



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS**

## **ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN MICRORNA DE LEGUMINOSAS, MIR2119 EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO**

# **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A :

**CARLOS DE LA ROSA UREÑA**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA (IBT-UNAM)**

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

**DRA. LEONOR PEREZ MARTINEZ (IBT-UNAM)**

**DR. FEDERICO SANCHEZ RODRIGUEZ (IBT-UNAM)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de CONACyT (151571) y PAPIIT-DGAPA (IN-205112).

Carlos De la Rosa Ureña recibió la beca de maestría otorgada por CONACyT y el apoyo económico por parte de PAPIIT-DGAPA para concluir la tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Reyes Taboada por su infinita paciencia y gran apoyo que me ha brindado durante estos años.

A la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles por su apoyo constante.

A los miembros de mi comité tutorial durante el desarrollo de este trabajo:

Dra. Leonor Pérez Martínez y Dr. Federico Sánchez Rodríguez

A los miembros del jurado por su apoyo, tiempo y sugerencias:

Dra. Susana López Charretón, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, M.C. María del Carmen Quinto Hernández, Dr. Ángel Arturo Guevara García y Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva.

A la Dra. Cecilia Contreras, Gabriel Guillen y Bertha Pérez por su apoyo técnico en el qPCR.

A todos los miembros del laboratorio Acovs.

A mis amigos de Caborca y Cuernavaca

Los LmB's, amigos de la maestría, del futbol (perros y fullerenos), del basquetbol, de ibt y del genómicas.

A mi novia, Sofía, por su amor, cariño y compañía.

A mi familia, en especial a mis padres por su gran apoyo y por motivarme siempre seguir hacia adelante.

*ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN MICRORNA DE LEGUMINOSAS,  
MIR2119 EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO.*

## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido Abscísico (del inglés <i>ABscisic Acid</i> ).
<b>ABRE</b>	Elementos de Respuesta a ABA (del inglés <i>ABA Responsive Element</i> ).
<b>AGO</b>	Argonauta
<b>ADH1</b>	Alcohol DesHidrogenasa 1.
<b>cDNA</b>	DNA complementario (del inglés <i>complementary DNA</i> )
<b>CSD1</b>	Cobre Superóxido Dismutasa 1 (del inglés <i>Copper Superoxide Dismutase 1</i> ).
<b>Cu</b>	Cobre
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> ).
<b>DRE</b>	Elementos de Respuesta a deshidratación (del inglés <i>Dehydration Responsive Element</i> ).
<b>Fig.</b>	Figura
<b>MIRNA</b>	Gen que codifica para un microRNA.
<b>LEA</b>	Proteína Abundante en Embriogénesis tardía (del inglés <i>Late Embryogenesis Abundant</i> ).
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>miRNA*</b>	microRNA estrella, secuencia casi perfectamente complementaria al miRNA.
<b>mRNA</b>	RNA mensajero (del inglés <i>messenger RNA</i> ).
<b>nt</b>	Nucleótido.
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
<b>Pre-miRNA</b>	Precursor de miRNA.
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativo o PCR en tiempo real (en inglés <i>quantitative PCR</i> ).
<b>RACE</b>	Amplificación Rápida de extremos de cDNA (del inglés <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> ).
<b>RISC</b>	Complejo de silenciamiento inducido por RNA (del inglés <i>RNA Induced Silencing Complex</i> ).
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (del inglés <i>RiboNucleic Acid</i> ).
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i> ).
<b>RT-PCR</b>	Transcriptasa Reversa-PCR (del inglés <i>Reverse Transcriptase-PCR</i> ).
<b>sRNA</b>	RNA pequeño (del inglés <i>small RNA</i> ).

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. ABSTRACT</b> .....	2
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
III.I Biogénesis de microRNAs (miRNAs) .....	5
III.II miRNAs y su participación en estrés.....	7
III.III miRNAs en respuesta a déficit hídrico.....	8
III.IV miRNAs conservados y no conservados .....	9
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	11
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
VII.I Extracción de RNA .....	17
VII.II Síntesis de DNA complementario (cDNA) .....	17
VII.III Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
VII.IV Amplificación del precursor de miR398-2119 .....	18
VII.V Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (protocolo de Fermentas) .....	18
VII.VI Clonación del producto de PCR .....	18
VII.VII Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	18
VII.VIII Extracción de DNA plasmídico (GeneJET Plasmid miniprep kit Fermentas) .....	19
VII.IX Análisis tipo Northern blot para miRNAs .....	19
VII.X Contrucción y Sobreexpresión de precursores en vector binario pBA-DC.....	20
VII.XI 5' RACE modificado .....	22
VII.XII PCR cuantitativo (qPCR) o de tiempo real .....	22
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	25
VIII.I miR398a y miR2119 están codificados en un mismo precursor. ....	25
VIII.II Clonación del precursor pre-miR398a-2119 y análisis de su expresión. ....	28
VIII.III Expresión heteróloga del precursor Pvu-pre-miR398-2119 en <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....	30
VIII.IV Detección de expresión de miRNAs mediante qPCR.....	32
VIII.V Validación de mRNA blancos .....	34
VIII.VI Niveles de acumulación de los mRNAs de ADH1 y CSD1 en <i>P. vulgaris</i> .....	37
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	39
IX.I Precursores policistrónicos en plantas .....	39
IX.II Regulación de <i>CSD1</i> y su posible relación con la regulación de <i>ADH1</i> .....	40

<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>XI. PERSPECTIVAS</b> .....	46
<b>XII. REFERENCIAS</b> .....	47
<b>XIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS</b> .....	53
<b>XIV. ANEXOS</b> .....	56





## I. RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles que están sometidos a diferentes tipos de estrés ambiental tales como sequía, alta salinidad y bajas temperaturas, los cuales provocan un déficit hídrico que afecta el crecimiento, el desarrollo y la producción de semillas. Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA (20-24 nt) que participan en diferentes procesos como diferenciación celular, desarrollo, respuesta a estrés y cambios ambientales. Los miRNAs se unen de manera complementaria a su mRNA blanco lo que conlleva a su degradación o a la inhibición de su traducción. En *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que algunos miRNAs participan en la adaptación ante el déficit hídrico, sin embargo, se conoce poco al respecto en otras plantas. En el laboratorio estudiamos el estrés hídrico utilizando como modelo al frijol (*Phaseolus vulgaris*) por ser una planta de interés agrícola en el país. Con el objetivo de estudiar el papel que tienen los miRNAs en la adaptación a las condiciones de sequía en el frijol, se identificó un miRNA llamado miR2119. Se realizó una búsqueda en las bases de datos de secuencias expresadas (ESTs), la cual nos permitió encontrar ESTs que contienen a la secuencia de miR2119 en leguminosas, tales como *Phaseolus acutifolius*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Arachis hypogaea* y *Trifolium pratense*. Además, se caracterizó la expresión del miR2119 en respuesta a sequía mediante análisis tipo Northern Blot. Los resultados obtenidos indicaron que la acumulación del miR2119 es mayor conforme aumenta la duración del tratamiento por sequía, tanto en hoja como raíz, esto nos sugiere que miR2119 debe estar involucrado en la respuesta a déficit hídrico. Sorpresivamente, dentro de nuestro análisis de secuencia encontramos que a una distancia de 265 nt del miR2119 se encuentra otro miRNA llamado miR398a y se comprobó, por medio de RT-PCR, que estos dos miRNAs están codificados en un mismo precursor policistrónico y ambos aumentan su acumulación en respuesta a déficit hídrico.

Utilizando herramientas bioinformáticas encontramos que el mejor candidato para el mRNA blanco del miR2119 es el mRNA de la alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) y para miR398a es el mRNA de la superóxido dismutasa (*CSD1*), los cuales fueron validados experimentalmente mediante ensayos de 5'RACE. Nuestros resultados indican que miR2119 es un miRNA específico de leguminosas que se acumula en sequía y junto con miR398a podrían estar involucrados en la respuesta adaptativa al estrés hídrico.

## II. ABSTRACT

Plants are sessile organisms that are subjected to several types of environmental stress such as drought, salinity and low temperatures. These adverse conditions can cause water deficit and consequently affect growth, development and seed production. MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules (20-24 nt) that participate in different processes such as cellular differentiation, response to stress and environmental changes. miRNAs regulate their target mRNAs by complementary base-pairing to induce cleavage or translational inhibition. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, it has been shown that some miRNAs participate in the response to water deficit. However, in others plants these mechanisms are poorly understood. In our laboratory, we study the plant response to water deficit using as an experimental model common bean (*Phaseolus vulgaris*), particularly because it is an important crop in developing countries that might be a good model to explore novel mechanisms involved in drought resistance. We focused our attention on novel miRNAs with increased accumulation under stress conditions. We identified a novel miRNA in common bean named miR2119. Using *Expressed Sequence Tags* (ESTs) available from NCBI databases we also found homologs of this miRNAs in other legumes such as *Phaseolus acutifolius*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Arachis hypogaea* and *Trifolium pratense*. The analysis of miR2119 expression patterns showed the induced accumulation of miR2119 in response to drought in leaves and roots. Surprisingly, during our sequence analyses we found another miRNA, which is located at 265 nt distance of miR2119. RT-PCR experiments have shown that both miRNAs are co-transcribed and their accumulation increased upon water deficit. Using a bioinformatics approach we have predicted Alcohol Dehydrogenase 1 (*ADH1*) as a target for miR2119 and Copper-zinc Superoxide Dismutase 1 (*CSD1*) for miR398a. We confirmed the target transcripts using 5'RACE and discuss the function that they may carry out in the plant response to water limitation.

### III. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que están sometidos a diferentes formas de estrés ambiental tales como sequía, alta salinidad en el suelo y temperaturas extremas (altas y bajas), provocando déficit hídrico, el cual afecta el crecimiento, el desarrollo y la producción de semillas [1]. Las plantas responden y se adaptan a estreses a través de varios procesos fisiológicos, bioquímicos y cambios en la expresión génica, adquiriendo tolerancia y evitando el estrés [2]. La duración y la severidad con las cuales el estrés es impuesto influyen en la respuesta de la planta ante dicha situación y puede ocurrir en pocos segundos (tal como el cambio en el estado de fosforilación de una proteína), en minutos u horas (cambio de expresión génica) [3]. Además, la resistencia o sensibilidad dependerá de la especie, del genotipo y etapa del desarrollo en la que se encuentre la planta [2].

El estrés por déficit hídrico puede definirse como la situación en la cual el potencial hídrico y la presión de turgor disminuyen, interfiriendo con los procesos celulares [4]. El déficit hídrico es ocasionado por la pérdida moderada de agua, la cual conlleva al cerrado de estomas y la limitación del intercambio gaseoso. A nivel celular, el déficit hídrico provoca cambios en la concentración de solutos, volumen celular, forma e integridad de la membrana, pérdida de turgor, cambios en los gradientes de potencial hídrico y desnaturalización de proteínas. La pérdida severa de agua resulta en la deshidratación o desecación, lo que podría ocasionar graves daños en la estructura celular, metabolismo y eventualmente, el cese de actividades enzimáticas [5]. Aún más, un estrés hídrico más severo puede generar el arresto de la fotosíntesis, perturbación en el metabolismo y finalmente la muerte [6].

El crecimiento es uno de los procesos fisiológicos más sensibles a la sequía debido a la reducción de la presión del turgor. La expansión celular sólo puede ocurrir cuando la presión del turgor es mayor que el umbral producido por la pared celular. Por lo tanto, el déficit hídrico inhibe la expansión y el crecimiento celular debido a la baja presión del turgor [6], [7]. Esta reducción en el crecimiento de la planta inhibe varios procesos fisiológicos y bioquímicos, tal como la fotosíntesis, la respiración, la captación de iones, de carbohidratos, de nutrientes y de hormonas [8].

La aclimatación a la sequía por parte de las plantas se debe a la regulación o ajuste osmótico, que permite el mantenimiento del turgor para sobrevivir o asistir el crecimiento de las plantas bajo condiciones adversas [9].

Dentro de los efectos ocasionados por la sequía se encuentra la detención del crecimiento, lo que incluye algunas características de la raíz como longitud, densidad y el número de raíces gruesas que son importantes para que las plantas sean capaces de establecerse en el suelo y explorar la disponibilidad del agua [10]. La sequía disminuye la longitud de la raíz y reduce la biomasa de las raíces fibrosas [11], [12]. Para contrarrestar esto, el desarrollo del sistema radical incrementa la absorción del agua y el mantenimiento de la presión osmótica correcta a través de acumular altos

niveles de prolina, como un mecanismo fundamental de adaptación contra la sequía [13]. También el déficit hídrico reduce el número de hojas por planta, el tamaño y la longevidad individual de la hoja, debido a la disminución del potencial hídrico en el suelo. La expansión del área foliar depende del turgor, temperatura y la asimilación del suministro para el crecimiento, el cual son todas afectadas por la sequía [14]. Por lo anterior, una reducción en el área de la hoja trae como consecuencia un impacto negativo en la productividad de la cosecha al disminuir la fotosíntesis [8].

El primer paso de regulación en la respuesta al déficit hídrico es el reconocimiento de la señal, la disminución del agua disponible en la célula es percibida desencadenando una vía de transducción de señales. Así, un estrés físico puede ser convertido en una respuesta bioquímica [3]. La respuesta primaria induce, entre otros efectos, la expresión de genes que intervienen en diferentes procesos, como la protección de otras proteínas, ácido nucleicos o estructuras celulares (chaperonas, hidrofilinas y proteínas LEAs), factores transcripcionales, síntesis y/o liberación de ácido abscísico (ABA) [15], [16]. Posteriormente se producen respuestas fisiológicas como la regulación y el cerrado de los estomas (mediado por ABA) [17], la síntesis de osmolitos (prolina, glicin-betaína, etc.) y la activación del sistema de transporte para la desintoxicación de iones, entre otros [18].

El ABA es una fitohormona que modula numerosos procesos de respuesta ante el déficit hídrico como la tolerancia a la desecación, la dormancia de la semilla y también participa en la modulación del desarrollo y crecimiento de las plantas, en la fase de transición de embrión a crecimiento vegetativo y de crecimiento vegetativo a reproductivo [19]. Los genes de respuesta ante el déficit hídrico presentan elementos regulatorios en su zona promotora que son reconocidos por los factores transcripcionales que regulan la respuesta, algunos de estos elementos son dependientes y controlados por ABA, como los llamados ABRE (ABA Responsive Element) y otros independientes de la vía de señalización por ABA; por ejemplo, los llamados DRE (Dehydration Responsive Element) [20], [21]. Adicionalmente, ahora sabemos que la respuesta al déficit hídrico también está sujeta a regulación epigenética, lo que le permitiría a la planta mantener una respuesta más eficiente y rápida ante el estímulo estresante, y/o por un largo plazo [22].

Por otro lado, existen mecanismos de regulación que actúan a nivel postranscripcional y que pueden participar en la respuesta y la adaptación al déficit hídrico, como la adición del “cap” al extremo 5' del RNA mensajero (mRNA) y su poliadenilación en el extremo 3', procesamiento para la eliminación de intrones y ensamble de exones, transporte del mRNA del núcleo al citoplasma, estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional e incluso regulación por RNA pequeños [23], [24], [25]. Esto se ha logrado conocer gracias al estudio de mutantes en *Arabidopsis thaliana*, identificando factores involucrados en la respuesta a estrés (como ABA) asociados a elementos que participan en el metabolismo del RNA. Por ejemplo, la mutante de supersensibilidad a sequia (SAD1) fue aislada como una mutante que exhibía una mayor respuesta a ABA y a sequía. SAD1 codifica para una

proteína Sm-like posiblemente involucrada en transporte, procesamiento o degradación del RNA [26]. Una mutante similar es la de hipersensibilidad a ABA (ABH1, en inglés *ABA Hypersensitive 1*), este gen codifica para una proteína de unión al “cap”, mostrando un fenotipo de hipersensibilidad en el cerrado de estomas y marchitez durante el tratamiento por sequía [27].

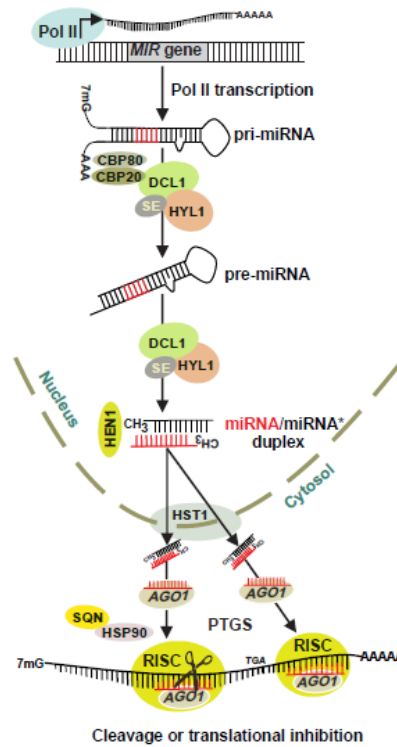
El complejo nuclear de unión al cap (nCBC, del inglés nuclear Cap Binding Complex) representa otro caso bien caracterizado en la participación de la regulación postranscripcional en respuesta a sequía. Tradicionalmente nCBC está involucrado en el procesamiento y exportación del RNA del núcleo al citoplasma. Este complejo es indispensable para mamíferos, en contraste, mutantes de nCBC en *A. thaliana* son viables, muestran hipersensibilidad a ABA, desarrollo con ligeras anormalidades y exhiben tolerancia a sequía [28]. Estudios recientes han revelado la participación de nCBC en el procesamiento de mRNA y procesamiento del pri-miRNA [29], [30], este último se describirá en la siguiente sección.

HYL1 (*HYPONASTIC LEAVES 1*) fue originalmente identificada como una mutante afectada en respuesta a varias hormonas e hipersensibilidad a ABA durante la germinación, por lo que HYL1 se involucró potencialmente en respuesta a estrés [31]. Sin embargo, el gen de HYL1 en *A. thaliana* se ha caracterizado como un factor de unión a RNA de doble cadena requerido para la biogénesis de una familia de RNA pequeños no codificantes recientemente identificada como microRNAs [32], [33].

### III.I Biogénesis de microRNAs (miRNAs)

Los microRNAs (miRNAs) son moléculas de RNA no codificantes de 20-24 nt que participan en la regulación postranscripcional, degradando el mRNA blanco o inhibiendo su traducción, a través del apareamiento Watson-Crick perfecto o casi perfecto entre el miRNA y su mRNA blanco [34], [35]. La biogénesis de los miRNAs inicia con la transcripción de un gen independiente (gen *MIR*) por la RNA polimerasa II que genera un transcrito con poliA en su extremo 3' y un “cap” en su extremo 5' [36]. Este transcrito adopta una estructura secundaria tipo tallo-asa llamado pri-miRNA que es reconocido y procesado por DCL-1 (DICER LIKE 1), en conjunto con dos proteínas que se unen a RNA de doble cadena llamadas HYL1 y SE (SERRATE) y proteínas de unión al “cap” como CBP20 y CBP80, generando el precursor (pre-miRNA) de miRNA [29], [37], [38]. En una segunda ronda de corte, DCL-1 corta al pre-miRNA dando lugar a un duplex de RNA de doble cadena de ~21 nt, este duplex contiene 2 nt sobresalientes en sus extremos 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', que es característico de un corte generado por una RNAasa de tipo III como lo es DCL-1 [39]. La secuencia complementaria al miRNA se le ha llamado miRNA estrella (miRNA\*), la cual en la mayoría de los casos se degrada [34]. Posteriormente, el duplex es metilado en el grupo hidroxilo 2' del último nucleótido del extremo 3' por la enzima HEN1 (HUA ENHANCER 1) y se exporta del núcleo al citoplasma a través de la proteína HASTY [40], [41]. Una vez en el citoplasma, el duplex es

reconocido por el Complejo del Silenciamiento Inducido por RNA (RISC), donde su proteína efectora Argonauta 1 (AGO1) elige al miRNA maduro y lo guía a su mRNA blanco; además, las proteínas HSP90 y SQUINT (SQN) asisten y promueven la función de AGO1 [42]. El complejo de RISC, guiado por el miRNA, inhibe la traducción o corta el mRNA blanco reconocido, evitando así su expresión [34], [35] (Fig.1).



**Figura 1. Biogénesis de miRNAs en plantas.** Imagen representativa de la vía de producción de miRNAs. Tomada de la revisión de Khraiweh et al., 2011 [43].

El análisis funcional de miRNAs evolutivamente conservados en diversas especies de plantas ha mostrado que participan en múltiples procesos biológicos. Entre ellos se ha encontrado que regulan la señalización por auxinas [44], la formación de los límites del meristemo [45], la separación de órganos [46], la polaridad y el desarrollo de la hoja [47], la formación de raíces laterales [48], la transición de la fase juvenil a crecimiento vegetativo y de crecimiento vegetativo a la fase floral [49], la identidad de órganos florales y reproductivos [50], [51]. Además, se han identificado en plantas modelo distintos miRNAs regulados bajo condiciones de estrés abiótico y biótico, incluyendo deficiencia a nutrientes [52], sequía [53], [54], [55], frío [56], salinidad [54], infección bacteriana [57], radiación de rayos UV-B [58] y estrés mecánico [59]. El estrés causa el aumento o disminución en la acumulación de ciertos miRNAs o la síntesis de *novo* de miRNAs para contender con el estrés [43].

### III.II miRNAs y su participación en estrés.

En 2004, Jones-Rhoades y Bartel describieron por primera vez la participación de miRNAs en estrés. En *Arabidopsis* y arroz encontraron miRNAs conservados y predijeron mRNAs blancos para varios miRNAs, dentro de los cuales, la mayoría correspondía a mRNAs que codifican para factores transcripcionales. Sin embargo, también encontraron mRNAs blancos que codifican para enzimas como: superóxido dismutasa para miR398, lacasa para miR397 y ATP sulfúrilasa para miR395. Al estudiar los patrones de expresión de miR395 en condiciones limitantes de azufre, se encontró que la acumulación de miR395 aumenta, y este incremento correlaciona inversamente con la acumulación de su mRNA blanco (ATP sulfúrilasa 1) [60]. En el mismo año, Sunkar y Zhu clonaron RNAs pequeños provenientes de bibliotecas de RNAs pequeños de plántulas de *A. thaliana* expuestas a distintos estreses abióticos. Entre los miRNAs identificados, miR393 responde fuertemente a frío, deshidratación, NaCl y al tratamiento con ABA; la acumulación de miR397b y miR402 aumenta ligeramente en respuesta a los mismos tratamientos, mientras que miR319c responde sólo a tratamiento por frío [61].

También se ha descrito la participación de miRNAs involucrados en estrés por limitación de nutrientes. Un ejemplo es la regulación de los niveles de fosfato, el cual se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos y membranas; frecuentemente este nutriente es limitante para el crecimiento de la planta. La homeostásis del fosfato es parcialmente controlada por la acción de un miRNA, miR399, el cual tiene como mRNA blanco al gen *PHO2/UBC24* (enzima putativa E2 ubiquitina-conjugasa) [60], [61]. Bajo condiciones limitantes de fosfato se induce la expresión de miR399 mientras que el mRNA blanco *UBC24* disminuye en raíces primarias. Particularmente, miR399 regula directamente la expresión de *PHO2/UBC24* al unirse en la región 5'UTR del mRNA [62]. Es probable que un factor transcripcional tipo MYB, *PHR1* (PHosphate Starvation Response), esté involucrado en la expresión de miR399. *PHR1* se expresa en respuesta a limitación de fosfato y regula positivamente a un grupo de genes de respuesta a fosfato al unirse al motivo de DNA "GNATATNC", encontrado corriente arriba del gen para miR399. Además, la mutante *phr1* muestra una reducción significativa en la expresión de miR399 en condiciones limitantes de fosfato [63]. Aunado a la existencia de los genes que responden a deficiencia de fosfato, también se inducen RNAs no codificantes, tal como *IPS1* (por sus siglas en inglés *Induced by Phosphate Starvation 1*), en *A. thaliana*. Una característica de este RNA es que tiene una secuencia altamente conservada de 24 nt que es casi perfectamente complementaria a la secuencia de miR399, sólo las bases 10 y 11 del miRNA se encuentran desapareadas con el transcrito de *IPS1*, lo cual impide su corte por el miRNA. La expresión de miR399 e *IPS1* se induce por deficiencia de fosfato, por lo que *IPS1* estaría actuando como un pseudo-blanco y titulando la actividad de miR399 sobre su blanco, *PHO2*. Recientemente, este mecanismo se ha denominado "*mimetismo*" y está involucrado en la modulación fina de la actividad de miR399 durante la respuesta a la limitación de fosfato [64].



El cobre (Cu) es un micronutriente esencial para la fotosíntesis, respuesta oxidativa y otros procesos fisiológicos [65]. Existe un miRNA clave para la regulación de la homeostásis del Cu que es el miR398. Cuando el Cu es limitante, los niveles de miR398 se incrementan y esto reduce la expresión de sus mRNAs blancos, *CSD1* y *CSD2* (Superóxido Dismutasas, en inglés *Copper Superoxide Dismutase*), dado que estas proteínas utilizan como cofactor cobre, lo dejan disponible para otros procesos esenciales [66]. Pero también miR398 participa en la respuesta a estrés oxidativo, donde contrario a la deficiencia de cobre, su expresión disminuye bajo condiciones de este tipo de estrés permitiendo que los transcritos de *CSD1* y *CSD2* incrementen reduciendo así la acumulación de radicales libres superóxidos que son altamente tóxicos para la planta [67].

### III.III miRNAs en respuesta a déficit hídrico

En busca de miRNAs potencialmente involucrados en respuesta a estrés hídrico, se determinó en *A. thaliana* que miR159 se induce en respuesta a ABA, durante la germinación de la semilla, en donde regula a los transcritos de dos factores transcripcionales, AtMYB33 y AtMYB101 [68]. La participación de estos miRNAs en la respuesta a ABA se confirmó al detectar que la inhibición de la actividad del miRNA, a través de la expresión de la proteína supresora viral P1/HC-Pro de los potivirus que da lugar a una acumulación de miRNAs no funcionales, resulta en hipersensibilidad a ABA durante la germinación de la semilla. Un fenotipo similar se observó en líneas transgénicas que sobre-expresaban las versiones de AtMYB33 y AtMYB101 resistentes al corte por miR159. En contraste, la sobre-expresión de miR159a o la pérdida de la función de AtMYB33 y AtMYB101 mostraron sensibilidad reducida a ABA durante la germinación. En este mismo estudio el incremento de la acumulación de miR159 en respuesta a la limitación de agua (deshidratación) durante la germinación, se asoció a la señalización por ABA y a la respuesta a sequía [68]. En un estudio independiente se encontró que miR160 regula la expresión del factor transcripcional ARF10 (AUXIN RESPONSE FACTOR 10), modulado también en respuesta a ABA durante la germinación [69]. Líneas transgénicas que expresan la versión mutante de ARF10, resistente al corte de miR160, muestran un fenotipo de hipersensibilidad a ABA durante la germinación, sugiriendo que en esta etapa del desarrollo existe un entrecruzamiento entre las señales de auxinas y ABA, algunas de las cuales estarían mediadas por miRNAs [69].

Otro ejemplo son dos miembros de la familia miR169 en *A. thaliana*, miR169a y miR169c, que en condiciones óptimas de crecimiento regulan la expresión de un factor transcripcional llamado NFYA5. Cuando plantas adultas de *A. thaliana* se tratan con ABA o se someten a sequía, se disminuye la acumulación de miR169a y miR169c para permitir la inducción de NFYA5 y de esta manera promover una mayor resistencia a sequía [70]. Sin embargo, en arroz el comportamiento de esta familia de miRNAs parece ser completamente opuesto: los miembros miR169g y miR169n/o se

inducen en respuesta a salinidad y sequía, lo que tiene como consecuencia una reducción del nivel del transcrito de NFYA5 [71]. Curiosamente, mientras que la misma familia conservada de miRNAs regula al mRNA blanco homólogo, parece ser que se comporta en sentidos opuestos en las dos especies analizadas.

Por otro lado, también se han obtenido microarreglos de miRNAs provenientes de *A. thaliana* y arroz para determinar sus perfiles de expresión en condiciones de estrés. Además de encontrar miRNAs que se inducen en sequía, se determinó que los genes para estos miRNAs presentaban elementos de respuestas en sus zonas promotoras cuya presencia es consistente con los resultados obtenidos a partir de los microarreglos [54], [53]. Un ejemplo es el promotor de Osa-*MIR169g* que por este tipo de datos se sugiere que su transcripción se regula directamente por el factor transcripcional CBF/DREB [53]. Recientemente, los análisis de microarreglos o de secuenciación masiva muestran que existen distintos miRNAs que se regulan por condiciones de déficit hídrico en distintas plantas; sin embargo, a la fecha no se ha definido su función en respuesta al estrés (revisado en [25]).

### III.IV miRNAs conservados y no conservados

Un número significativo de miRNAs que están compartidos en diversas especies vegetales han sido identificados. Algunos de estos miRNAs conservados responden a condiciones de estrés; sin embargo, podría haber otros que todavía no se conozcan, ya que la gran mayoría de los estudios se han enfocado a plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, entre otras. Por otra parte, miRNAs menos conservados podrían estar participando en la regulación de procesos fisiológicos y moleculares particulares de cada especie. Es probable que otras especies utilicen diferentes estrategias para enfrentar situaciones adversas similares [25].

Actualmente, el rápido aumento en la colección de genomas anotados y el avance de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, han permitido identificar miRNAs específicos de especie, como es el caso de *A. thaliana* [72], *Oryza sativa* (arroz) [73], *Populus trichocarpa* (álamo) [74], *Glycine max* (soya) [75] y *Medicago truncatula* [76].

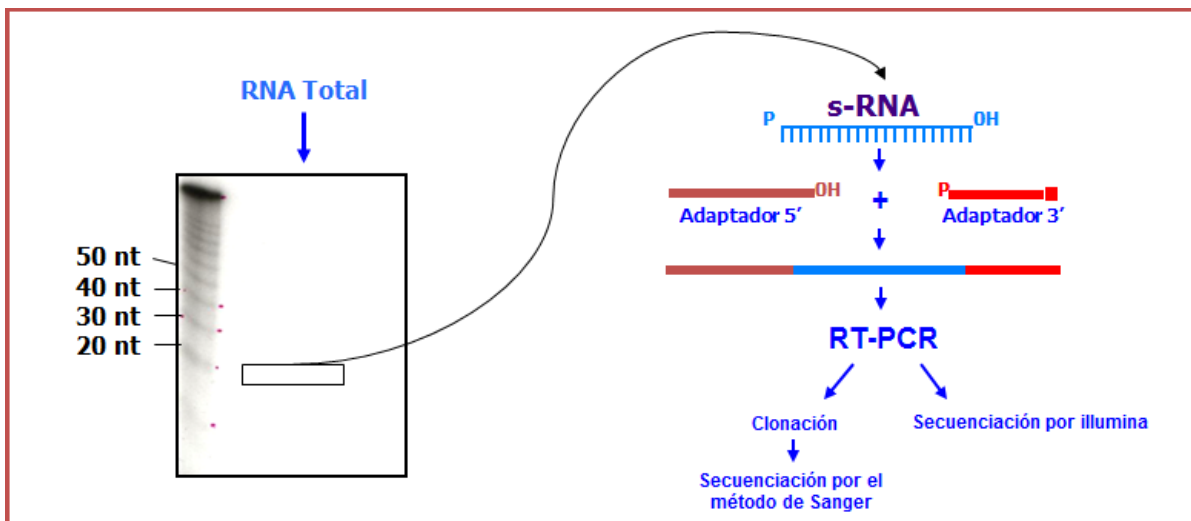
Algunos de estos miRNAs pueden contribuir al control de la respuesta a estímulos ambientales, y en algunos casos revelar estrategias, no descritas previamente, diferentes entre especies vegetales, e incluso entre variedades de la misma especie. Por lo tanto, la caracterización de miRNAs no conservados involucrados en la respuesta a estrés será importante para el descubrimiento de mecanismos que ayudarán a entender mejor esta respuesta de la planta.

Sin embargo, se ha sugerido que los miRNAs no conservados carecen de relevancia, principalmente porque algunas de sus características son que se expresan poco, se procesan imprecisamente, son más divergentes y parecen carecer de blancos [77]. Por ejemplo, en *A. thaliana*

~45% de los mRNA blancos para miRNAs conservados aumenta sus niveles de acumulación en múltiples mutantes de la vía de biogénesis de miRNAs (*hyl1*, *hst*, *dcl1*, *hen* y *ago1*) [78], [79], mientras que los niveles de transcritos para blancos de miRNAs no conservados no se ven afectados en estas mutantes, lo que indica que la mayoría de los miRNAs no conservados no están integrados en una red de regulación típica [80]. Una alternativa, es que estos miRNAs funcionan en patrones espacio-temporal restringidos, en respuestas específicas a estreses bióticos o abióticos, o que su modo de regulación no resulte en la degradación de su mRNA blanco [77]. Algunas de estas alternativas son actualmente objeto de estudio de varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro.

#### IV. ANTECEDENTES

En la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (frijol común), recientemente se ha reportado la identificación de miRNAs en respuesta a estrés, en particular aquéllos inducidos por sequía y tratamiento con ABA [81]. La estrategia se basó en la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños, a partir de la ligación de adaptadores a una muestra de RNA total fraccionada por tamaño y la amplificación de fragmentos mediante PCR, su clonación y secuenciación por el método clásico de Sanger (Fig. 2). Actualmente, los métodos de secuenciación de nueva generación (secuenciación masiva por la metodología de *illumina*), permite obtener millones de lecturas de fragmentos provenientes de bibliotecas producidas a partir de RNAs obtenidos de una condición determinada.

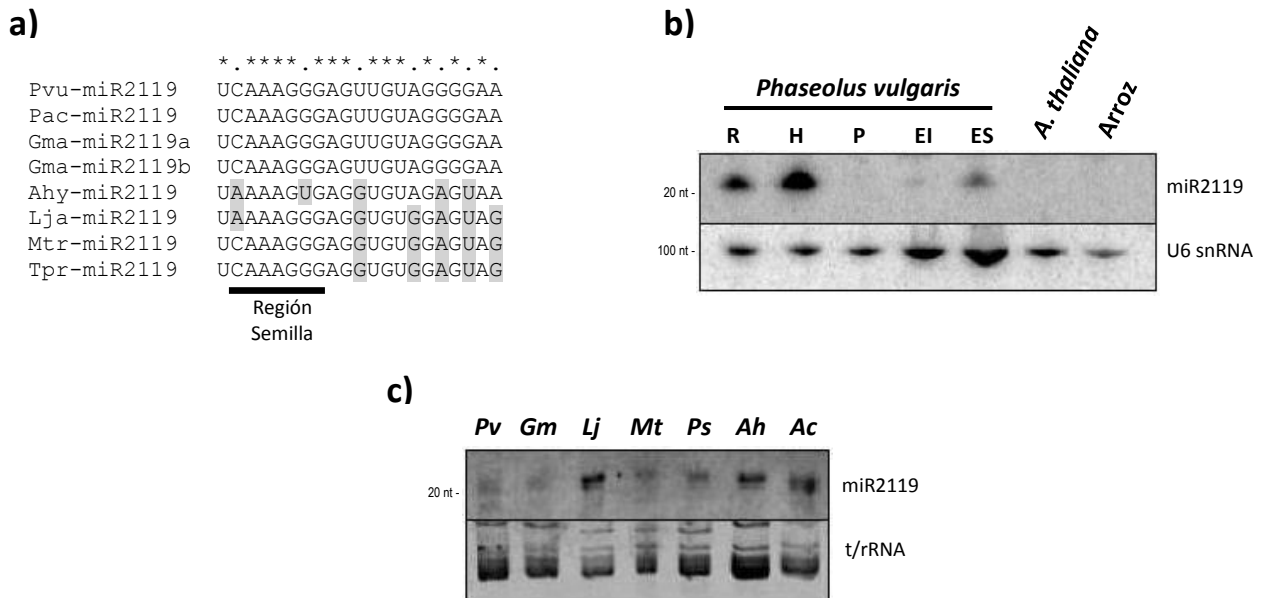


**Figura 2. Construcción de bibliotecas de RNAs pequeños (sRNA).** Panel izquierdo, en un gel de poliacrilamida se fracciona por tamaño una muestra total de RNA, en este caso se elige el tamaño de los sRNA típicos (21 nt  $\pm$  5 nt), después se procede a la ligación de adaptadores a la muestra fraccionada seguida por rondas de RT-PCR panel de la derecha, los fragmentos resultantes se clonan y secuencian por el método clásico (Sanger) o por secuenciación masiva (illumina).

En nuestro laboratorio estamos interesados en la identificación de aquellos miRNAs cuya acumulación aumenta en condiciones estresantes y que estén conservados en otras leguminosas como *G. max* y *M. truncatula*, aunque no en otras plantas modelo. Dentro de este grupo de secuencias de RNAs pequeños se espera encontrar elementos regulatorios para procesos celulares que puedan ser exclusivos de leguminosas y permitan expandir el conocimiento del espectro de estrategias que utilizan las plantas para contender con el déficit hídrico y/o asignar un mecanismo de respuesta particular, ante una condición adversa determinada, en alguna de estas leguminosas. Además, siendo el frijol común una leguminosa que se caracteriza por haber sufrido un proceso de

domesticación [82] y tener interacción endosimbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno [83], pensamos que pudiera tener respuestas específicas que creemos importantes de explorar.

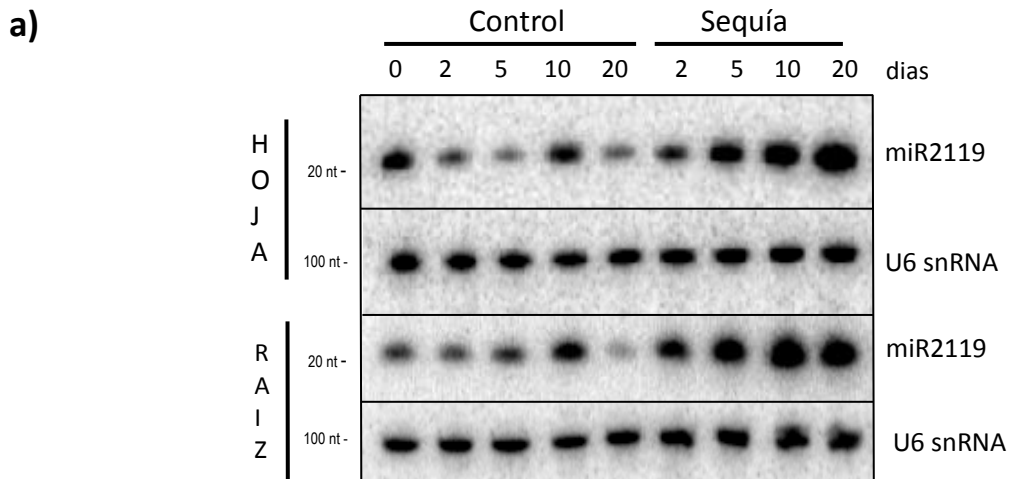
Tras la caracterización y el análisis de una biblioteca de RNAs pequeños de hojas adultas de plantas de frijol sometidas a limitación de agua, se identificó un nuevo miRNA, llamado miR2119 [81]. Este RNA pequeño, cuya secuencia es UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA, cumple con las características que definen a un miRNA, como son: su clonación a partir de una biblioteca de RNA pequeños, su detección en distintos órganos de frijol mediante análisis tipo Northern y su tamaño de 21 nt. Además, en estos mismos análisis no se detectó una señal de hibridación con muestras de RNA de *Arabidopsis* ni arroz, lo cual es consistente con la ausencia de la secuencia de miR2119 en estos genomas completamente secuenciados. En contraste, existe una conservación del miRNA maduro y de la secuencia precursora en al menos siete leguminosas: *P. vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *Lotus japonicus*, *Arachis hypogaea* y *Trifolium pratense* (Fig. 3 y Fig. S1) [84]. La secuencia madura de miR2119 se encuentra conservada sólo en especies de leguminosas, principalmente la región llamada semilla (del nucleótido 2 al 8), que es importante para el reconocimiento del mRNA blanco [85], lo cual sugiere que existe una presión selectiva para mantener la identidad de secuencia y conservar la función del miRNA a través del grupo de leguminosas analizadas (Fig. 3a).

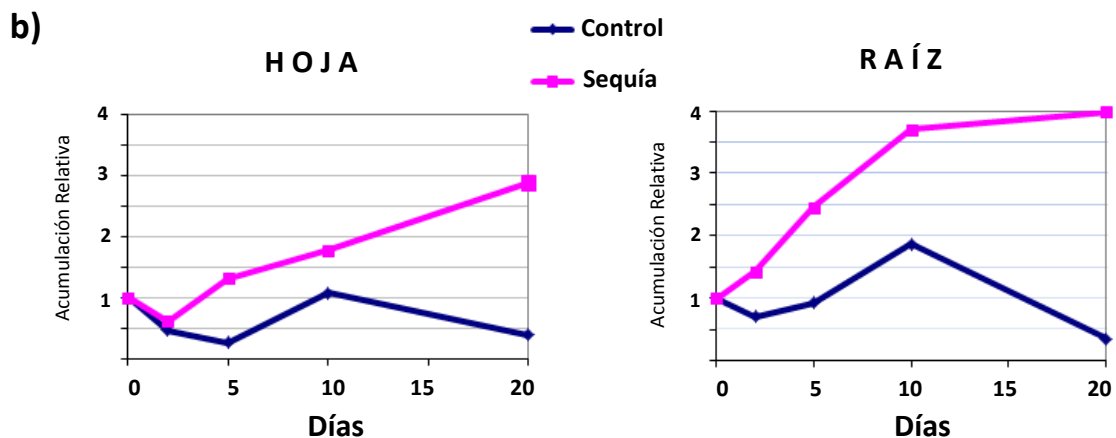


**Figura 3. Conservación y expresión de miR2119 en leguminosas.** **a)** Alineamiento de miR2119 maduro en leguminosas: *P. vulgaris* (pvu), *P. acutifolius* (Pca), *G. max* (gma), *L. japonicus* (lja), *M. truncatula* (mtr), *A. hypogaea* (ahy), *T. pratense* (tpr). **b)** Análisis tipo northern blot de miR2119 en diferentes órganos de frijol: raíz (R), hoja (H), plántula (p), embrión inmaduro (EI), embrión seco (ES), y muestras de hojas de *A. thaliana* y plántulas de arroz

(*Oryza sativa*). Se utilizaron 10µg de RNA total en cada carril y la cuantificación de la señal fue estandarizada con el control de carga U6 snRNA. **c)** Northern blot que muestra la expresión de miR2119 en diferentes especies de leguminosas. El RNA total (10µg) se extrajo de plántulas de: *P. vulgaris* (Pv), *G. max* (Gm), *L. japonicus* (Lj), *M. truncatula* (Mt), *Pisum sativum* (Ps), *A. hypogaea* (Ah), *Acacia cochliacantha* (Ac). El gel fue teñido con bromuro de etidio, los tRNAs y rRNAs fueron usados como control de carga (tomado de Arenas-Huertero et al., 2009) [81].

Para estudiar el patrón de acumulación de miR2119 en respuesta a limitación de agua se realizó una cinética con plantas adultas de frijol. El experimento consistió en crecer plantas adultas de la variedad Negro Jamapa durante cuatro semanas en condiciones óptimas de irrigación, después se aplicó el tratamiento de restricción de agua, al crecer a las plantas en sustrato con 1/12 del contenido de agua correspondiente a la capacidad de campo (sustrato saturado en agua). Hojas y raíces de plantas mantenidas en estas condiciones fueron recolectadas a los 0, 2, 5, 10 y 20 días del tratamiento. Durante el tratamiento se determinó el peso de las macetas y el contenido relativo de agua en hojas (Fig. S2 y Fig. S3, respectivamente). Las muestras provenientes de diferentes órganos de la planta fueron procesadas y utilizadas para realizar análisis tipo Northern (Fig. 4a), tras lo cual, la señal de hibridación fue cuantificada (Fig. 4b). Los resultados obtenidos indicaron que la acumulación de miR2119 es mayor conforme aumenta la duración del tratamiento, tanto en hoja como en raíz, lo que demostró que miR2119 se acumula en respuesta a déficit hídrico (Fig. 4) [84].





**Figura 4. Análisis de expresión de miR2119 en condiciones de sequía.** a) Análisis tipo Northern que muestra la acumulación de miR2119 en respuesta a sequía. El RNA total (10µg) se extrajo de hojas y raíces de plantas adulta crecidas en óptimas condiciones (control) y expuestas a sequía en diferentes puntos 0, 2, 5, 10 y 20 días. La hibridación con U6 snRNA fue usada como control de carga. b) Las gráficas muestran la cuantificación de la acumulación de miR2119 en la cinética con respecto al día inicial (0 días) de los tratamientos (valor=1), normalizadas respecto a la señal de U6 snRNA.

Con la finalidad de estudiar la función regulatoria de miR2119 se planteó la identificación de su(s) mRNAs blanco(s). Para ésto, se realizó una búsqueda mediante herramientas bioinformáticas de los posibles blancos a través del apareamiento complementario de bases Watson y Crick. Se emplearon dos programas para la predicción de blancos: miRanda [86] (Tabla I) y *Web MicroRNA Designer 3 application* (WMD3) [87]. El primer programa fue adaptado para búsqueda de mRNAs blancos en plantas, el segundo se encuentra disponible en el sitio web: <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>. Los dos programas de análisis llevaron a la conclusión de que el mRNA blanco más probable para miR2119 es el transcrito uno de los genes que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH1*). Además, este mRNA no sólo se encontró como el blanco más probable para el miR2119 de frijol, sino también como el blanco para el miR2119 de *P. acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *A. hypogaea* y *L. japonicus* (Fig. 5). A pesar de encontrar algunos cambios entre el miR2119 de estas diferentes especies (Fig. 3a), existen cambios compensatorios que le permiten al mRNA de *ADH1* conservar el apareamiento con miR2119 en las distintas leguminosas (Fig. 5).

Este trabajo se dirigió a la caracterización funcional del miR2119 en la respuesta a la limitación de agua, con la finalidad de ampliar nuestro conocimiento de los mecanismos que regulan la respuesta de frijol ante este ambiente adverso.

Tabla I. Predicción de mRNA blancos para Pvu-miR2119 mediante el programa miRanda [81].

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

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

<p><i>Phaseolus vulgaris</i> (ΔG=-36.21 kcal/mol)</p> <p>PUT-181a-24834 (ADH1) 5' AUCCUCUUC AACUCCCUUUGC 3' -   : -   </p> <p>Pvu-miR2119 3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' *** ** *****</p>	<p><i>Medicago truncatula</i> (ΔG=-37.77 kcal/mol)</p> <p>Medtr3g125230 (ADH1) 5' AUACUCUUCACCUCCCUUUGU 3' -   :-   </p> <p>Mtr-miR2119 3' GAUGAGGUGUGGAGGGAAACU 5' ***** *****</p>
<p><i>Phaseolus acutifolius</i> (ΔG=-36.21 kcal/mol)</p> <p>PUT-181a-34634 (ADH1) 5' AUCCUCUUC AACUCCCUUUGC 3' -   : -   </p> <p>Pca-miR2119 3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' *** ** *****</p>	<p><i>Arachis hypogaea</i> (ΔG=-33.59 kcal/mol)</p> <p>PUT-171a-10168 (ADH1) 5' AUCCUCUUCACCUCCCUUUGC 3' -   :-   </p> <p>Ahy-miR2119 3' AAUGAGUUGGAGGAGGAAAU 5' * *****</p>
<p><i>Glycine max</i> (ΔG=-36.21 kcal/mol)</p> <p>Glyma13g09530 (ADH1) 5' AUCCUCUUC AACUCCCUUUGC 3' -   : -   </p> <p>Gma-miR2119a/b 3' AAGGGGAUGUUGAGGGAAACU 5' *** ** *****</p>	<p><i>Lotus japonicus</i> (ΔG=-39.92 kcal/mol)</p> <p>PUT-171a-37083 (ADH1) 5' AUACUCUUCACCUCCCUUUGC 3' -   :-   </p> <p>Lja-miR2119 3' GAUGAGGUGUGGAGGGAAAU 5' ***** *****</p>

Figura 5. Resultados de WMD3 para el análisis del mRNA blanco de miR2119. Se muestra el apareamiento para seis especies de leguminosas: *P. vulgaris*, *P. acutifolius*, *G. max*, *M. truncatula*, *A. hypogaea* y *L. japonicus*. En gris se resaltan los cambios nucleotídicos en el miRNA y en verde los cambios que existen en ADH1 con respecto a frijol.



## **V. HIPÓTESIS:**

miR2119 es un microRNA que participa en la regulación de los mecanismos de respuesta a déficit hídrico mediante la modulación de la actividad de sus blancos.

## **VI. OBJETIVOS:**

- Evaluar la estructura génica de *MIR2119* en frijol y otras leguminosas.
- Evaluar la expresión del gen *MIR2119* en respuesta a déficit hídrico en frijol.
- Analizar la funcionalidad del gen *MIR2119* en respuesta a déficit hídrico en frijol.
- Determinar si miR2119 posee blancos regulatorios en frijol.
- Explorar la expresión de los potenciales blancos de miR2119 en respuesta a condiciones de estrés.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.I Extracción de RNA

La obtención de RNA total se realizó usando el protocolo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), con las siguientes modificaciones: el lavado final de la pastilla de RNA se hizo con etanol al 100% y se resuspendió en 40  $\mu$ l de formamida 50%.

### VII.II Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Uno a dos  $\mu$ g del RNA total se trataron con DNAsa I utilizando 1  $\mu$ l de Buffer 10X con  $MgCl_2$  y agua libre de RNAsas para llevarlo a un volumen de 9  $\mu$ l. Después se agregó 1  $\mu$ l de la enzima DNAsa I (Fermentas) y se incubó a 37° por 30 min. La reacción se finalizó agregando 1  $\mu$ l de EDTA y calentando por 10 min a 65°C. Este RNA se utilizó para la síntesis de cDNA que se describe a continuación.

Para la obtención de cDNA se utilizó el protocolo de la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). Se utilizaron 500 ng – 1  $\mu$ g de RNA total al cual se le añadieron 1  $\mu$ l de dNTPs (10mM), 1  $\mu$ l de Random Primers (250 ng) y agua estéril en un volumen de 12  $\mu$ l y se incubó a 65° por 5 min con la finalidad de linearizar el RNA y evitar estructuras secundarias. Después la muestra se pasó a hielo y se añadieron 4  $\mu$ l de buffer 5X first-Strand, 2  $\mu$ l de DTT (0.1 M), 1  $\mu$ l de RNAasa OUT y 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l) de enzima SuperScript III para obtener una reacción en un volumen final de 20  $\mu$ l que se incubó a 50 °C durante 1 hr. Para realizar una reacción de PCR de 25  $\mu$ l se utilizó 1  $\mu$ l del cDNA.

### VII.III Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la reacción de PCR se preparó una mezcla con los reactivos siguiente reactivos: PCR Buffer 1X (10mM Tris.HCl, 50 mM KCl; pH 8.3),  $MgCl_2$  (1.5 mM), dNTP's (0.2 mM), oligonucleótido Forward (0.2  $\mu$ M), oligonucleótido Reverse (0.2  $\mu$ M). Además, se utilizó sólo el 10% de la reacción de cDNA como templado y se le añadió 1 $\mu$ l de la enzima *Taq* DNA polimerasa (5U/ $\mu$ L) a la reacción en un volumen final de 50  $\mu$ l. La concentración óptima del  $Mg^{++}$  se ajustó de acuerdo al templado y al par de oligonucleótidos. El protocolo utilizado para iniciar la reacción de PCR contempla la desnaturalización de la muestra del DNA a 94°C por 2 min. Realizar de 15 a 40 ciclos de PCR bajo las condiciones adecuadas para la enzima en la extensión y en el alineamiento.

#### **VII.IV Amplificación del precursor de pre-miR398a-2119**

Para amplificar el precursor de pre-miR398a-2119 se diseñaron oligonucleótidos (ver Tabla II, en anexos) en base a un alineamiento de las secuencias de este precursor de soya (gi: 27808890 en NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el contig de frijol No. 90538 (Proyecto Genoma-CYTED, PhasIbeam, <http://www.genoma-cyted.org/index.html>), eligiendo regiones del alineamiento altamente conservadas. Los oligonucleótidos que se utilizaron en la reacción de RT-PCR se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Se utilizó RNA proveniente de hojas de plantas adultas de frijol variedad Negro Jamapa sometidas a 20 días de sequía para la síntesis del cDNA. En el programa de la reacción de RT-PCR el apareamiento de los oligonucleótidos se realizó a 58°C.

#### **VII.V Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (protocolo de Fermentas)**

Se escindió el fragmento del gel con la banda de interés, se pesó y se le añadieron 100 µl de solución Binding Buffer por cada 100 mg de agarosa  $\leq 2$  %. Se incubó a 50-60°C por 10 min, para que se disuelva la agarosa en la solución, se transfirió a una columna y se centrifugó a  $\geq 12,000$  rpm por 1 min. Se lavó la columna agregando 700 µl de solución Wash Buffer (solución de lavado que contiene etanol) y se centrifugó a  $\geq 12,000$  rpm por 1 min. Para la elución de DNA, la columna se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y se le agregaron 50 µl de buffer de elución caliente (65°C) directamente al centro de la columna, se incubó por 2 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a  $\geq 12,000$  rpm por 2 min, para recolectar la muestra. Se determinó la concentración mediante el uso del espectrofotómetro (Nanodrop).

#### **VII.VI Clonación del producto de PCR**

Para la clonación del producto de PCR se utilizó el vector TOPO-TA (Invitrogen). Se preparó la siguiente reacción: 1 µl del PCR purificado ( $\sim 10$  ng/µl), 1 µl solución de sales diluidas (1/4), 1 µl del vector y 3 µl de H<sub>2</sub>O para tener un volumen final de 6 µl. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó la transformación de las células, para lo cual se utilizaron 1.5 µl de la reacción de clonación.

#### **VII.VII Transformación de células competentes de *E. coli***

Como método de transformación se utilizó la electroporación, sometiendo a las bacterias de *E. coli*, cepa XL1 BLUE, a un choque eléctrico de 2.5 kV en presencia de la reacción de ligación.

Posteriormente se le agregó 1 ml de LB a las células y se recuperaron durante 1 hr a 37°C con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó 1 min a 14000 rpm, se eliminó 800 µl de sobrenadante y se dispersaron 150 µl de células en una caja Petri con LB sólido con kanamicina (25 µg/ml), que se incubaron a 37°C durante toda la noche.

#### **VII.VIII Extracción de DNA plasmídico (GeneJET Plasmid miniprep kit Fermentas)**

Para el cultivo de las bacterias, se inocularon 4 ml de medio LB con la cepa de interés al cual se le agregó el antibiótico correspondiente para el cual la cepa es resistente, y las bacterias se crecieron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se centrifugó durante 3 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 250 µl de solución I, después se le añadieron 250 µl de solución II, para lisar las células, mezclando por inversión de 4-6 veces hasta obtener una solución viscosa. En seguida, se agregaron 350 µl de Solución III, para neutralizar la reacción, mezclando por inversión de 4-6 veces para posteriormente centrifugar 5 min y transferir el sobrenadante a una columna para fijar el DNA. Se lavó la columna en dos ocasiones, agregando 500 µl de solución IV (solución de lavado) y, nuevamente, se centrifugó de 30-60 segundos y 1 min más para limpiar la columna. Después la columna se transfirió a un tubo limpio (1.5 ml) agregando 50 µl de solución V (buffer de elución), para eluir el DNA plasmídico, incubando por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 2 min y se recolectó la muestra. La concentración se determinó en el espectrofotómetro (Nanodrop) y el DNA (500 - 750 ng/µl de DNA en un volumen de 15 µl) se secuenció en la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

#### **VII.IX Análisis tipo Northern blot para miRNAs**

Para el análisis tipo Northern, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 15% (PAGE/8 M urea/0.5x TBE) a 20 mA durante 45 min, con muestras de 10 µg de RNA total. Después se transfirió el RNA del gel a una membrana de nitrocelulosa Hybond N<sup>+</sup> (Amersham, Piscataway, NJ) en una condición semi-seca a 100 mA por 35 min con buffer TBE 0.5X. Posteriormente, el RNA se fijó a la membrana con luz UV (Stratalinker Stratagene) en tres ocasiones bajo condiciones predeterminadas. La membrana se pre-hibridó con solución Ultrahyb-Oligo (Ambion, Austin, TX) (10ml de solución por cada membrana de 10 x 10cm) al menos 30 min a 42°C, a la cual se agregó la sonda marcada radioactivamente para hibridar por lo menos 10 horas a 42°C. La membrana se lavó dos veces con 2XSSC/0.1%SDS durante 30 min a 42°C y se expuso a una pantalla de phosphor Imager. La señal se detectó usando el Typhoon (Amersham) y se cuantificó con el software Image

Quant. Para el reuso de la membrana, ésta se lavó con 0.1XSSC/0.1%SDS hirviendo 2 veces por 10 min para eliminar la sonda.

Para el marcaje de la sonda se utilizó un oligonucleótido de DNA que contiene la secuencia complementaria al miRNA candidato (ver Tabla II, en anexos). Para esto, se preparó la siguiente reacción: 3  $\mu\text{l}$   $\gamma\text{P}^{32}$ -ATP (10 pmol de ATP), 1  $\mu\text{l}$  oligonucleótido (10 pmol), 1  $\mu\text{l}$  10X buffer, 1  $\mu\text{l}$  T4 polinucleótido cinasa (Fermentas, Hanover, MD) y 4  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  para tener un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , la reacción se incubó a 37°C durante una hora. La sonda se purificó usando una columna de Sephadex G25 (Roche, Indianapolis, IN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## VII.X Construcción y Sobreexpresión de precursores en vector binario pBA-DC.

### 1) Clonación del producto de PCR en el vector pENTR-TOPO (Invitrogen).

Se inició amplificando cada uno de los precursores con Platinum Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) usando como templado el plásmido (Vector TOPO-Pvu-pre-miR398a-2119) que contiene el fragmento completo de pre-miR398a-2119. Es necesario para la clonación en pENTR que el oligonucleótido del extremo 5' diseñado inicie con los nucleótidos "CACCC" para clonar el inserto en orientación correcta. Se preparó la siguiente reacción de PCR para amplificar los precursores como producto: PCR Buffer 1X (10mM Tris.HCl, 50 mM KCl; pH 8.3),  $\text{MgCl}_2$  (2 mM), dNTP's (0.2 mM), oligonucleótido Forward "CACCC" (1  $\mu\text{M}$ ), oligonucleótido Reverse (1  $\mu\text{M}$ ); además, se le añadieron a la reacción como templado 2  $\mu\text{l}$  de DNA plasmídico (~10 ng/ $\mu\text{l}$ ), 0.4  $\mu\text{l}$  de la enzima Platinum Pfx polimerasa (1 unidad) y se adicionó agua hasta un volumen final de 40  $\mu\text{l}$ .

Una vez finalizada la reacción de PCR, la muestra se resolvió en un gel de agarosa 2% para purificar la banda correspondiente al tamaño del precursor, esta banda fue purificada, cuantificada mediante Nanodrop y usada para ligarla al vector pENTR en la siguiente reacción: 1  $\mu\text{l}$  de banda de PCR purificada (~ 5ng/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de solución salina (dilución 1:4), 1  $\mu\text{l}$  de vector pENTR-TOPO y 3  $\mu\text{l}$  de agua estéril para tener un volumen final de 6  $\mu\text{l}$ .

La reacción se ligó por 1 hr a temperatura ambiente y se utilizó 1  $\mu\text{l}$  del volumen final para la transformación de bacterias *E. coli* TOP10 por electroporación. Inmediatamente después de la electroporación se le añadieron 250  $\mu\text{l}$  de medio S.O.C y se incubó a 37°C con agitación constante durante 1 hr. Finalmente, se dispersaron 100 $\mu\text{l}$  en una caja Petri con LB sólido más kanamicina (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias transformadas se verificaron por PCR y se seleccionaron para purificar el plásmido de la manera descrita.

### 2) Construcción del vector binario pBA-Pvu-premiR398a-2119 y sus derivados.

La construcción en pENTR se utilizó para realizar una recombinación con el vector pBA-DC con la finalidad de intercambiar el fragmento de interés (contenido en pENTR) por el gen *ccdB* y el cassette de resistencia a cloranfenicol ( $\text{Cm}^R$ ), presentes en el vector binario. El vector binario pBA-DC diseñado para dirigir la expresión del inserto con el promotor viral 35S de CaMV, contiene un gen que confiere resistencia al herbicida BASTA y otro que permite la selección de bacterias con espectinomicina. La reacción de recombinación se preparó de la siguiente manera: 1  $\mu\text{l}$  de vector binario pBA-DC ( $\sim 100\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  del plásmido con el precursor clonado en pENTR ( $\sim 100\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y por último, 1  $\mu\text{l}$  de la enzima Gateway LR clonase II (Invitrogen).

El volumen final de la reacción de recombinación fue de 5  $\mu\text{l}$  y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Para la transformación se utilizaron bacterias *E. coli* cepa XL1-Gold quimiocompetentes, de las cuales se utilizó una alícuota de  $\sim 100 \mu\text{l}$  a la que se le añadieron 2.5  $\mu\text{l}$  de la reacción y se incubó por 30 min en hielo, después se congelaron en nitrógeno líquido durante 2 min y se descongelaron a  $37^\circ\text{C}$  por 2 min en dos ocasiones. Después se agregó 1 ml de LB y las células se recuperaron por 1 hr a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó 1 min a 14000 rpm y se eliminaron 900  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de LB líquido, posteriormente se dispersaron  $\sim 200 \mu\text{l}$  de células resuspendidas en una caja Petri de LB sólido con espectinomicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Las colonias transformadas se verificaron por PCR y las que contenían el fragmento integrado en el plásmido de selección se utilizaron para extraer el DNA del plásmido recombinante.

### 3) Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 GV3101 con el vector binario

Para transformar *Agrobacterium* se añadió 1  $\mu\text{g}$  de plásmido pBA-DC purificado a una alícuota de bacterias de  $\sim 100 \mu\text{l}$  que se incubaron durante 30 min en hielo. Después se congelaron en nitrógeno líquido durante 2 min y se descongelaron a  $37^\circ\text{C}$  por 5 min, transcurrido este tiempo, se agregó 1 ml de LB y las células se recuperaron 2 hr a  $28^\circ\text{C}$ , para posteriormente, dispersar 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en medio LB sólido adicionado con espectinomicina y rifampicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  cada uno de los antibióticos) e incubar a  $28^\circ\text{C}$  de 2 a 3 días.

### 4) Infiltración de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium*

Con la cepa transformada con el plásmido, se inocularon 5 ml de LB con los respectivos antibióticos y se crecieron a  $28^\circ\text{C}$  por 48 hr, con agitación constante (300 rpm). Se tomó 1 ml del cultivo y se transfirió a 50 ml de LB con 10 mM de MES pH 5.6 y 20  $\mu\text{l}$  de acetosyringona (100 mM). Se crecieron las bacterias  $\sim 16$  hr a  $28^\circ\text{C}$  hasta que alcanzaron una densidad óptica de 1 ( $\text{OD}_{600}=1$ ). Las bacterias se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y la pastilla se resuspendió en 50 ml de  $\text{MgCl}_2$  (10 mM). Se les añadió a las bacterias 75  $\mu\text{l}$  de acetosyringona (100 mM) y se incubaron al

menos 3 hr a temperatura ambiente sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a la infiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana*, de 6 semanas de edad, por el lado abaxial utilizando una jeringa sin aguja. Las hojas fueron recolectadas a las 48 hr después de la infiltración y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior extracción de RNA.

#### **VII.XI 5'RACE modificado**

La reacción de 5'RACE modificado se realizó de acuerdo al protocolo de FirstChoice RLM-RACE (Ambion), iniciando con la ligación del adaptador 5' (ver Tabla II, en anexos) al extremo 5' del RNA y omitiendo los pasos de desfosforilación con CIP y la eliminación de 5'-CAP con TAP. Se preparó la reacción de la ligación del adaptador 5', donde se utilizó RNA de hojas sometidas a 20 días de sequía y se describe a continuación: 3 µl de RNA (1.7µg/µl), 1 µl del adaptador 5'RACE (0.5 µg/µl), 1 µl de buffer 10X RNA ligasa con ATP, 1 µl T4 RNA ligasa (2.5 U/µl) y 4 µl de agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 10 µl.

La reacción se mezcló y el volumen final de 10 µl se incubó 37°C por 1 hr. En el siguiente paso, se utilizó 20% de la reacción de ligación del adaptador para realizar la síntesis de cDNA siguiendo los mismos pasos mencionados anteriormente. Se utilizaron dos reacciones de PCR anidados (ver Tabla II, en anexos). El producto de PCR se introdujo en el vector TOPO y se utilizaron clonas independientes para la obtención del plásmido. La secuenciación del inserto se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

#### **VII.XII PCR cuantitativo (qPCR) o de tiempo real**

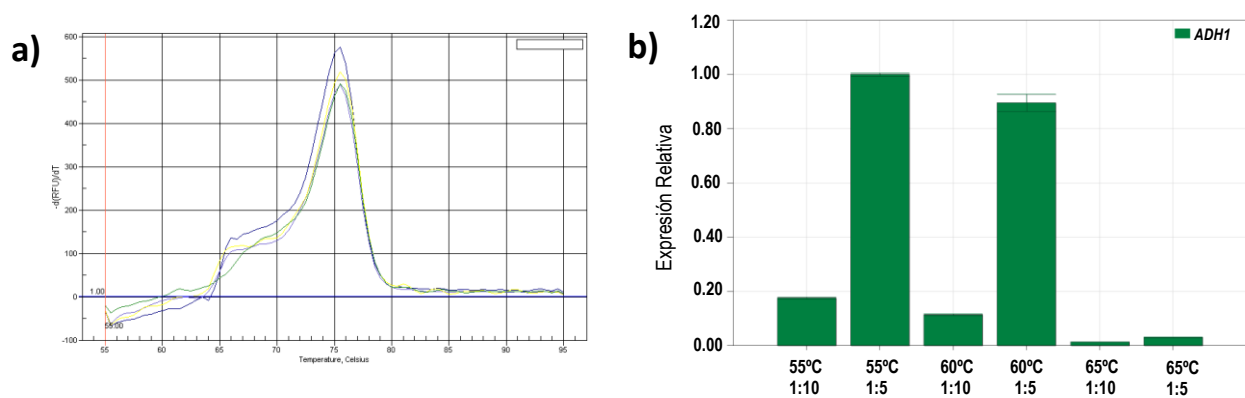
La preparación del cDNA que se utiliza para la PCR de tiempo real de microRNAs se inicia con la poliadenilación de la muestra de RNA total en el extremo 3'. Después se procede a la obtención de cDNA con un oligonucleótido universal RT primer que es complementario a la cola de poliA adicionada, para lo cual se utilizó el kit Ncode (Invitrogen). La mezcla de The Maxima® SYBR® Green/Flourescein qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) está lista para ser utilizada en la reacción RT-qPCR de tiempo real para máquinas de Bio-Rad iCycler iQ5™, sólo se necesita añadir el oligonucleótido específico para el miRNA y el cDNA de la condición a evaluar.

En cambio, al cDNA utilizado para medir expresión de mRNAs no se necesita someter a poliadenilación, dado que el transcrito ya la contiene; sin embargo, es importante tratar el RNA total con DNAsa (descrito previamente en la parte de síntesis de cDNA) para evitar cualquier contaminación de DNA que pueda ser sumado a la amplificación del transcrito. Para el uso del templado de cDNA en la reacción se hacen diluciones de cDNA (1:5 ó 1:10) para la amplificación del

fragmento. A continuación se describe la preparación de la reacción de qPCR con master mix: 7.5  $\mu$ l de Maxima® SYBR® Green/Flourescein qPCR Master Mix (2X), 0.6  $\mu$ l de oligonucleótido forward (10  $\mu$ M), 0.6  $\mu$ l de oligonucleótido reverse (10  $\mu$ M), 3  $\mu$ l de cDNA templado (dilución 1:5 o 1:10) y por último, añadir agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 15  $\mu$ l. Las condiciones de amplificación son enlistadas en la Tabla III, en anexos.

Para realizar la medición del transcrito de un mRNA por PCR de tiempo real es importante el diseño de los oligonucleótidos, mismos que deben ser específicos para amplificar solamente el mRNA que se desea. En el caso del mRNA de *ADH1* sólo se tenía clonado hasta el sitio de corte del miR2119, por lo que se llevó a cabo la clonación de un fragmento de *ADH1* más extenso corriente arriba del sitio de corte basados en las secuencias de EST's de *P. vulgaris*. Este fragmento se utilizó de guía para diseñar los oligonucleótidos del PCR de tiempo real de *ADH1*. Se diseñaron los oligonucleótidos para abarcar el sitio del miRNA y así analizar la abundancia del transcrito completo.

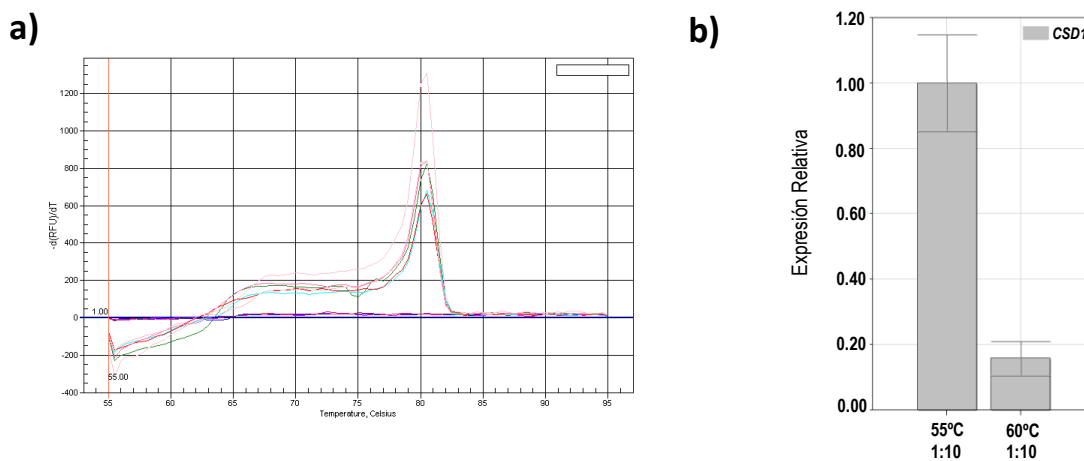
Se verificaron cuatro oligonucleótidos (ver Tabla II, en anexos), los cuales fueron previamente analizados en RT-PCR semicuantitativo y verificados en geles de agarosa para determinar si la amplificación producía solamente el producto predicho. Sólo un par de oligonucleótidos ADHFwd-RT y ADHRev-RT2 (ver Tabla II, en anexos) fueron elegidos para realizar la qPCR; de éstos se analizó su curva de renaturalización (*melting curve*), la cual mostró mayoritariamente un pico, consistente con una amplificación específica (Fig. 6a). En este experimento, se utilizaron diluciones de cDNA de 1:5 y 1:10, y temperaturas en el paso del alineamiento del oligonucleótido de 55°, 60° y 65° (Fig. 6b). Sin embargo, análisis realizados con otras muestras de cDNA al final del trabajo, mostraron la presencia de un segundo transcrito de *ADH*. Queda como perspectiva diseñar oligonucleótidos que nos permitan detectar específicamente el transcrito de *ADH1* regulado por miR2119.



**Figura 6. Verificación de amplificación de *ADH1* por qPCR. a)** Curva de renaturalización de *ADH1* utilizando el par de oligonucleótidos ADHFwd-RT y ADHRev-RT2. **b)** Expresión relativa de la amplificación de *ADH1* en diferentes  $T_m$ 's y en dos distintas diluciones de cDNA (1:10 y 1:5).



Al igual que para *ADH1*, con *CSD1* se siguió el mismo procedimiento para poder elegir el par de oligonucleótidos que se utilizarían para el qPCR. Previamente, se evaluaron cuatro oligonucleótidos por RT-PCR semicuantitativo y al final, se eligió el par de oligonucleótidos CSD1-Fwd y CSD1-qRev2 (ver Tabla II, en anexos) para detectar el transcrito de *CSD1*. En el experimento de qPCR, se observó que la curva de renaturalización de *CSD1* solo mostraba un pico, consistente con una amplificación específica (Fig. 7a); utilizando una dilución de cDNA (1:10) y temperaturas en el paso del alineamiento del oligonucleótido de 55°, 60° y 65° (Fig. 7b). Además, se realizó una curva de calibración para este mismo par de oligonucleótidos, donde se obtuvo una eficiencia de 97.9% y  $R^2=0.991$ .

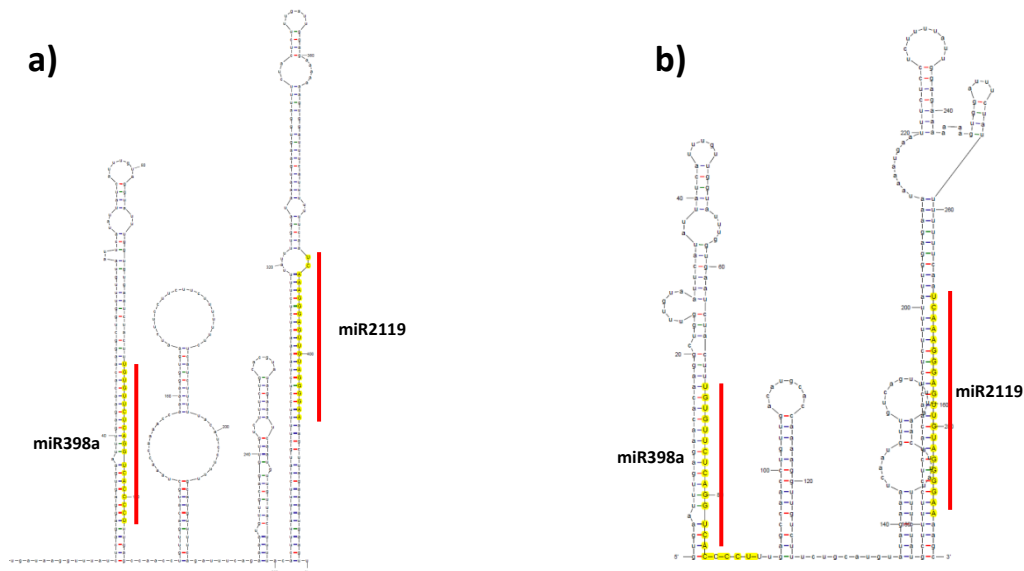


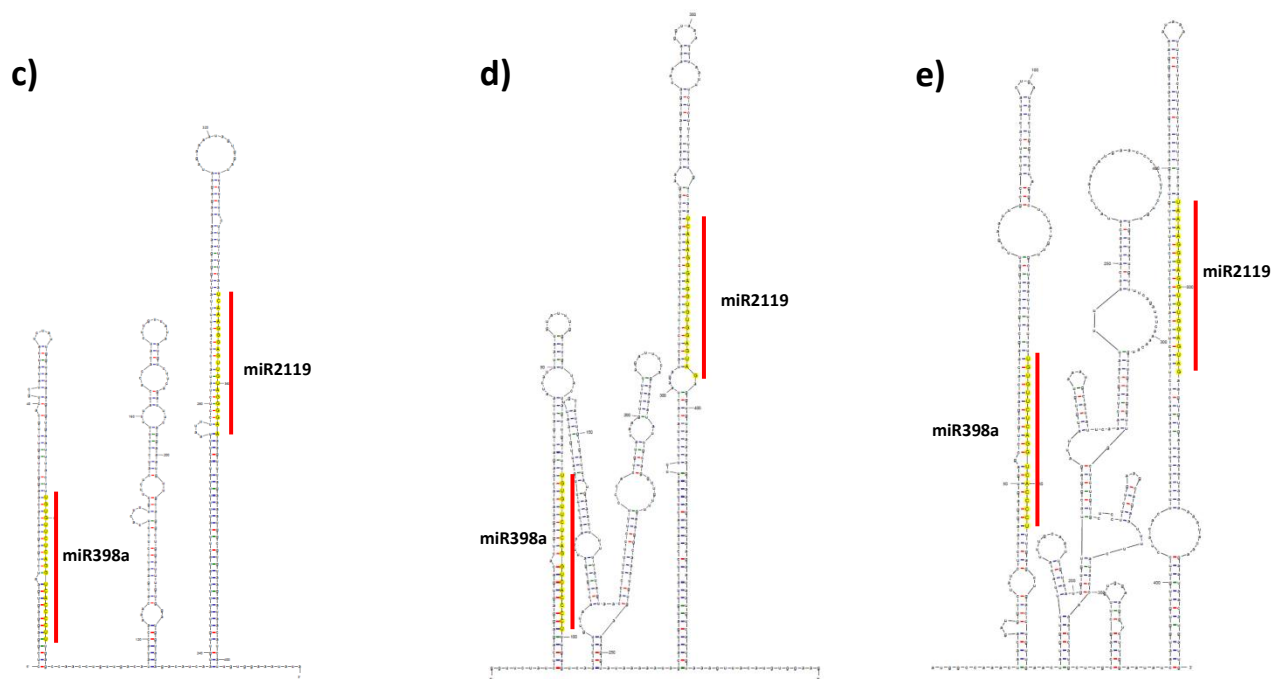
**Figura 7. Verificación de amplificación de *CSD1* por qPCR. a)** Curva de renaturalización de *CSD1* utilizando el par de oligonucleótidos CSD1Fwd-RT y CSD1Rev-RT2. **b)** Expresión relativa de la amplificación de *CSD1* con dos diferentes  $T_m$ 's y usando una dilución de cDNA de 1:10.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.I miR398a y miR2119 están codificados en un mismo precursor.

Recientemente se llevó a cabo la secuenciación del genoma completa del frijol en el Laboratorio Nacional para la Biodiversidad (Langebio)-CINVESTAV, el cual se encontraba en el proceso de ensamblaje de secuencias (contigs) y anotación del genoma durante la elaboración de este trabajo. Sin embargo, se pudo tener acceso a las secuencias ensambladas para realizar comparación a través de uso del programa BLAST en el sitio web (<http://mazorka.langebio.cinvestav.mx/blast/blast.html>). Se realizó una búsqueda utilizando la secuencia del precursor de miR2119 antes publicada [81] donde se encontró el contig No. 90538 con longitud de 794 nt, el cual contenía al miR2119. Del análisis de secuencia que se llevó a cabo, sorpresivamente se encontró que el mismo contig contenía la secuencia de miR398a obtenida de los datos de secuenciación masiva publicados para frijol [88]. El programa mfold para la predicción de estructura secundaria de RNA (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>), determinó que el contig No. 90538 adopta dos estructuras características de precursores de miRNAs, las cuales contenían a miR398a y miR2119 espaciadas por ~100 nt (Fig. 8a). Esto nos indicó que posiblemente el mismo transcrito podría ser procesado por la maquinaria de miRNAs y de esa manera producir dos miRNAs maduros que regularían mRNAs blancos diferentes. Así, conociendo las secuencias precursoras de miR2119 en siete leguminosas, se realizó una búsqueda en estos EST's para ver si también contenían la secuencia de miR398a. El análisis obtenido mostró que los EST's que contenían los dos miRNAs maduros fueron *Phaseolus acutifolius*, *Glycine max*, *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus* (Fig. 8b, c, d y e, respectivamente).





**Figura 8. Secuencias de pre-miR398-2119 en leguminosas.** Se muestra las estructuras secundarias predichas por Mfold para las secuencias de **a)** contig No.90538 de *Phaseolus vulgaris*, **b)** EST de *Phaseolus Acutifolius* (gi: 308787600) **c)** EST de *Glycine max* (gi:27808890), **d)** EST de *Medicago truncatula* (gi:7261602) y **e)** EST de *Lotus japonicus* (gi:29970356).

El gen *MIR398* codifica un miRNA conservado que inicialmente fue identificado en *A. thaliana* por métodos computacionales y después en bibliotecas de RNAs pequeños en condiciones de estrés. La familia de *MIR398* se encuentra conservada en plantas como arroz, *L. japonicus* y *M. truncatula* [60], [61]. En *A. thaliana*, la familia de *MIR398* está constituida por tres loci: *MIR398a*, *MIR398b* y *MIR398c*. Los miRNAs maduros de *MIR398b* y *MIR398c* son idénticos en secuencia, mientras que el miRNA maduro de *MIR398a* sólo difiere en un nucleótido en el extremo 3', con respecto a miR398b y miR398c (Fig. 9) [89].

En el genoma de *G. max* hay dos loci anotados para *MIR398* en los cromosomas 1 y 2 (gma-*MIR398a* y gma-*MIR398b*, respectivamente, miRBase versión 18.0, Fig. 9) con la misma secuencia del miRNA maduro. En nuestro análisis correspondiente a la secuencia genómica de soya, encontramos a miR2119 corriente abajo de miR398 en ambos cromosomas, a una distancia de 250 nt en el cromosoma 1 y a 244 nt en el cromosoma 2. La secuencia precursora encontrada en el EST descrito para *G. max* (gi: 27808890) en la Fig. 8, corresponde al locus ubicado en el cromosoma 1. Además, existen otros dos loci más de *MIR398* en soya, uno en el cromosoma 8 (*MIR398c*, miRBase versión 18.0) y uno más en el cromosoma 2 que no ha sido anotado, el cual fue designado en este

trabajo como *MIR398d*. miR398c y miR398d comparten la misma secuencia y varían en dos posiciones con respecto a miR398a y miR398b, y no incluyen algún otro precursor para miR2119. Una situación similar se encontró en *M. truncatula*, otra leguminosa cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado, cuenta con tres loci para *MIR398*. miR398a nuevamente se encontró ligado a miR2119 (miRBase versión 18.0) y se encuentra anotado en el cromosoma 5, mientras que otros dos loci más de *MIR398* se encontraron en los cromosomas 5 y 7 codificados por *MIR398b* y *MIR398c*, respectivamente. miR398b y miR398c son de 21 nt con la misma secuencia del miRNA maduro y difieren de miR398a en dos bases (Fig. 9). En comparación, las secuencias de miR398a, miR398b y miR398c en *A. thaliana*, mostraron un grado similar de conservación (Fig. 9), sólo que no parecen tener ninguna estructura potencial tipo tallo-asa o secuencia precursora cercana, excepto por *MIR398b* y *MIR398c*, los cuales están separados entre sí por 3.5 Kb en el cromosoma 5. Entonces, basados en la secuencia genómica de *P. vulgaris* (versión 1.0, <http://www.phytozome.net/commonbean>) y en los datos provenientes de *G. max* y *M. truncatula*, se concluyó que frijol posee dos loci para *MIR398*: uno donde *MIR398* está ligado con *MIR2119* y otro, donde *MIR398* permanece independiente, designados como pvu-*MIR398a* y pvu-*MIR398b*, respectivamente. En general, en leguminosas existen dos tipos de loci para *MIR398*, uno donde una unidad transcripcional genera un solo precursor y es similar a la de otras especies fuera de la familia de leguminosas, por ejemplo *Arabidopsis*. El otro, es un arreglo que genera dos precursores que codifican para *MIR398*, seguido de *MIR2119*; hasta el momento, este tipo de arreglo se ha encontrado exclusivamente en leguminosas.

```

*****.*****.
Pvu-miR398a  UGUGUUCUCAGGUCACCCCU
Pvu-miR398b  UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG

Gma-miR398a  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU
Gma-miR398b  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU
Gma-miR398c  UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG
Gma-miR398d  UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG

Mtr-miR398a  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU
Mtr-miR398c  UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG
Mtr-miR398b  UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG

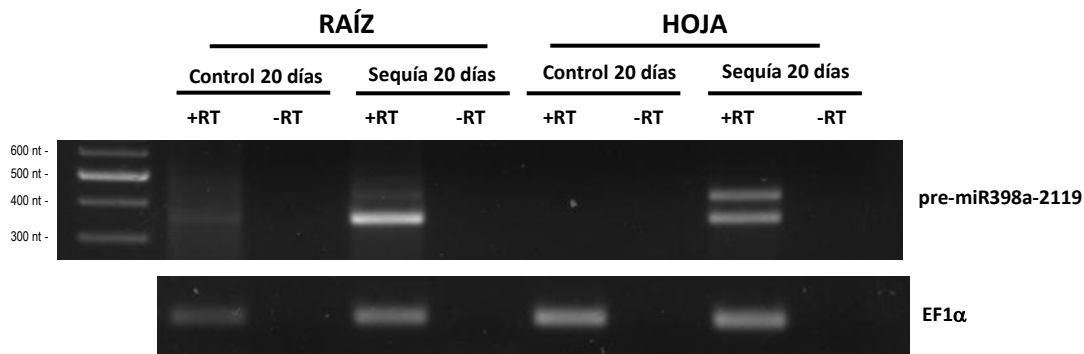
Ath-miR398a  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU
Ath-miR398b  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU
Ath-miR398c  UGUGUUCUCAGGUCACCCCUU

```

**Figura 9. Conservación de la familia miR398.** Referencia a la especie: *P. vulgaris* (Pvu), *G. max* (Gma), *M. truncatula* (Mtr) y *A. thaliana* (Ath).

## VIII.II Clonación del precursor pre-miR398a-2119 y análisis de su expresión.

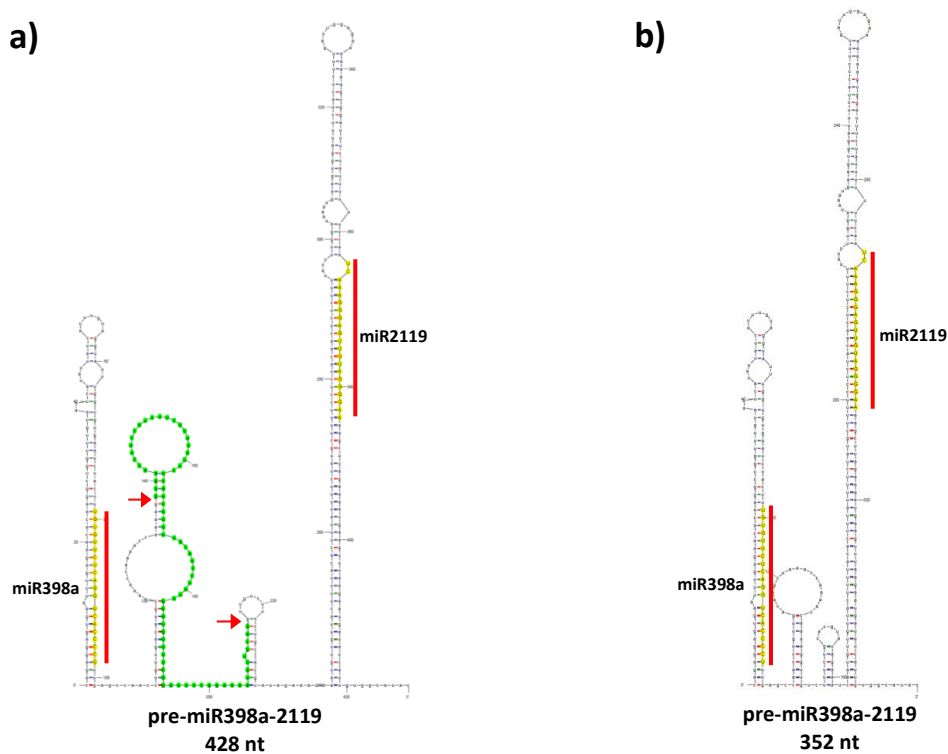
Con el objetivo de amplificar la secuencia precursora de miR2119 de *P. vulgaris*, incluyendo a miR398a, localizados en el cromosoma 2, se diseñaron oligonucleótidos que abarcaran a ambos precursores. Se procedió a realizar reacciones de RT-PCR usando como templado cDNA de las muestras de la cinética (Fig. 4) para los puntos de 20 días, control y sequía, tanto de raíz como de hoja. Consistente con la baja acumulación de miR2119 detectada en las muestras control en los experimentos tipo Northern (Fig. 4), la amplificación del precursor fue difícilmente detectada en las muestras control, sin embargo, se pudo observar un incremento en su acumulación en las muestras de RNA tanto de raíz como de hoja de plantas sometidas a limitación de agua. En estos experimentos, interesantemente, se detectaron dos transcritos de diferente tamaño en las muestras de hoja y, sólo uno correspondiente al fragmento más corto predominantemente en las muestras de raíces. Los dos transcritos amplificados mostrados en el carril +RT 20 días de sequía de hoja (Fig. 10) fueron purificados, clonados y secuenciados. Los resultados demostraron que el transcrito de 428 nts corresponde exactamente a la secuencia genómica de *P. vulgaris* que incluye a miR398 y a miR2119, confirmando que ambos miRNAs proceden del mismo transcrito. Relativo a la secuencia genómica de frijol, el fragmento más corto del cDNA amplificado también contiene a miR398a y miR2119, sólo que carece de 76 nucleótidos presentes en la región espaciadora entre los precursores miR398a y miR2119 (Fig. 11b). La secuencia que se elimina cuenta con las características de secuencia necesarias para ser considerado como un intrón (Fig. S4), incluyendo los sitios consenso conservados en plantas requeridos para el procesamiento del mRNA [90]. Además, no pudimos encontrar otro locus en el genoma de *P. vulgaris* (Phytozome, versión 1.0) que explicara la obtención de este fragmento como otro transcrito más corto.



**Figura 10. Amplificación del transcrito pre-miR398a-2119 en raíz y hoja de *P. vulgaris*.** Gel de agarosa 2% teñido con Bromuro de Etidio con las muestras de PCR de la amplificación del precursor utilizando como templado cDNA de frijol (+RT) y control Negativo (-RT). Se utilizó como control de carga, muestras de RT-PCR semicuantitativo para el transcrito del gen EF1 $\alpha$ /Tu (Factor de elongación 1 alfa con dominio Tu) de *P. vulgaris* mostrado en la parte inferior.

En nuestro análisis de la secuencia obtenida utilizando el programa de predicción de estructura secundaria Mfold (sitio web: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>), se confirmó que la presencia o ausencia del intrón no debería de afectar la estructura secundaria de los precursores de miR398 y miR2119 (Fig. 11a y 11b). Basados en las secuencias de EST's previamente descritas, el intrón predicho para frijol no se encuentra presente en los precursores de *G. max* (gi:27808890) y *M. truncatula* (gi:7261602). Estos datos junto con las estructuras de los precursores encontradas en otras especies demuestran que estos dos miRNAs maduros proceden del mismo transcrito en *P. vulgaris*, así como en otras leguminosas.

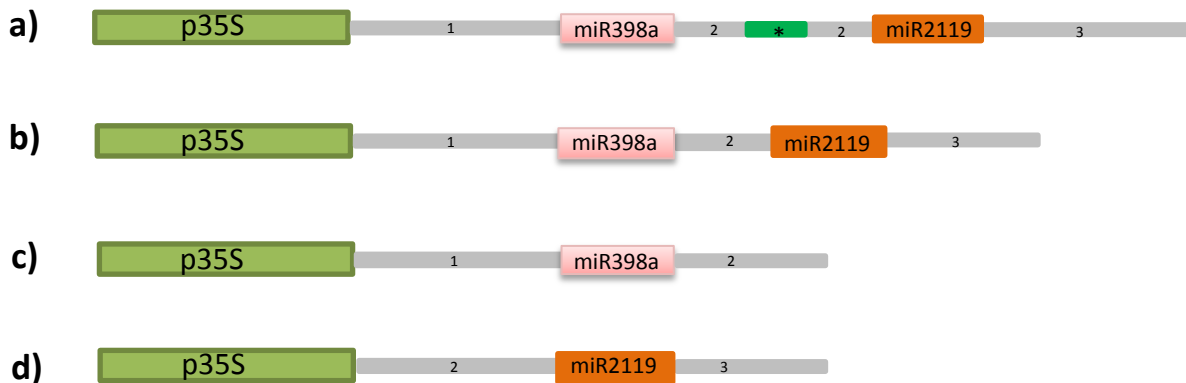
Con respecto a la Fig. 10, podemos observar que en hoja se acumulan de igual manera los dos precursores pre-miR398a-2119 descritos, mientras que en raíz se expresa preferencialmente el precursor "procesado" en la condición de sequía. Por lo tanto, los precursores pre-miR398a-2119 tienen acumulación diferencial entre dos órganos, raíz y hoja, lo que sugiere que estos transcritos se procesan diferencialmente lo que representa un nivel de regulación adicional, previo a la acumulación de los miRNAs maduros.



**Figura 11. Estructura del pre-miR398a-2119 en *Phaseolus vulgaris* clonado.** Estructura secundaria del precursor **a)** pre-miR398a-2119 y **b)** pre-miR398a-2119 (precursor procesado). En **b)** las flechas perpendiculares a la estructura secundaria denotan los sitios de reconocimiento para escindir el intrón predicho (representado en color verde).

### VIII.III Expresión heteróloga del precursor Pvu-pre-miR398a-2119 en *Nicotiana benthamiana*.

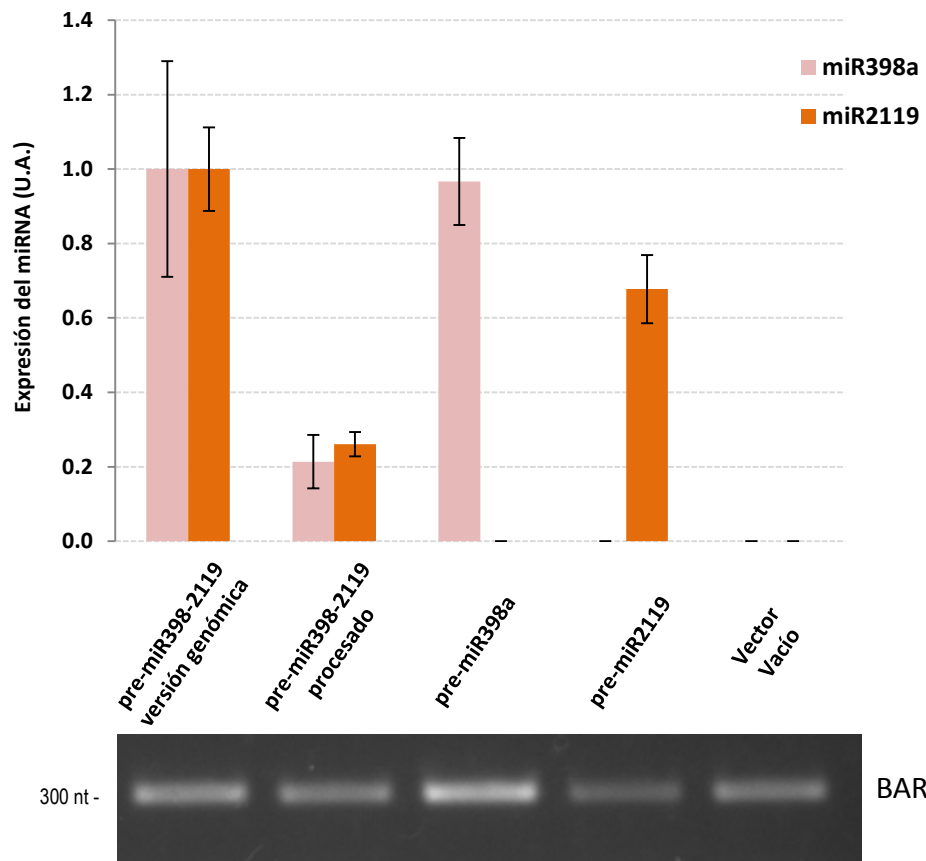
Para explorar el procesamiento del precursor pre-miR398a-2119, se llevó a cabo la construcción de vectores de expresión en el plásmido binario pBA-DC bajo la regulación del promotor CaMV 35S. Para ello, se obtuvieron el precursor correspondiente a la secuencia genómica de pre-miR398a-2119 clonado en pBA-DC, la versión de pre-miR398a-2119 “precursor procesado” de 352 nts y, de manera independiente, los segmentos correspondientes sólo a los precursores de pre-miR398a y pre-miR2119 (Fig. 12). Cada uno de los vectores movilizados a *Agrobacterium tumefaciens* se utilizaron para infiltrar hojas de *Nicotiana benthamiana*. Después de 48 hr de la infiltración, las hojas fueron recolectadas para extraer RNA total y se determinó la expresión de los transcritos maduros de miR398a y de miR2119, mediante PCR cuantitativo.



**Figura 12. Construcción de vectores de expresión.** Se muestran los fragmentos que quedaron bajo la regulación del promotor CaMV 35S (p35S) en el vector binario para los precursores: **a)** pre-miR398a-2119 versión secuencia genómica, **b)** pre-miR398a-2119 “precursor procesado”, **c)** pre-miR398a y **d)** pre-miR2119. En **a)** (\*) hace referencia a la secuencia intrónica predicha de 76 nts. Los números 1, 2 y 3 denotan dentro del precursor las secuencias espaciadoras entre los dos miRNAs maduros.

Como control negativo se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con el vector vacío, en las cuales no se detectó expresión de miR398a y miR2119. Además, se utilizó el gen de resistencia BASTA presente en el vector pBA-DC como gen de referencia para la infiltración de *Agrobacterium*. Los resultados indican el procesamiento de ambos miRNAs procedentes de la construcción de los vectores con el precursor pre-miR398a-2119 versión secuencia genómica y el precursor pre-miR398a-2119 procesado (Fig. 13). La expresión de miR398a y miR2119 en la construcción que contiene a la secuencia genómica mostró niveles similares para ambos miRNAs. Sin embargo, es interesante notar que esta construcción que incluye al intrón predicho, genera una mayor acumulación de miR398a y miR2119, comparado con la construcción que no lo contiene. Entonces,

es posible que la presencia del intrón ayude al procesamiento del transcrito y favorezca la producción de miRNAs maduros. En lo que respecta a las construcciones individuales de pre-miR398a y pre-miR2119, ambas mostraron eficiencias similares en procesamiento del miRNA maduro de manera independiente para miR398a y miR2119, respectivamente (Fig. 13). Estos experimentos indican que la presencia de dos precursores en un mismo transcrito no afecta el procesamiento de miRNAs individuales, sugiriendo que esta organización génica permite coordinar la actividad de los miRNAs.

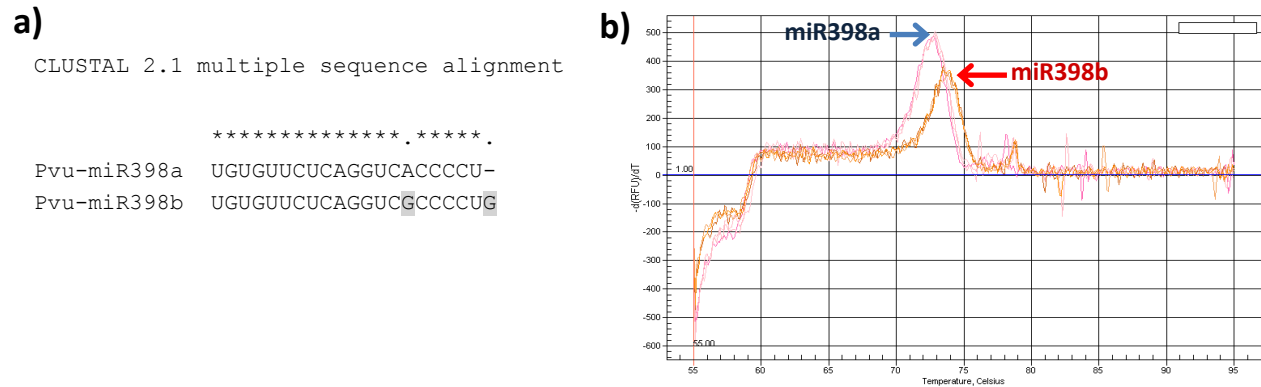


**Figura 13. Procesamiento de miR398a y miR2119 en sistema heterólogo.** La gráfica muestra la expresión de miR398a y miR2119 (qPCR) en las construcciones de pre-miR398a-2119, en sus versiones secuencia genómica y pre-miR398a-2119 procesado, pre-miR398a, pre-miR2119 y vector vacío. Además, en el eje de las Y, la expresión de los miRNAs se indica en unidades arbitrarias (U.A.). En la parte de abajo, se muestra el gel de agarosa 1.5% con los productos de RT-PCR del gen BASTA (BAR), que sirve como referencia a la infiltración de *A. tumefaciens* en las hojas de *N. benthamiana*.



#### VIII.IV Detección de expresión de miRNAs mediante qPCR

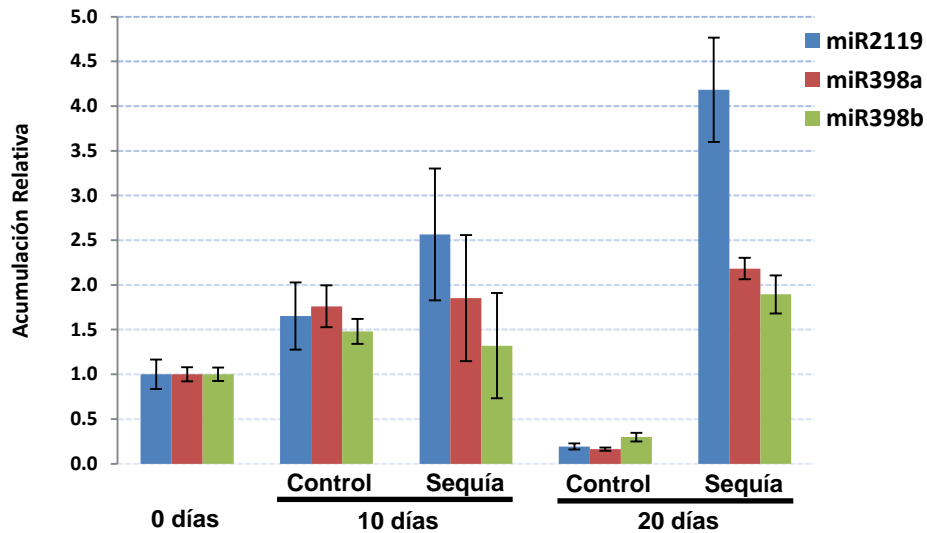
Para poder determinar adecuadamente la acumulación de miR398a y miR2119 fue necesario tener en cuenta que en *P. vulgaris* existen dos copias de miR398 (a y b), y que miR398a se encuentra en el mismo transcrito que miR2119 y difiere de miR398b en sólo dos posiciones (Fig. 14a). Dado que el análisis tipo Northern no es lo suficientemente sensible para distinguir entre las dos isoformas de miR398 en *P.vulgaris*, se utilizó la técnica de qPCR para detectar los niveles de expresión de las dos copias de miR398. Estos experimentos fueron realizados con la asesoría de la Dra. Cecilia Contreras-Cubas. Inicialmente se verificaron los productos amplificados a través de una curva de renaturalización, donde se detectaron dos picos correspondientes a miR398a y miR398b (Fig. 14b). Esto se logró detectar gracias a que se fue aumentando 0.1 grados la temperatura donde el cambio de fluorescencia es medido.



**Figura 14. Detección de miR398a y miR398b en *P. vulgaris* por PCR tiempo real. a)** Alineamiento ClustalX de pvu-miR398a y pvu-miR398b. **b)** Curva de renaturalización obtenida en el qPCR de las dos copias de miR398.

Una vez que fue posible distinguir entre las dos copias de miR398, determinamos los niveles de expresión de miR398a, miR398b y miR2119. Para ésto, se utilizaron las mismas muestras de la cinética (Fig. 4), eligiendo únicamente las muestras de raíz en las condiciones control y sequía a los días 0, 10 y 20. Como gen de referencia se utilizó la amplificación de miR2118, el cual se ha establecido como un microRNA de referencia bajo estas condiciones (Contreras-Cubas, et. al, datos no publicados). Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo de la expresión de miR2119, miR398a y miR398b, en la condición de sequía 20 días con respecto al control de 20 días, obteniendo una mayor acumulación de miR2119 (Fig. 15). En este experimento, la expresión observada de miR2119 es consistente con la inducción detectada en el análisis tipo Northern de la Fig. 4. Con este experimento se puede concluir que a pesar de que miR398a y miR2119 se producen a partir del mismo transcrito, presentan una acumulación diferencial. Por otro lado, la

expresión de miR398a y b es similar en las condiciones analizadas, a pesar de provenir de dos loci independientes. La expresión de miR2118 no cambió en estas condiciones y se utilizó para normalizar adecuadamente la expresión de miR398a/b y miR2119.



**Figura 15. Patrones de acumulación de miR2119, miR398a y miR398b en raíz.** Los niveles de acumulación de miR2119, miR398a y miR398b fueron normalizados en base a la acumulación de miR2118 (miRNA que mantiene su acumulación constante en diferentes tejidos y condiciones. Contreras-Cubas, et al, datos no publicados) y relativos al punto inicial de la muestra control 0 días (con valor de 1).

### VIII.V Validación de mRNA blancos

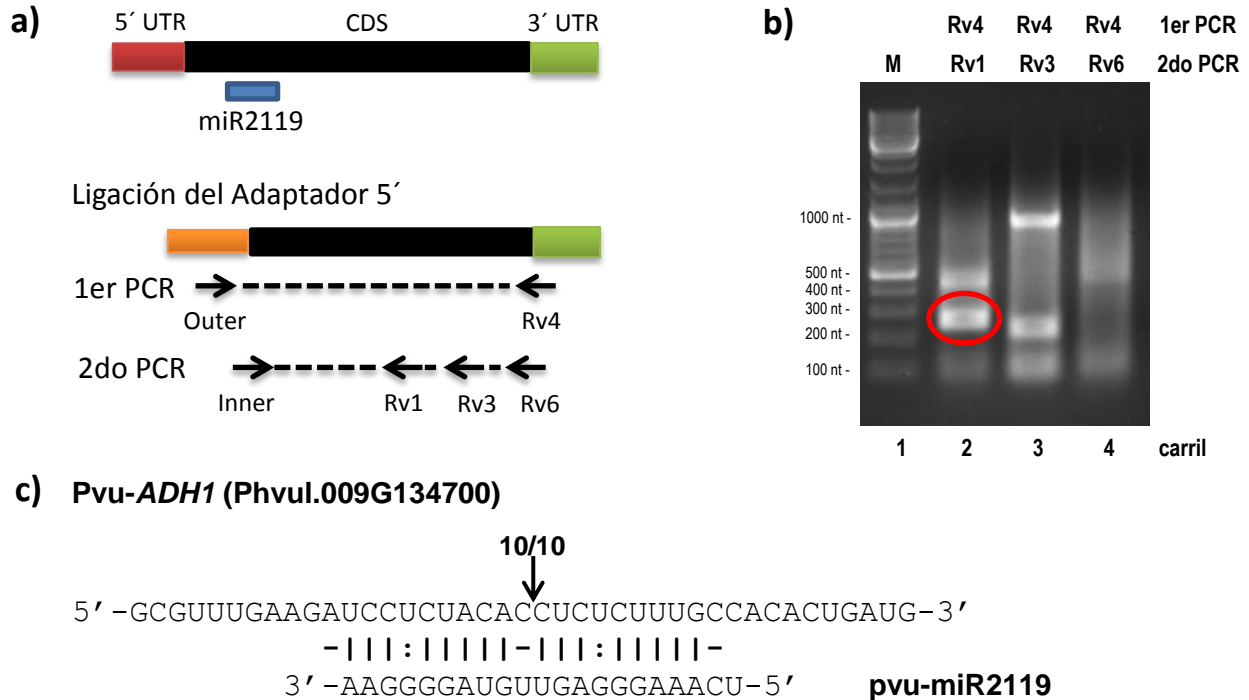
Previamente, mediante programas de predicción de mRNA blancos como miRanda [86], WMD3 [87] y, posteriormente, en base a los datos del degradoma de *M. truncatula* [91], se encontró que el mejor candidato a ser regulado por miR2119 es el transcrito del gen para alcohol deshidrogenasa 1 (*ADH1*). Para demostrar que ésto era cierto, se llevaron a cabo experimentos de 5'RACE modificado. Esta técnica se emplea para conocer el sitio de corte de un miRNA en su mRNA blanco. Una de las características que presentan los mRNAs blancos que han sido cortados es que contienen un fosfato en su extremo 5'. Entonces, el ensayo de 5' RACE consiste en ligar un adaptador de RNA a los extremos 5' de una población de RNAs obtenidos de cierta condición. Se realiza una reacción de transcriptasa reversa para generar cDNA conteniendo el adaptador en su extremo 5'. Los oligonucleótidos 5'RACE "Outer" y 5'RACE "Inner" comparten identidad de secuencia con el adaptador y son utilizados por separado para dos rondas de PCR. Adicionalmente, se diseñan oligonucleótidos específicos complementarios para el mRNA blanco candidato, que son utilizados para amplificar un fragmento del transcrito cortado en dos reacciones de PCR anidadas. Se utilizan primero los oligonucleótidos más externos y después los más internos para darle especificidad al fragmento que se busca amplificar. El fragmento amplificado del tamaño esperado se purificó, se clonó en un vector y se verificó por secuenciación. El resultado esperado es que el sitio de corte esté presente después de la secuencia del adaptador.

En nuestro caso, se realizaron dos reacciones de PCR anidadas con una diferente combinación de oligonucleótidos que se diseñaron para la amplificación del posible transcrito cortado de *ADH1*. El RNA utilizado como sustrato para preparar el 5'RACE fue sequía 20 días de hoja, el mismo usado en la Fig. 4. En la primera reacción de PCR que se realizó se utilizaron los oligonucleótidos 5'RACE "Outer" y ADH1-Rv4, el producto amplificado de esta región sirvió como templado para hacer los segundos PCRs anidados. Las diferentes combinaciones de oligonucleótidos para los segundos PCRs fueron: 5'RACE "Inner":ADH1-Rv1, 5'RACE "Inner":ADH1-Rv3 y 5'RACE "Inner": ADH1-Rv6 (Fig. 16a y 16b).

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa con las muestras de 5'RACE, de donde se obtuvieron varios fragmentos como se muestra en la Fig. 16b, la banda amplificada de ~200 pb en el carril 2, señalada en un círculo rojo corresponde al tamaño predicho para el producto de 5'RACE. Este fragmento, para el cual se utilizaron el par de oligonucleótidos "Outer":Rv4 para el 1er PCR y los oligonucleótidos "Inner":Rv1 en el 2do PCR, se purificó, se clonó y se secuenció. El resultado obtenido fue que las 10 clonas independientes que se analizaron coincidieron con el sitio de corte predicho para *ADH1* (Fig. 16c). Con este resultado se comprueba que el blanco del miR2119 es el mensajero de *ADH1* en *P. vulgaris*.

Con respecto a miR398, en *A. thaliana* se conocen al menos cuatro mRNA blancos regulados por este miRNA. Entre los mRNAs blancos se incluyen dos superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD),

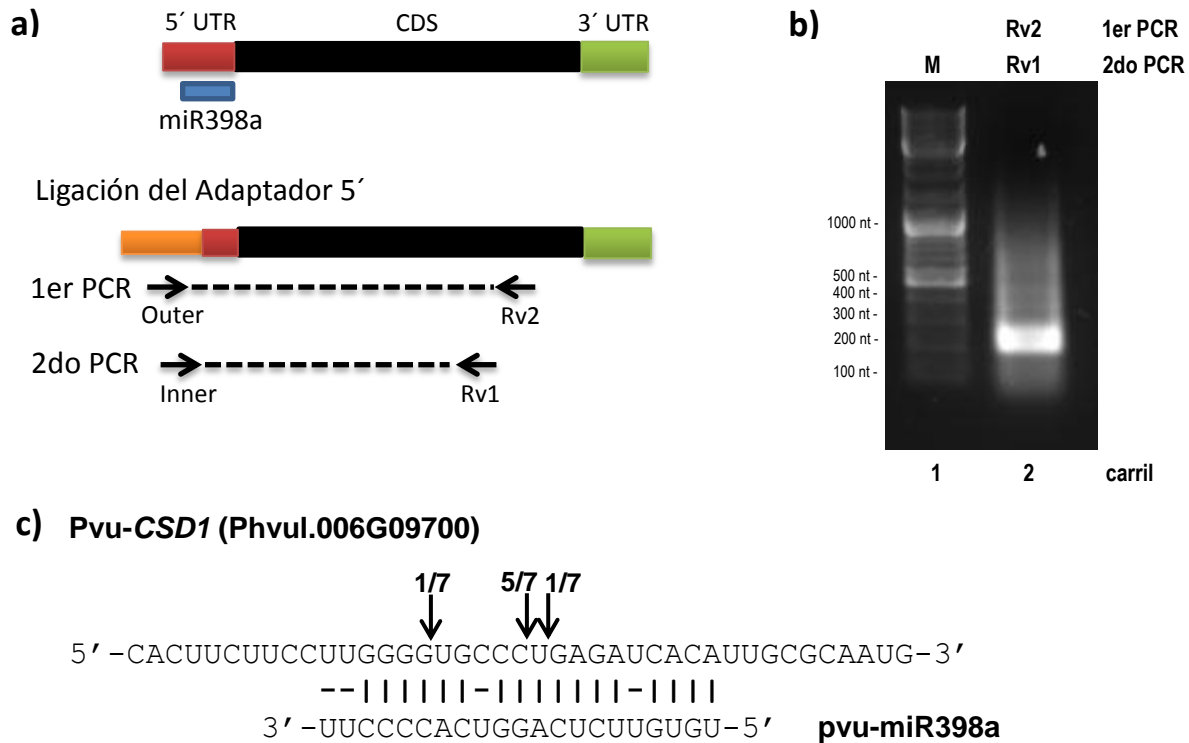
*CSD1* citosólica y *CSD2* localizada en el cloroplasto, la proteína *COX5b-1*, que es una subunidad de la citocromo C oxidasa mitocondrial y, por último a *CCS1*, una chaperona que entrega el cobre como cofactor a las superóxido dismutasas (*CSD1*, *CSD2* y *CSD3*) [60], [61], [92].



**Figura 16. 5'RACE de *ADH1*.** **a)** Diseño del ensayo 5'RACE para el transcrito *ADH1* y sitio de unión de miR2119. Ligación del Adaptador (rectángulo naranja) en el extremo 5' del transcrito *ADH1* procesado y localización de los oligonucleótidos utilizados para los dos PCR anidados. **b)** Gel de agarosa 1.5% con las muestras de los PCR anidados. Se realizó el 1er PCR utilizando los oligonucleótidos "Outer" y Rv4, el producto amplificado sirvió como templado para los siguientes PCR. Se utilizaron una combinación de oligonucleótidos para realizar los 2do PCR: "Inner"-Rv1 (carril 2), "Inner"-Rv3 (carril 3) y "Inner"-Rv6 (carril 4). "M" indica el marcador de peso molecular (carril 1). **c)** Validación del blanco para miR2119 en frijol. Los signos utilizados como "|" indican complementariedad en bases Watson y Crick, ":" apareamiento tipo Wooble y "-" desapareamiento (*mismatch*) entre las bases del blanco con el miRNA. La flecha indica el extremo 5' de los productos cortados y el número de clones independientes que mapearon con la posición del sitio de corte.

En este trabajo, también se realizó el 5'RACE para el transcrito de superóxido dismutasa 1 (*CSD1*) de frijol. Cabe destacar que el sitio de unión del miR398a en *CSD1* cae en la región 5'UTR (en inglés *Un-Translated Region*) (Fig. 17a). Se diseñaron oligonucleótidos complementarios a la región codificante de *CSD1* para realizar las reacciones de PCR anidados. Se amplificó una banda de ~200 pb, la cual se purificó, se clonó y se secuenció (Fig. 17b). El resultado obtenido del análisis de secuencia fue que 5 clones de 7 en total presentaron el sitio de corte predicho para *CSD1* (Fig.

17c). Como se ha descrito para otras plantas, este resultado comprueba que en frijol el mensajero de *CSD1* es blanco de miR398.



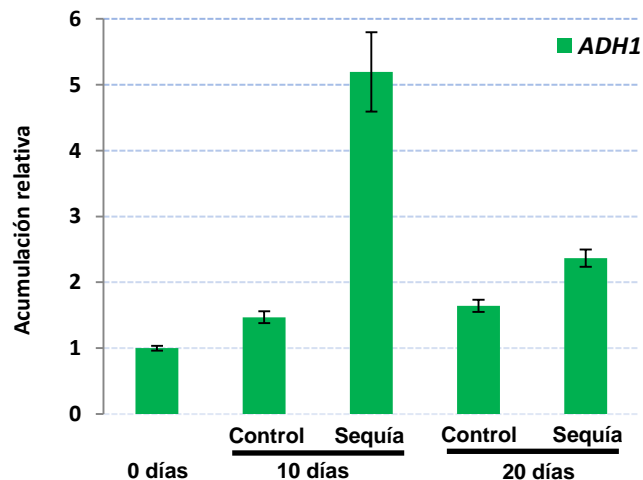
**Figura 17. 5'RACE de *CSD1*.** **a)** Diseño del ensayo 5'RACE para el transcrito *CSD1* y sitio de unión de miR398a. Ligación del Adaptador (rectángulo naranja) en el extremo 5' del transcrito *CSD1* procesado y localización de los oligonucleótidos utilizados para los dos PCRs anidados. **b)** Gel de agarosa 1.5% con las muestras de los PCRs anidados. Se realizó el 1er PCR utilizando los oligonucleótidos "Outer" y SOD-Rv2, el producto amplificado sirvió como templado para los siguientes PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos "Inner": SOD-Rv1 (carril 2). "M" indica el marcador de peso molecular (carril 1). **c)** Validación del blanco para miR398 en frijol. Los signos utilizados como " | " indican complementariedad de bases Watson y Crick, " : " apareamiento tipo Wooble y " - " desapareamiento (*mismatch*) entre las bases del blanco con el miRNA. La flecha indica el extremo 5' de los productos cortados y el número de clones independientes que mapearon con la posición del sitio de corte.

Además se realizó el 5'RACE para *COX5b-1*, otro posible mRNA blanco de miR398 mencionado anteriormente, sin haber obtenido productos de amplificación. Es importante tomar en cuenta algunos detalles como utilizar la condición adecuada para amplificar el producto predicho, el diseño y el uso de oligonucleótidos dado que en esta técnica se están tratando de amplificar fragmentos de degradación de RNA. Así que queda por revisar el experimento debido a las complicaciones que conlleva realizar el 5'RACE.

### VIII.VI Niveles de acumulación de los mRNAs de *ADH1* y *CSD1* en *P. vulgaris*

Para detectar la acumulación del mRNA de *ADH1* se utilizó la técnica de qPCR para evaluar la abundancia del transcrito en las muestras de la cinética mostrados en la Fig. 4, donde miR2119 aumenta su acumulación en condiciones de sequía. El punto inicial del tratamiento es control 0 días, después se ve un incremento significativo del transcrito de *ADH1* en sequía 10 días con respecto al control. Posteriormente, a los 20 días el mRNA de *ADH1* en sequía continúa en un nivel más elevado que el control, pero inferior al de sequía 10 días (Fig. 18). Ahora si comparamos los resultados de qPCR de miRNAs (Fig. 15), la expresión de miR2119 se induce significativamente en sequía 20 días, probablemente produce un efecto en los niveles de expresión de *ADH1* evitando un incremento drástico del transcrito. Esto sugiere la participación de este miRNA ajustando y modulando la expresión de su mRNA blanco en respuesta a déficit hídrico.

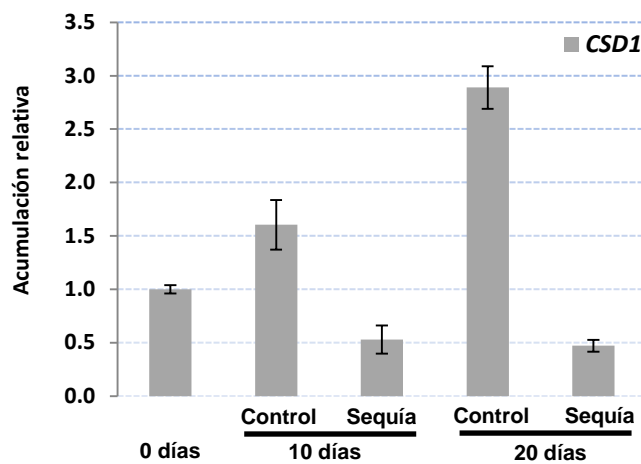
Sin embargo, hacia el final del trabajo nos percatamos de que el ensayo de qPCR detecta dos diferentes transcritos de *ADH*. Esto nos impide determinar cual es la regulación de miR2119 sobre uno de estos dos transcritos, por lo que queda como perspectiva refinar este experimento, mediante el diseño de oligonucleótidos que nos permita distinguir el transcrito de *ADH1* que es blanco de miR2119.



**Figura 18. Niveles de acumulación de *ADH1* en *P. vulgaris*.** Resultados del análisis de PCR de tiempo real. El eje de las X muestra las condiciones de control y sequía, así como el tiempo del tratamiento donde fue evaluado el transcrito de *ADH1* correspondiente a las muestras 0, 10 y 20 días de la cinética (Fig. 4). La cuantificación de los niveles de expresión del transcrito de *ADH1* fueron normalizados con el gen de referencia *Pvu-EF1 $\alpha$* . La gráfica muestra la acumulación relativa respecto al valor de la muestra 0 días, marcada como 1.

De la misma manera se evaluaron los niveles de acumulación del transcrito de *CSD1*, mRNA blanco de miR398a y b. Se utilizaron las mismas condiciones donde se detectó el transcrito de *ADH1*

y, nuevamente, el punto inicial fue control 0 días. La expresión de *CSD1* se incrementó conforme transcurrió el tratamiento control teniendo una mayor acumulación a los 20 días. Por otro lado, los niveles de acumulación de *CSD1* disminuyen significativamente en las condiciones de sequía 10 y 20 días (Fig. 19). Si contrastamos los niveles de acumulación de miR398a y miR398b de la Figura 15, quizás los aumentos de expresión no son significativos en sequía 10 días en comparación al control, sólo en sequía 20 días se tiene un incremento de acumulación de miR398a y miR398b, el cual correlaciona con la disminución de *CSD1* en esta condición. Además, cabe resaltar que a pesar de tener dos nucleótidos de diferencia miR398a y miR398b reconocen al mismo blanco, por lo que estos miRNAs podrían regular el transcrito de *CSD1* de manera cooperativa.



**Figura 19. Niveles de expresión de *CSD1* en *P. vulgaris*.** Resultados del análisis de PCR de tiempo real. El eje de las X se muestra las condiciones de control y sequía, así como el tiempo del tratamiento donde fue evaluado el transcrito de *CSD1* correspondiente a las muestras 0, 10 y 20 días de la cinética (Fig. 4). La cuantificación de los niveles de expresión del transcrito de *CSD1* fue normalizado con el gen de referencia *Pvu-EF1 $\alpha$* . La gráfica muestra la acumulación relativa respecto al valor de la muestra 0 días, marcada como 1.

## IX. DISCUSIÓN

### IX.I Precusores policistrónicos en plantas

En plantas y animales los genes *MIR* difieren en su organización y localización genómica. Los miRNAs en plantas son principalmente generados por unidades independientes que se transcriben y se localizan en zonas intergénicas [93]. En cambio, los miRNAs en animales frecuentemente se generan dentro de intrones de genes que codifican para proteínas [94]. En *Drosophila*, nemátodos, pez cebra y mamíferos además se ha encontrado que alrededor del 40-50% de los genes de miRNAs predichos se encuentran conservados y se localizan en “clusters” [95], [96], [97]. En animales usualmente estos “clusters” llegan a codificar de dos hasta ocho miRNAs y pueden ser simultáneamente transcritos como un transcrito policistrónico [97].

Algunos reportes han mostrado precusores policistrónicos de miRNAs en plantas que contienen múltiples copias de un mismo miRNA conservado (miR156, miR166, miR169, miR395 o miR399), en contraste con animales, donde miRNAs con secuencias no relacionadas son frecuentemente incluidos en el mismo precursor [97], [98].

Merchan y colaboradores [99] encontraron en arroz un precursor policistrónico de miR395 que mostró un alto número de miRNAs homólogos en tándem, cada uno codificado en un precursor independiente y proponen que probablemente fueron generados a partir de un evento sucesivo de duplicación de un precursor ancestral. En este mismo estudio, al comparar tres especies, *Arabidopsis*, arroz y *Populus*, cuyos genomas están completamente secuenciados, también se encontraron grupos de miRNAs correspondientes a miRNAs no conservados a una distancia de separación entre cada precursor de 81-670 pb (con una media de 114 pb). En la mayoría de los casos, los miRNAs no homólogos del transcrito policistrónico codifican dos miRNAs, con excepción del precursor en arroz *Osa-MIR1876-1862d-1884b*, que codifica tres miRNAs no conservados. Además, el dato más interesante es que para los diferentes miRNAs del mismo “cluster” todos los mRNA blancos predichos correspondientes codifican para proteínas de la misma familia [99].

Se ha propuesto que la transcripción de varios miRNAs idénticos o similares presentes en un mismo transcrito resulta en una mayor acumulación del miRNA y consecuentemente un mayor efecto sobre la expresión del mRNA blanco, comparado con transcritos que codifican un sólo precursor [100]. En cambio, diferentes miRNAs que se unen a un sólo mRNA blanco en animales regulan cooperativamente su expresión [93], [101], es decir, la co-expresión de diferentes miRNAs puede servir para coordinar la eficiencia en el proceso regulatorio. En el caso de las plantas, los precusores de miRNA policistrónicos pueden además codificar miRNAs no homólogos y esta organización genómica puede servir para co-regular diferentes mRNAs blancos a nivel postranscripcional [99].



Los precursores policistrónicos que se han descrito en plantas generalmente pueden ser de dos tipos: uno que genere múltiples copias del mismo (como miR395) y otro, que genera varias copias de miRNAs no conservados [99]. Sin embargo, cabe resaltar que el precursor de frijol pre-miR398a-2119 contiene uno que es un miRNA conservado (miR398a) y el otro que es un miRNA no conservado (miR2119).

En los genomas de leguminosas explorados, incluyendo a *P. vulgaris*, *G. max* y *M. truncatula*, encontramos que existen dos versiones para el gen *MIR398*: uno acompañado por *MIR2119*, y otro que se encuentra como unidad transcripcional independiente y es equivalente a los otros genes de *MIR398* presentes en especies no relacionadas a leguminosas, como *A. thaliana*.

Se ha sugerido que los microRNAs jóvenes o no conservados, debido a su recién surgimiento en la evolución, no son funcionales, principalmente porque ha sido difícil demostrar su actividad regulatoria sobre los mRNAs blancos predichos. Por lo que se cree que desde sus orígenes no les ha dado tiempo suficiente para seleccionar a un mRNA blanco regulatorio o que se encuentran en camino a la extinción [77], [102]. Sin embargo, mediante 5'RACE modificado nosotros hemos demostrado que miR2119 es un miRNA no conservado, pero funcional que regula al mRNA que codifica para la enzima ADH1. En *A. thaliana* se implementó una estrategia llamada degradoma o PARE (por sus siglas en inglés, *Parallel Analysis of RNA Ends*) para identificar mRNAs cortados a escala genómica, mediante secuenciación masiva de fragmentos de mRNAs [103], [104]. Recientemente se han reportado degradomas para micorrizas de raíz de *M. truncatula* y plántulas de *G. max*, indicando que *ADH1* es regulada por miR2119 [91], [105]. Entonces, existen reportes de la actividad regulatoria de miR2119 sobre el transcrito de *ADH1* en al menos dos leguminosas modelos y en este trabajo ha sido confirmada experimentalmente para *P. vulgaris*.

## **IX.II Regulación de *CSD1* y su posible relación con la regulación de *ADH1***

En organélos como mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas, se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de distintos procesos celulares [106]. Además, los niveles elevados de ROS han sido asociados a diferentes estreses, como radiación por UV, intensidad de luz, temperaturas extremas, metales pesados, estrés salino, sequía y estrés mecánico [106]. La generación de ROS como el superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), ocasionan deterioro en la membrana, peroxidación de lípidos y modificaciones en el DNA que conllevan a daños irreparables en funciones metabólicas y estructurales, provocando la muerte celular [107]. Para controlar los niveles de ROS y mantener la protección celular bajo condiciones estresantes, las plantas utilizan un grupo de enzimas desintoxicantes como la superoxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX). Además producen un amplio número de antioxidantes, como el ácido ascórbico (AA), glutatión (GH) y los compuestos fenólicos [108]. El anión

superóxido es convertido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, por la enzima superóxido dismutasa. El peróxido es subsecuentemente convertido en  $O_2$  y  $H_2O$  por la catalasa [107]. En *A. thaliana* existen tres genes *CSD1*, *CSD2* y *CSD3*, que codifican para Cu-Zn SODs [67]. Se ha predicho y confirmado que los mRNAs blancos para miR398 son *CSD1*, *CSD2* y *COX5b* en *A. thaliana* [60]. Bajo condiciones de estrés oxidativo, la acumulación de miR398 disminuye por lo que permite que los transcritos de *CSD1* y *CSD2* se incrementen reduciendo la acumulación de radicales libres superóxido, que son altamente tóxicos para la planta [67]. En este contexto, la participación de superóxido dismutasa es para limitar la acumulación de ROS que pudieran ser dañinos para la célula. Aunado a esto, los niveles de peróxido de hidrógeno son regulados por diferentes enzimas, las dos más importantes son la catalasa y la peroxidasa. La catalasa se encuentra localizada en los peroxisomas, que en comparación con las peroxidases, no requiere de un sustrato reductor para su actividad. En cambio, la ascorbato peroxidasa utiliza como sustrato ácido ascórbico y contrarresta los niveles de peróxido de hidrógeno en el citosol y en cloroplastos. Este proceso forma parte del ciclo conocido como el ciclo de Halliwell-Asada o de ascorbato-glutation [107], [109]. Los antioxidantes como el ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides, constituyen el mayor amortiguador del estado redox de la célula. En respuesta a altas y bajas temperaturas, ataque por patógenos y sequía, las plantas incrementan la actividad de las enzimas de la biosíntesis de glutatión, así como los niveles de glutatión. Los altos niveles de ascorbato y glutatión reducidos son esenciales para desintoxicar de ROS a la célula. Los estados reducidos de los antioxidantes se mantienen por la acción de la glutatión reductasa (GR), de la mono-deshidro-ascorbato reductasa (MDAR) y de la deshidro-ascorbato reductasa (DHAR), utilizando NADPH como poder reductor. El balance entre diferentes antioxidantes debe controlarse estrechamente. La importancia de este balance es evidente cuando las células incrementan la biosíntesis de glutatión en cloroplastos mostrando un daño por estrés oxidativo, posiblemente debido a los cambios en el balance redox. Por lo tanto, el equilibrio entre la producción de ROS y las enzimas que desintoxican de estas moléculas, se puede ver afectado causando un daño oxidativo severo al DNA, a proteínas y lípidos.

En los últimos años, los estudios de ROS como moléculas señalizadoras (entre ellas el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), superóxido y peróxido de hidrógeno) han mostrado que éstas son utilizadas para controlar un amplio espectro de procesos biológicos, desde la regulación del crecimiento y, desarrollo y de las respuestas a estímulos bióticos o abióticos [110]. La clave para usar ROS como moléculas señalizadoras, parece ser la capacidad de las células para contender y neutralizar estas moléculas utilizando una red de enzimas secuestradoras de ROS presentes en casi todos los compartimentos celulares. Esta red mantiene los niveles de ROS en un estado estable no tóxico para la célula, permitiendo así una acumulación transitoria de ROS en una localización subcelular particular que le permite actuar como señal ante un estímulo dado [106]. En plantas se ha encontrado la participación de enzimas especializadas en la producción ROS, como las enzimas

NADPH oxidasas codificadas por los genes *RboH*, que son las responsables de la generación del superóxido a partir de oxígeno [111]. El superóxido es una molécula cargada que no puede difundir fácilmente a través de la membrana, sin embargo, el superóxido puede ser convertido rápidamente en peróxido de hidrógeno, el cual se transfiere pasivamente a través de la membrana o a través de los canales de agua. Las propiedades moleculares de ROS ofrecen una ventaja al utilizarlas como señalizadoras, porque permiten la movilidad célula-célula pudiendo actuar a larga distancia como una señal de autopropagación en toda la planta. Entonces, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos especular que una manera de utilizar la vía de señalización mediada por ROS podría ser a través de la participación de miR398. Un incremento en la acumulación de miR398 ocasionaría la disminución de la expresión de *CSD1* provocando un aumento en la acumulación de superóxido, ésto permitiría mantener los niveles elevados de ROS para prolongar la señalización de alerta al estrés que ocasiona, en este caso la sequía, o alternativamente, modificando el estado de oxido-reducción de moléculas como AA, GH, o algunas otras que pudieran señalar el estado de estrés celular.

La proteína ADH1 participa en la producción de etanol a través de la vía de fermentación. Esto ha sido mejor estudiado cuando las células vegetales se ven sometidas a estrés por limitación de oxígeno (hipoxia o anoxia), inhibiendo la entrada de piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Una alternativa para la producción de ATP en estas condiciones es la vía anaeróbica, que produce la acumulación de lactato a través de la enzima lactato deshidrogenasa. Sin embargo, cuando el pH citoplasmático se vuelve más ácido, una forma de prevenir la acidosis citoplasmática es mediante la producción de etanol por la enzima ADH1, tomando como precursor acetaldehído y regenerando el NAD<sup>+</sup> para utilizarlo nuevamente en la glucólisis [2]. Sin embargo, el estudio de mutantes de *adh1* en *A. thaliana* ha demostrado que la fermentación alcohólica tiene un papel importante en condiciones aeróbicas, debido a que estas mutantes muestran un incremento en el piruvato comparado con las plantas silvestres, por lo cual la producción de etanol no es exclusiva de condiciones de limitación de oxígeno [112]. Una posible función de la regulación de ADH1 por miR2119, es que durante la sequía se restrinja el flujo del carbono hacia la fermentación aeróbica, inhibiendo o modulando la expresión de ADH1, así la cantidad del piruvato destinado a la producción de etanol sería canalizada hacia el TCA para la obtención de energía en una condición adversa como lo es la sequía.

En la respuesta a estrés, están involucradas por un lado la vía de señalización mediada por ROS y por otro la regulación de ADH1, ambos casos mediados por miRNAs. En este trabajo, sugerimos que la regulación coordinada de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y el metabolismo de la fermentación, son requeridos para la apropiada respuesta ante una condición como es la limitación de agua. Por el momento no sabemos si existe alguna relación entre estos procesos, aparte de la co-expresión de los miRNAs. Sin embargo, podría existir alguna relación

directa o consecuente del efecto de miR398 y miR2119 sobre sus mRNAs blancos. La acción represora de miR398 sobre *CSD1*, ayudaría a mantener los niveles elevados de ROS, lo que podría afectar la expresión de *ADH1*. Se ha visto en *A. thaliana* que en condiciones de limitación de oxígeno, la expresión de *ADH1* se induce por la acumulación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que actúa como mensajero secundario. La expresión de *ADH1* es regulada positivamente por un mecanismo que depende de la GTPasa Rop, pero también es modulada negativamente por RopGAP4, que limita la señal confiriéndole tolerancia a la planta ante dicha situación [113]. En plántulas de *A. thaliana* mutantes en *ropgap4-1* sometidas al tratamiento de limitación de oxígeno, resultó en un aumento drástico en la expresión de *ADH1* y mayor sensibilidad al tratamiento; si continúa el tratamiento por un tiempo más prolongado, las mutantes terminan muriendo, mientras que las silvestres sobreviven, indicando que la atenuación de la señal de Rop es necesaria para la tolerancia a la limitación de oxígeno [113]. No sabemos si en frijol la señal de ROP podría estar participando en la respuesta a estrés, aunque una manera análoga de modular la expresión de *ADH1* en presencia de ROS (al disminuir los niveles de *CSD1* por la actividad de miR398), sería a través de la participación de miR2119. Es decir, miR2119 podría ser importante para modular la expresión de *ADH1* y evitar así una dramática acumulación del transcrito en la condición de sequía. Sin embargo, nuestro ensayo de qPCR para el transcrito de *ADH1*, detectó dos transcritos diferentes para esta enzima, por lo que aún no podemos determinar con precisión cual es la contribución de miR2119 en este proceso.

Por otra parte, se ha visto involucrada la participación de miR398 como un regulador clave en la homeostasis de Cobre (Cu). Cuando el Cu es limitado, miR398 incrementa su expresión para disminuir la síntesis de *CSD1*, *CSD2* y *COX5b*, y dirigir la disponibilidad de Cu hacia otros procesos esenciales [114]. Estudios recientes, encontraron la participación de miR398a involucrado en la homeostasis de cobre en plantas de *Medicago truncatula* sometidas a déficit hídrico [115]. Cuando las plantas fueron sometidas a déficit hídrico, se indujo la acumulación de miR398a, que fue inversamente correlacionada con la acumulación de los transcritos de sus blancos *CSD1* y *COX5b*, cuyos niveles claramente disminuyeron. La represión de *CSD1* y *COX5b* por miR398 en estrés hídrico, se sugirió como una estrategia para proporcionar el cobre a proteínas que lo necesitan como cofactor, como las plastocianinas que son proteínas fundamentales para la fotosíntesis [115]. Esto es al menos una evidencia de que miR398 se induce en respuesta a déficit hídrico en una leguminosa como *M. truncatula*, por lo que no podemos descartar que este mismo escenario suceda en *P. vulgaris*. Sin embargo, un factor en común entre *CSD1* y *ADH1* es que ambas utilizan como cofactor zinc (Zn), por lo que la regulación de estas dos proteínas ante condiciones de sequía, podría involucrar el mantenimiento de los niveles basales de zinc. Se ha reportado que en levadura *ADH1* y *ADH3* sirven como proteínas de almacenamiento de zinc, entonces, cuando existe una deficiencia del micronutriente, *ADH1* y *ADH3* inhiben su expresión y dejan disponible el zinc para otros procesos

importantes [116]. Además, estudios realizados en plantas de *P. vulgaris* bajo deficiencia de zinc encontraron la reducción en la actividad de *CSD1*, misma que fue restablecida y recuperada al suministrar nuevamente zinc [117]. En plantas, el zinc es particularmente necesario dentro del ambiente de la membrana plasmática para mantener su integridad estructural y funcional, protegiendo así los daños ocasionados por ROS [118]. Finalmente, plantas de trigo crecidas en condiciones de deficiencia de Zn, son más sensibles a sequía en comparación con las plantas suministradas con Zn [119], por lo que no se puede descartar alguna asociación importante entre la regulación de los niveles de zinc y condiciones estresantes como la sequía. La regulación de los niveles de zinc podría entonces aunarse a otros procesos regulados por miR398 y miR2119, como los descritos anteriormente.

## X. CONCLUSIONES

- miR2119 es un microRNA funcional cuyos niveles se inducen ante déficit hídrico.
- miR2119 esta conservado en leguminosas.
- *ADH1* es el mRNA blanco de miR2119.
- En leguminosas, miR398a y miR2119 están codificados en un mismo precursor bicistrónico.
- El precursor bicistrónico regula a dos blancos diferentes, los transcritos para *ADH1* y *CSD1*.

## XI. PERSPECTIVAS

- Determinar por qPCR la expresión de las tres ADHs parálogas de frijol.
- Evaluar si el mensajero de *ADH1* es regulado por miR2119 en otras especies.
- Explorar la regulación de otros blancos de miR398a en condiciones de sequía: *COX5b*, *CCS1* y MtN19-like protein.
- Obtención de la secuencia promotora del gen *MIR398a-2119*.
- Medir la expresión de miR2119 en hipoxia y miR398a en estrés oxidativo y viceversa.
- Evaluar el fenotipo de la sobre-expresión de miR2119 o ADH1 en el sistema de raíces peludas de frijol.
- Evaluar el papel de ROS en la respuesta a sequía.
- Evaluar el papel de la fermentación en la respuesta a sequía.

## XII. REFERENCIAS

1. Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, and M. Seki, *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses*. *Curr Opin Plant Biol*, 2003. **6**(5): p. 410-7.
2. Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., *Responses to abiotic stresses*. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Grisseem, W., Buchnnan, B., and Jones, R. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. , 2000: p. 1158–1249.
3. Bray, E.A., *Plant responses to water deficit*. *Trends Plant Sci*, 1997. **2**(2): p. 48-54.
4. Hsiao, T.C., *Plant Responses to water stress*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1973. **24**: p. 519-570.
5. Smirnoff, N., *Tansley Review .52. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation*. *New Phytologist*, 1993. **125**(1): p. 27-58.
6. Mckersie, B.D., Leshem, Y.Y., *Stress and stress coping in cultivated plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1994.
7. Jayakumar, K., Jaleel, C.A., Vijayarengan, P. , *Changes in growth, biochemical constituents and antioxidant potentials in radish (*Raphanus sativus* L.) under cobalt stress*. *Turkish Journal of Biology*, 2007. **31**: p. 127–136.
8. Kramer, P.J., *Plant water relations*. Academic Press, New York., 1983.
9. Kusaka, M., A.G. Lalusin, and T. Fujimura, *The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] Leeke) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress*. *Plant Science*, 2005. **168**(1): p. 1-14.
10. Ekanayake, I.J., et al., *Inheritance of root characters and their relations to drought resistance in rice*. *Crop Science*, 1985. **25**(6): p. 927-933.
11. Chartzoulakis, K., et al., *Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars*. *Scientia Horticulturae*, 2002. **95**(1-2): p. 39-50.
12. Meenakshi, S.V., Paliwal, K., Ruckmani, A., *Effect of water stress on photosynthesis, protein content and nitrate reductase activity of *Albizia* seedlings*. *Journal of Plant Biology* 2005. **32**(13–17).
13. Djibril, S., et al., *Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses*. *African Journal of Biotechnology*, 2005. **4**(9): p. 968-972.
14. Reddy, T.Y., V.R. Reddy, and V. Anbumozhi, *Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review*. *Plant Growth Regulation*, 2003. **41**(1): p. 75-88.
15. Battaglia, M., et al., *The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins*. *Plant Physiol*, 2008. **148**(1): p. 6-24.
16. Sakuma, Y., et al., *DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(3): p. 998-1009.
17. Jacob, T., et al., *Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 12192-7.
18. Ramanjulu, S. and D. Bartels, *Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants*. *Plant Cell Environ*, 2002. **25**(2): p. 141-151.
19. Finkelstein, R.R., S.S. Gampala, and C.D. Rock, *Abscisic acid signaling in seeds and seedlings*. *Plant Cell*, 2002. **14** **Suppl**: p. S15-45.



20. Uno, Y., et al., *Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11632-7.
21. Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki, *A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress*. Plant Cell, 1994. **6**(2): p. 251-64.
22. Boyko, A., et al., *Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9514.
23. Gallie, D.R., *Posttranscriptional regulation of gene-expression in plants*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993. **44**: p. 77-105.
24. Sullivan, M.L. and P.J. Green, *Posttranscriptional regulation of nuclear-encoded genes in higher-plants - the roles of messenger-RNA stability and translation*. Plant Mol Biol, 1993. **23**(6): p. 1091-1104.
25. Covarrubias, A.A. and J.L. Reyes, *Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs*. Plant Cell Environ, 2010. **33**(4): p. 481-9.
26. Xiong, L., et al., *Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis*. Dev Cell, 2001. **1**(6): p. 771-81.
27. Hugouvieux, V., J.M. Kwak, and J.I. Schroeder, *An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis*. Cell, 2001. **106**(4): p. 477-87.
28. Papp, I., et al., *A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to Arabidopsis*. Plant Mol Biol, 2004. **55**(5): p. 679-86.
29. Kim, S., et al., *Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs*. Plant Cell Physiol, 2008. **49**(11): p. 1634-44.
30. Laubinger, S., et al., *Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8795-800.
31. Lu, C. and N. Fedoroff, *A mutation in the Arabidopsis HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin*. Plant Cell, 2000. **12**(12): p. 2351-2366.
32. Han, M.H., et al., *The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 1093-8.
33. Vazquez, F., et al., *The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing*. Curr Biol, 2004. **14**(4): p. 346-51.
34. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
35. Brodersen, P., et al., *Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. Science, 2008. **320**(5880): p. 1185-90.
36. Xie, Z., et al., *Expression of Arabidopsis MIRNA genes*. Plant Physiol, 2005. **138**(4): p. 2145-54.
37. Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel, *MicroRNAs and their regulatory roles in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 19-53.
38. Yang, L., et al., *SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis*. Plant J, 2006. **47**(6): p. 841-50.
39. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
40. Yu, B., et al., *Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis*. Science, 2005. **307**(5711): p. 932-5.

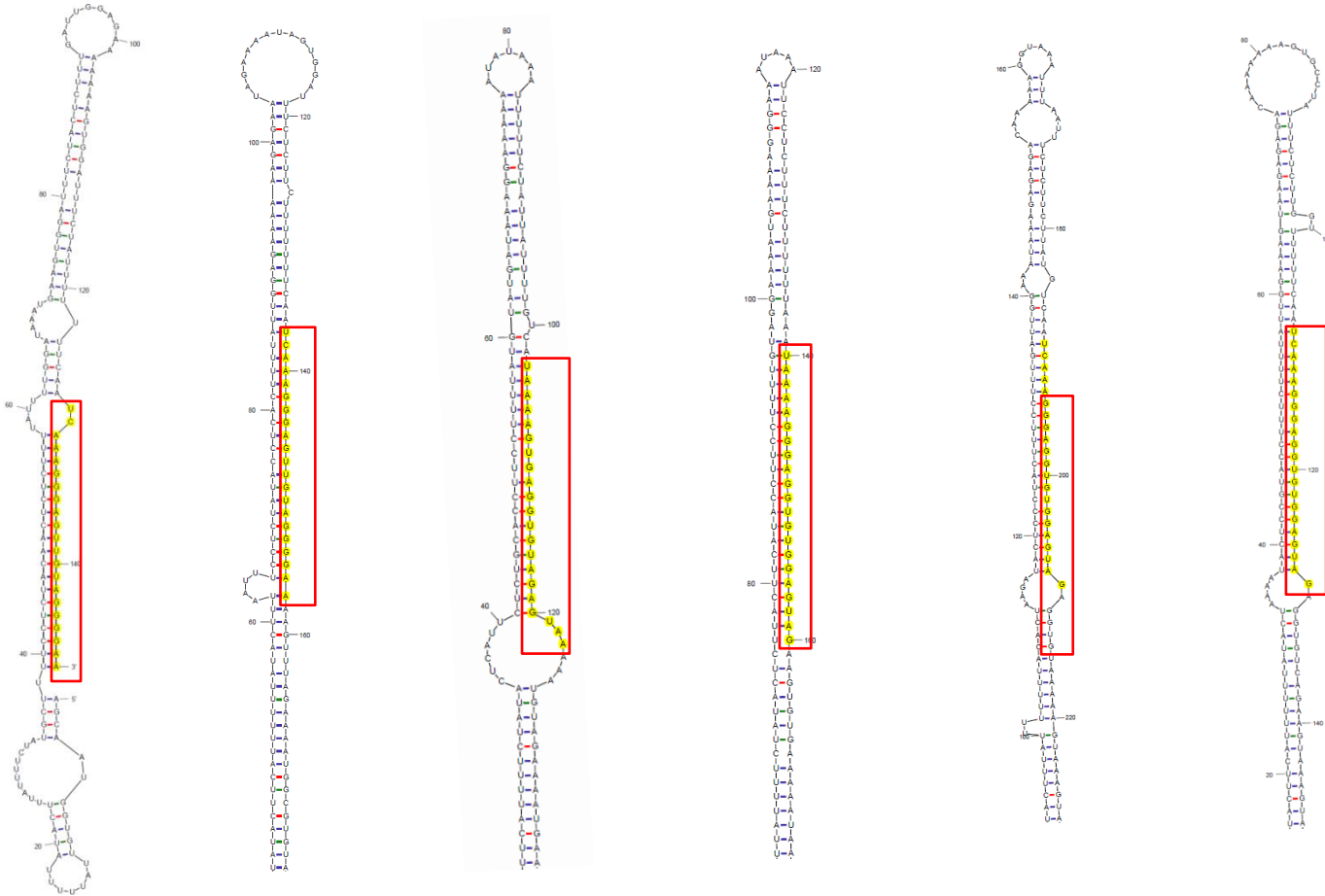
41. Park, M.Y., et al., *Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3691-6.
42. Smith, M.R., et al., *Cyclophilin 40 is required for microRNA activity in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5424-9.
43. Khraiweh, B., J.K. Zhu, and J. Zhu, *Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1819**(2): p. 137-48.
44. Mallory, A.C., D.P. Bartel, and B. Bartel, *MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes*. Plant Cell, 2005. **17**(5): p. 1360-75.
45. Laufs, P., et al., *MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems*. Development, 2004. **131**(17): p. 4311-22.
46. Williams, L., et al., *Regulation of Arabidopsis shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes*. Development, 2005. **132**(16): p. 3657-68.
47. Palatnik, J.F., et al., *Control of leaf morphogenesis by microRNAs*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 257-63.
48. Wang, J.W., et al., *Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis*. Plant Cell, 2005. **17**(8): p. 2204-16.
49. Wu, G. and R.S. Poethig, *Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3*. Development, 2006. **133**(18): p. 3539-47.
50. Aukerman, M.J. and H. Sakai, *Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes*. Plant Cell, 2003. **15**(11): p. 2730-41.
51. Millar, A.A. and F. Gubler, *The Arabidopsis GAMBY-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development*. Plant Cell, 2005. **17**(3): p. 705-21.
52. Fujii, H., et al., *A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis*. Curr Biol, 2005. **15**(22): p. 2038-43.
53. Zhao, B., et al., *Identification of drought-induced microRNAs in rice*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(2): p. 585-90.
54. Liu, H.H., et al., *Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana*. RNA, 2008. **14**(5): p. 836-43.
55. Zhou, L., et al., *Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in Oryza sativa*. J Exp Bot, 2010. **61**(15): p. 4157-68.
56. Zhou, X., et al., *Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1779**(11): p. 780-8.
57. Navarro, L., et al., *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling*. Science, 2006. **312**(5772): p. 436-9.
58. Zhou, X., G. Wang, and W. Zhang, *UV-B responsive microRNA genes in Arabidopsis thaliana*. Mol Syst Biol, 2007. **3**: p. 103.
59. Lu, S., et al., *Novel and mechanical stress-responsive MicroRNAs in Populus trichocarpa that are absent from Arabidopsis*. Plant Cell, 2005. **17**(8): p. 2186-203.
60. Jones-Rhoades, M.W. and D.P. Bartel, *Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets, Including a Stress-Induced miRNA*. Mol Cell, 2004. **14**(6): p. 787-99.
61. Sunkar, R. and J.K. Zhu, *Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis*. Plant Cell, 2004. **16**(8): p. 2001-19.

62. Chiou, T.J., et al., *Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis*. Plant Cell, 2006. **18**(2): p. 412-21.
63. Bari, R., et al., *PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants*. Plant Physiol, 2006. **141**(3): p. 988-99.
64. Franco-Zorrilla, J.M., et al., *Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity*. Nat Genet, 2007. **39**(8): p. 1033-7.
65. Marschner, H., *Mineral Nutrition of Higher Plants, second ed.* Academic Press, London. , 1995.
66. Abdel-Ghany, S.E. and M. Pilon, *MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15932-45.
67. Sunkar, R., A. Kapoor, and J.K. Zhu, *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, 2006. **18**(8): p. 2051-65.
68. Reyes, J.L. and N.H. Chua, *ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination*. Plant J, 2007. **49**(4): p. 592-606.
69. Liu, P.P., et al., *Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages*. Plant J, 2007. **52**(1): p. 133-46.
70. Li, W.X., et al., *The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance*. Plant Cell, 2008. **20**(8): p. 2238-51.
71. Zhao, B., et al., *Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 29.
72. Rajagopalan, R., et al., *A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 2006. **20**(24): p. 3407-25.
73. Sunkar, R., et al., *Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing*. BMC Plant Biol, 2008. **8**: p. 25.
74. Lu, S., Y.H. Sun, and V.L. Chiang, *Stress-responsive microRNAs in Populus*. Plant J, 2008. **55**(1): p. 131-51.
75. Subramanian, S., et al., *Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 160.
76. Szittyá, G., et al., *High-throughput sequencing of Medicago truncatula short RNAs identifies eight new miRNA families*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 593.
77. Cuperus, J.T., N. Fahlgren, and J.C. Carrington, *Evolution and functional diversification of MIRNA genes*. Plant Cell, 2011. **23**(2): p. 431-42.
78. Allen, E., et al., *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2005. **121**(2): p. 207-21.
79. Ronemus, M., M.W. Vaughn, and R.A. Martienssen, *MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in Arabidopsis*. Plant Cell, 2006. **18**(7): p. 1559-74.
80. Fahlgren, N., et al., *High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes*. PLoS One, 2007. **2**(2): p. e219.
81. Arenas-Huertero, C., et al., *Conserved and novel miRNAs in the legume Phaseolus vulgaris in response to stress*. Plant Mol Biol, 2009. **70**(4): p. 385-401.
82. Graham, P.H. and C.P. Vance, *Legumes: importance and constraints to greater use*. Plant Physiol, 2003. **131**(3): p. 872-7.

83. Freiberg, C., et al., *Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 394-401.
84. De la Rosa, C., *Identificación de microRNAs de frijol (Phaseolus vulgaris) en sequía: caracterización de un nuevo microRNA específico de leguminosas*. Tesis de Licenciatura-UNAM, 2009.
85. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol, 2005. **3**(3): p. e85.
86. John, B., et al., *Human MicroRNA targets*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e363.
87. Ossowski, S.F., J.; Schwab, R.; Riester, M.; Weigel, D. , *Web MicroRNA Designer 3 application (WMD3)*. Personal communication. .
88. Pelaez, P., et al., *Identification and characterization of microRNAs in Phaseolus vulgaris by high-throughput sequencing*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 83.
89. Bonnet, E., et al., *Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa identifies important target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11511-6.
90. Lorkovic, Z.J., et al., *Pre-mRNA splicing in higher plants*. Trends Plant Sci, 2000. **5**(4): p. 160-7.
91. Devers, E.A., et al., *Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis*. Plant Physiol, 2011. **156**(4): p. 1990-2010.
92. Beauclair, L., A. Yu, and N. Bouche, *microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis*. Plant J, 2010. **62**(3): p. 454-62.
93. Kim, V.N. and J.W. Nam, *Genomics of microRNA*. Trends Genet, 2006. **22**(3): p. 165-73.
94. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
95. Yu, J., et al., *Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(1): p. 59-68.
96. Thatcher, E.J., et al., *Genomic organization of zebrafish microRNAs*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 253.
97. Tanzer, A. and P.F. Stadler, *Molecular evolution of a microRNA cluster*. J Mol Biol, 2004. **339**(2): p. 327-35.
98. Baskerville, S. and D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. RNA, 2005. **11**(3): p. 241-7.
99. Merchan, F., et al., *Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins*. Genome Biol, 2009. **10**(12): p. R136.
100. Guddeti, S., et al., *Molecular evolution of the rice miR395 gene family*. Cell Res, 2005. **15**(8): p. 631-8.
101. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
102. Allen, E., et al., *Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in Arabidopsis thaliana*. Nat Genet, 2004. **36**(12): p. 1282-90.
103. Addo-Quaye, C., et al., *Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome*. Curr Biol, 2008. **18**(10): p. 758-62.
104. German, M.A., et al., *Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 941-6.
105. Shamimuzzaman, M. and L. Vodkin, *Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 310.
106. Mittler, R., et al., *Reactive oxygen gene network of plants*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(10): p. 490-8.
107. Asada, K., *The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999. **50**: p. 601-639.
108. Mittler, R., *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends Plant Sci, 2002. **7**(9): p. 405-10.

109. Foyer, C.H. and G. Noctor, *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*. Plant Cell, 2005. **17**(7): p. 1866-75.
110. Mittler, R., et al., *ROS signaling: the new wave?* Trends Plant Sci, 2011. **16**(6): p. 300-9.
111. Suzuki, N., et al., *Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling*. Curr Opin Plant Biol, 2011. **14**(6): p. 691-9.
112. Zabalza, A., et al., *Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration*. Plant Physiol, 2009. **149**(2): p. 1087-1098.
113. Baxter-Burrell, A., et al., *RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance*. Science, 2002. **296**(5575): p. 2026-8.
114. Yamasaki, H., et al., *Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16369-78.
115. Trindade, I., et al., *miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in Medicago truncatula*. Planta, 2010. **231**(3): p. 705-16.
116. Bird, A.J., et al., *Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts*. EMBO J, 2006. **25**(24): p. 5726-34.
117. Cakmak, I., Marschner, H. , *Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves*. Plant and Soil 1993. **155/156**: p. 127-130.
118. Cakmak, I., *Tansley review No. 111 — possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species*. New Phytologist, 2000. **146**(2): p. 185–205.
119. Ekiz, H., et al., *Effects of zinc fertilization and irrigation on grain yield and zinc concentration of various cereals grown in zinc-deficient calcareous soils*. Journal of Plant Nutrition, 1998. **21**(10): p. 2245-2256.

### XIII. FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Pvu pre-miR2119**  
1-148 nt

**Gma pre-miR2119**  
251-388 nt

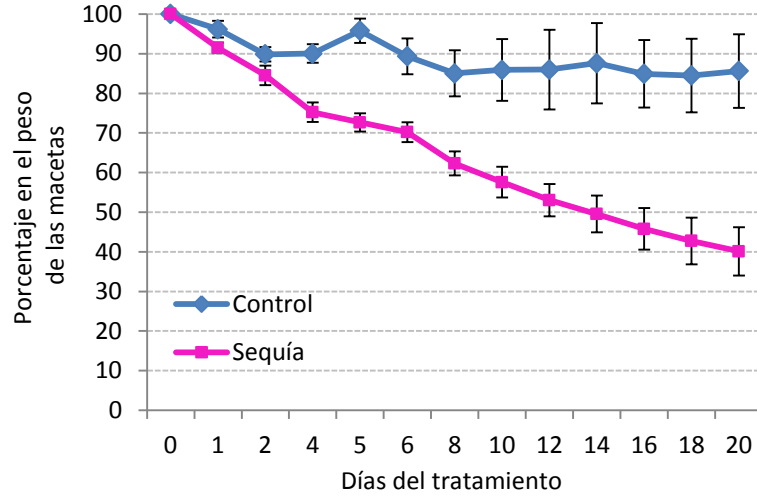
**Ahy pre-miR2119**  
128-245 nt

**Lja pre-miR2119**  
411-525 nt

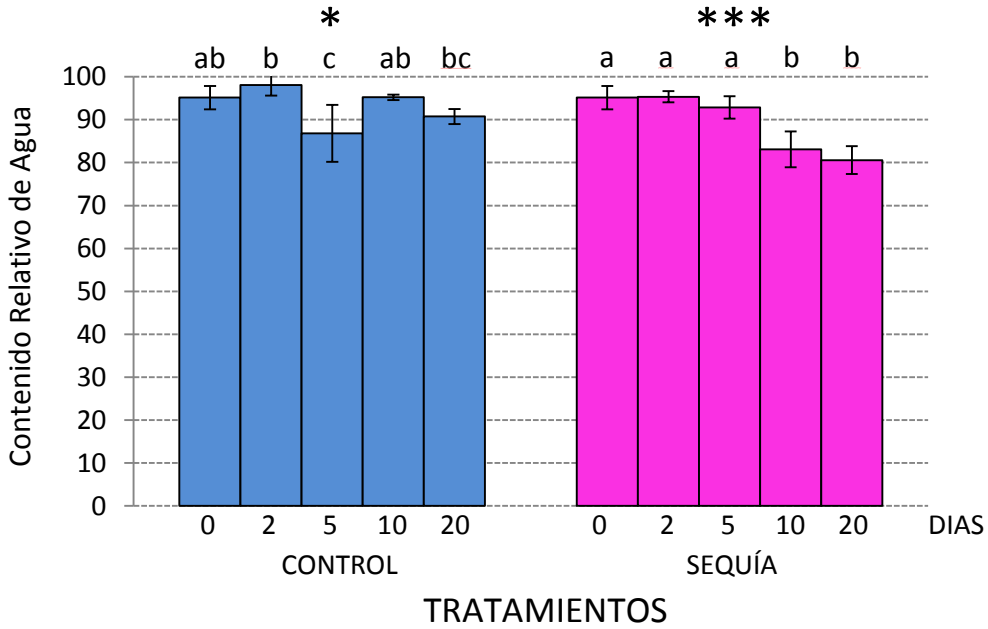
**Mtr pre-miR2119**  
93-228 nt

**Tpr pre-miR2119**  
124-256 nt

**Figura Suplementaria 1. Estructuras secundarias de los precursores de miR2119.** Se muestran las estructuras predichas utilizando mFold para los EST's de *Phaseolus vulgaris* (Pv pre-miR2119), *Glycine max* (Gm, gi:27808890), *Arachis hypogaea* (Ah, gi: 72201540), *Lotus japonicus* (Lj, gi:29970356), *Medicago truncatula* (Mt, gi:11896359) y *Trifolium pratense* (Tp, gi: 86099354).



**Figura suplementaria 2. Medición del peso de las macetas utilizadas en la cinética.** Se muestra los tratamientos control (líneas en azul) y sequía (líneas en rosa). En el eje "X" denota los días de la cinética en que fueron pesadas las macetas y el eje "Y" el porcentaje obtenido con respecto al día inicial del tratamiento.



**Figura suplementaria 3. Contenido relativo de agua (CRA) para los tratamientos de control y sequía.** En el eje "X" los días 0, 2, 5, 10 y 20 en que fueron recolectados y medido el CRA en hojas de diferentes tratamientos. El eje "Y" muestra el contenido relativo de agua (CRA). Estadística de análisis de varianza realizada para los tratamientos que muestra los niveles de significancia son representados por \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Diferentes grupos estadísticos (a, ab, b, bc, c) generados en el análisis.





#### XIV. ANEXOS

**Tabla II. Tabla de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

<b>Precursor miR398a-2119</b>	
PremiR2119Fwd	CAGAGGAGTGAATTTGAGAAC
Pre2119Rev	GTATGCCACAATGATATCATTC
<b>Precursores para pENTR</b>	
CACC-pre398-2119	CACCCAGAGGAGTGAATTTGAGAAC
CACC-pre2119	CACCTGTTGCAGGTTGTCTTTCTGC
Pre-miR398a-rev	TGCAGAAAGACAACCTGCAAC
<b>Gen Control</b>	
5'BAR-SalI	CGGCCGAGTCGACCGTGTAC
3'BAR-BglII	TCAGATCTCGGTGACGGGCAG
Pvu-EF1 $\alpha$ Fwd	GGTCATTGGTCATGTGCGACTCTGG
Pvu-EF1 $\alpha$ Rev	GCACCCAGGCATACTTGAATGACC
<b>5' RACE</b>	
Adaptador 5'	GCUGAUGGCCAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA
5' RACE Outer	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' RACE Inner	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
ADH1-Rv1	GCACTTCACACAGGTTGCTC
ADH1-Rv3	CATAACTCCTCTGTCACTGTTG
ADH1-Rv4	GTGTATTCACATGAATGTAGAGG
ADH1-Rv6	CATCACTCAGCATAACTCCTC
SOD-Rv1	GGCTTCCATGTCCATGCCTT
SOD-Rv2	AAGGCATGGACATGGAAGCC
<b>Northern Blot</b>	
As-miR2119	TTCCCCTACAACCTCCCTTGA
<b>PCR Tiempo Real</b>	
ADHFwd-RT	GAAGTGGCACCACCAGAGGCT
ADHRev-RT	GTCTGGCCCTTGGCTTCCCAG
ADHfwd-rt2	ACCACCAGAGGCTGGTGAAGTGCG
ADHrev-rt2	CTCTCCACAATCCCCTCAGCC
CSD1-Fwd	TCTTCTGTGCTACTTCTAGAC
CSD1-Fwd2	AACCTCACTGTTTCTATCACTG
CSD1-qRev	TGAAGTAAACAGTTCCAGTGAC
CSD1-qRev2	TCACTGCTGCCAAGAAGTGC
CSD1-qRev3	CCACAGCCTTCACCATGTC
CSD1-qRev4	CCCTCCTGACTGAAGTAAAC
Pvu-EF1 $\alpha$ Fwd	GGTCATTGGTCATGTGCGACTCTGG
Pvu-EF1 $\alpha$ Rev	GCACCCAGGCATACTTGAATGACC
miR2119	TCAAAGGGAGTTGTAGGGG
miR2118	TTGCCGATTCACCCATTC
pvu-miR398a-sh	TGTGTTCTCAGTCCACCCCT
pvu-miR398b	TGTGTTCTCAGTCCGCCCTG

**Tabla III. Condiciones de amplificación para qPCR**

Pasos	Temp. °C	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 s	40
Alineamiento	55-65 °C	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	