2)	Respuesta a auxina	ARFs	
miR-169 (7)	Nodulación	HAP2	(Combier et al., 2006)
miR-394a (1)	Patrón floral y de hojas	F-box	(Fahlgren et al., 2007)
miR-319 (8)	Desarrollo de la hoja	TCP	(Mallory & Vaucheret, 2006)
miR-319a (1)		TCP	(Fahlgren et al., 2007)
miR-319b (1)		TCP	
miR-396e (1)		GRF	

Tabla 3. miRNAs de frijol (*P. vulgaris* L.)

miRNA	pre-miRNA	Blanco
miR-ABA1 (22 nt) UUGCCGAUUCACCCAUUCCUA	<i>Gm, Mt, Gr</i>	EST <i>Pv</i> U1-70K
miR-ABA2 (21 nt) CUUCCAUAUCUGGGGAGCUUC	<i>Gm</i>	
miR-ABA6 (22 nt) UUCAUUUUGAAAAUAGGCAUUG	<i>Gm</i>	EST <i>Gm</i>

Se muestra la secuencia y longitud de cada uno de los miRNAs clonados, el precursor y el blanco predichos mediante análisis bioinformático en aquellos casos donde se han logrado identificar.

Tabla 4. Blancos hipotéticos de miR-ABA1

miRNA	gi EST	Apareamiento miRNA:mRNA	ΔG	Descripción EST
miR-ABA1	62715674		-44.6	U170K-related
	166976797	-: ---: : :	-34.5	APS-reductasa
	166964052	-: ---: : :	-34.5	APS-reductasa
	171547202	- -: : :- : : : : : : :	-31.7	Carboxipeptidasa
	62711137	- -: : :- : : : : : : :	-31.4	Desconocida

Mediante análisis bioinformático usando las bases de datos de leguminosas se predijeron los posibles blancos para miR-ABA1

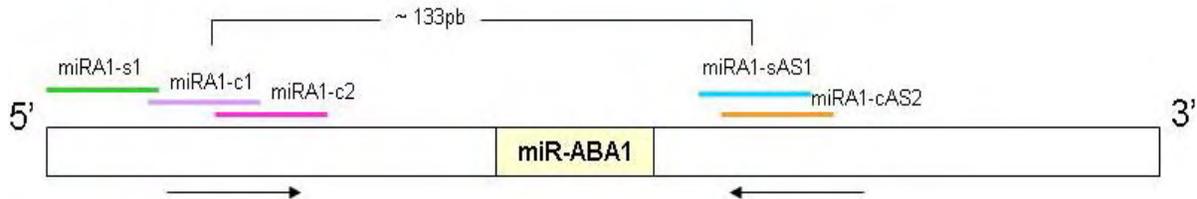


Figura Suplementaria 1. Diagrama que muestra la posición de los oligonucleótidos diseñados para amplificar el pre-miR-ABA1. Los oligonucleótidos se diseñaron en base a la secuencia consenso obtenida del alineamiento de los ESTs de *G. max* y *M. truncatula*.

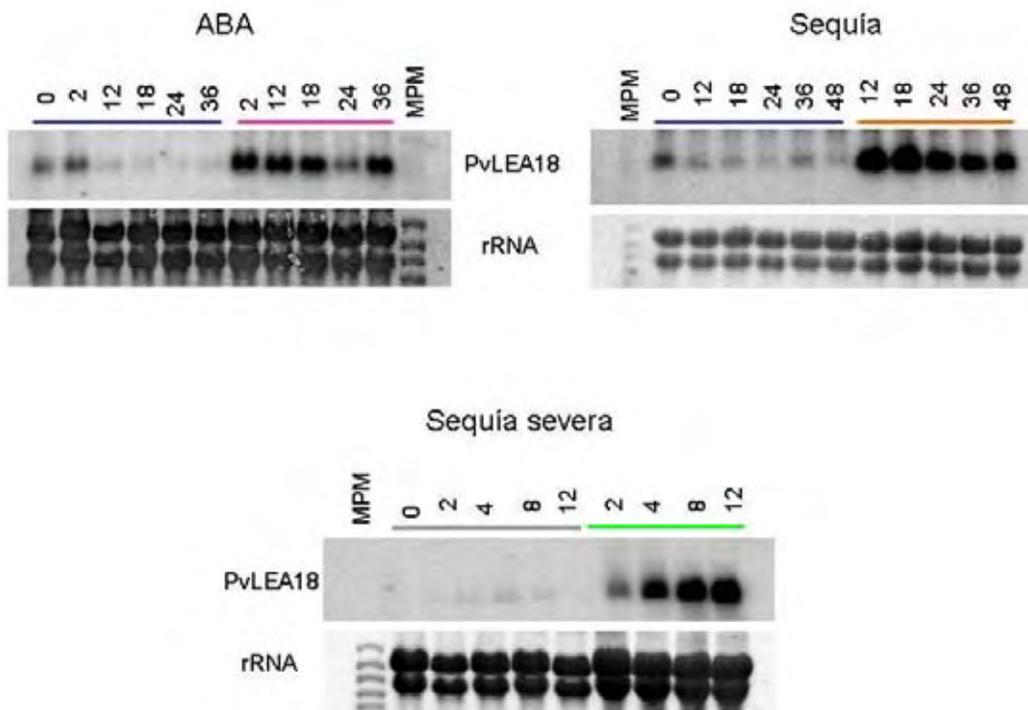


Figura Suplementaria 2. El transcrito de PvLEA18 se acumula en las plántulas de frijol sometidas a tratamientos por ABA y sequía. Northern blots de las distintas cinéticas realizadas utilizando plántulas de frijol de 4 días de germinación sometidas a estrés por ABA (10 μ M), sequía (1/12) y sequía severa (60% humedad). El transcrito de la PvLEA18 se acumula en las plántulas que fueron sometidas a estrés. Los números indican las horas posteriores al inicio del tratamiento a las cuales se colectaron los tejidos, mientras que mediante una línea azul se indican las plántulas control, la línea rosa indica las plántulas sometidas a estrés por ABA, la línea naranja indica las plántulas que fueron sometidas a estrés hídrico por sequía y la línea verde indica las plántulas sometidas a estrés por sequía severa. rRNA fue utilizado como control de carga. MPM; marcador de peso molecular.

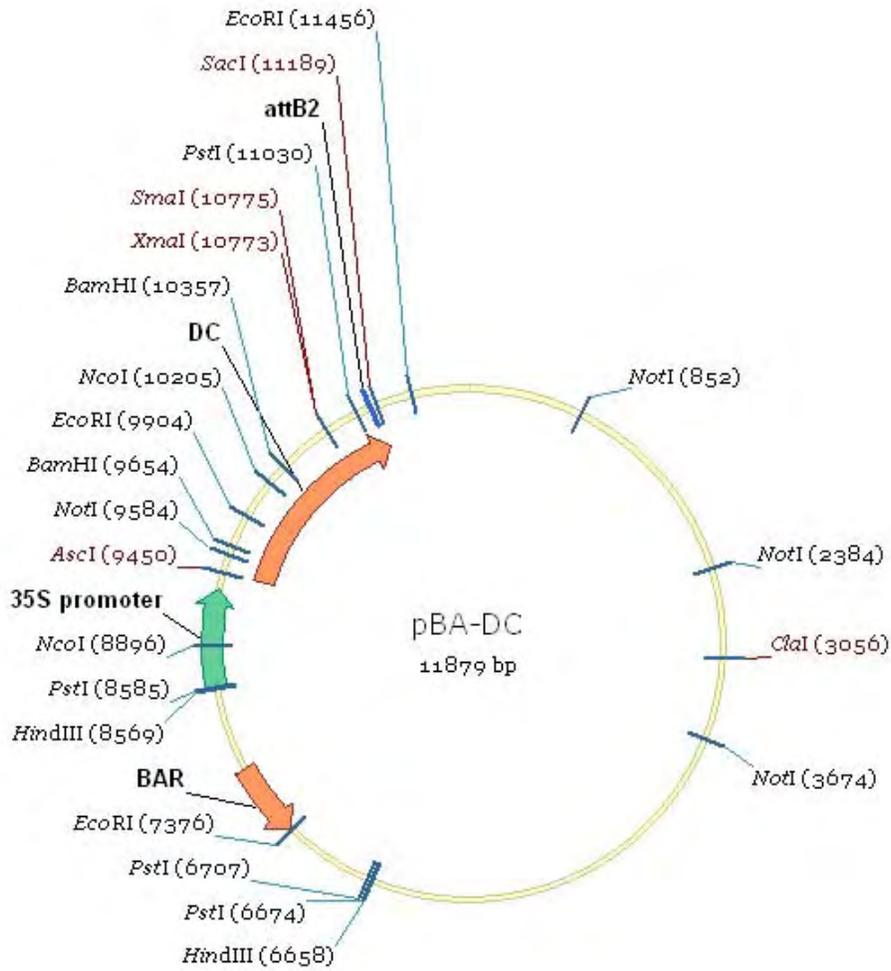


Figura Suplementaria 3. Vector binario pBA-DC. Se muestra la región del vector de destino Gateway (DC), así como la región del promotor 35S. Este vector cuenta con dos regiones codificantes para dos marcadores de selección; espectinomicina y BASTA (BAR).

REFERENCIAS

- Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP. 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357-3365.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. 2006. Endogenous and Synthetic MicroRNAs Stimulate Simultaneous, Efficient, and Localized Regulation of Multiple Targets in Diverse Species. *Plant Cell* 18:1134-1151.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9:277-279.
- Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S. 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 11:941-950.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Baumberger N, Baulcombe DC. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, Van de Peer Y. 2004. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11511-11516.
- Bray EA. 1993. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol* 103:1035-1040.
- Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2:48-54.
- Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. 2002. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev* 16:790-795.
- Colmenero-Flores JM, Campos F, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol* 35:393-405.
- Colmenero-Flores JM, Moreno LP, Smith CE, Covarrubias AA. 1999. Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol* 120:93-104.

- Combiér JP, Frugier F, de Billy F, Boualem A, El-Yahyaoui F, Moreau S, Vernie T, Ott T, Gamas P, Crespi M, Niebel A. 2006. MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* 20:3084-3088.
- Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol* 9:99-103.
- Chen J, Li WX, Xie D, Peng JR, Ding SW. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16:1302-1313.
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL. 2006. Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:412-421.
- Dalmay T. 2006. Short RNAs in environmental adaptation. *Proc Biol Sci* 273:1579-1585.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231-235.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. 2001. Minipreps of plasmid DNA. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 1:Unit1* 6.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology* 5:R1.
- Fahlgrén N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangel JL, Carrington JC. 2007. High-Throughput Sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes. *PLoS ONE* 2:e219.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl:S15-45.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK. 2005. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15:2038-2043.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* 275:5668-5674.
- García S, Billecocq A, Crance JM, Prins M, Garin D, Bouloy M. 2006. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *J Gen Virol* 87:1985-1989.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131:872-877.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. 2004a. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Han MH, Goud S, Song L, Fedoroff N. 2004b. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1093-1098.
- Hundertmark M, Hincha DK. 2008. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9:118.

- Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, O'Brien J, Lehrach H, Bachellerie JP, Brosius J. 2001. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse. *Embo J* 20:2943-2953.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787-799.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. 2006. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:19-53.
- Jones L. 2002. Revealing micro-RNAs in plants. *Trends Plant Sci* 7:473-475.
- Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC. 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11:2291-2301.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyn J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J* 25:2768-2780.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14:2162-2167.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
- Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saib A, Voinnet O. 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308:557-560.
- Lee RC, Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23:4051-4060.
- Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. 2005a. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 309:1567-1569.
- Lu S, Sun Y-H, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL. 2005b. Novel and Mechanical Stress-responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* that are Absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Lu XY, Huang XL. 2008. Plant miRNAs and abiotic stress responses. *Biochem Biophys Res Commun* 368:458-462.
- Lukowitz W, Gillmor CS, Scheible WR. 2000. Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* 123:795-805.
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297:2053-2056.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15228-15233.

- Mallory AC, Vaucheret H. 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet* 38 Suppl 1:S31-36.
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. 1999. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288:911-940.
- Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ. 2004. Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1677:129-141.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Olivas WM, Muhlrud D, Parker R. 1997. Analysis of the yeast genome: identification of new non-coding and small ORF-containing RNAs. *Nucleic Acids Res* 25:4619-4625.
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3691-3696.
- Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* 12:1484-1495.
- Phillips JR, Dalmay T, Bartels D. 2007. The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Lett*.
- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ. 2005. Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Mol Cell* 19:421-428.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616-1626.
- Reyes JL, Chua NH. 2007. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J* 49:592-606.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520.
- Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR. 2001. Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics. *Curr Biol* 11:1369-1373.
- Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12:340-349.
- Ruvkun G, Wightman B, Ha I. 2004. The 20 years it took to recognize the importance of tiny RNAs.[comment]. *Cell* 116:S93-96.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A. 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J Virol* 81:13135-13148.
- Singh K, Foley RC, Onate-Sanchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 5:430-436.

- Soulages JL, Kim K, Walters C, Cushman JC. 2002. Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol* 128:822-832.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18:2051-2065.
- Sunkar R, Zhu JK. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001-2019.
- van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, Mol JN, Stuitje AR. 1990. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol* 14:457-466.
- Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP. 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development* 18:1187-1197.
- Vazquez F, Gascioli V, Crete P, Vaucheret H. 2004a. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology* 14:346-351.
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Crete P. 2004b. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell* 16:69-79.
- Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S. 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* 15:1637-1651.
- Willmann MR, Poethig RS. 2007. Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Curr Opin Plant Biol*.
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC. 2005. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* 138:2145-2154.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2:E104.
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307:932-935.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.
- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. 2006. Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J* 46:243-259.
- Zhang X, Garreton V, Chua NH. 2005. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes Dev* 19:1532-1543.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-214.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-3415.