



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Análisis de microRNAs específicos de leguminosas de respuesta a déficit hídrico en
*Medicago truncatula***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBQ. Paulette Sofía Romero Pérez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. José Luis Reyes Taboada Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Luis Cárdenas Torres Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Claudia Díaz Camino Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos

Diciembre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles del Departamento de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Luis Reyes Taboada y como miembros del comité tutorial el Dr. Luis Cárdenas Torres y la, Dra. Claudia Díaz Camino.

RECONOCIMIENTOS

Al posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

A los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 510476 y Clave de proyecto de investigación 151571, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT con clave de proyecto IN-205015.

A los apoyos recibidos por el Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) para asistencia a congresos.

A los miembros del comité tutorial por ser parte fundamental en el desarrollo del proyecto:

Tutor principal: Dr. José Luis Reyes Taboada

Miembros del comité: Dr. Luis Cárdenas Torres

Miembros del comité: Dra., Claudia Díaz Camino

A los miembros del jurado, por la lectura y corrección de la presente tesis:

Presidente: Dra. Rosana Sánchez López

Secretario: Dra. Svetlana Shishkova

Vocal: Dr. Oswaldo Váldez López

Vocal: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Vocal: Dra. Claudia Martínez Anaya

Finalmente a todos los miembros del laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias por sus comentarios y apoyo para realizar este proyecto.

Resumen

Las leguminosas representan la segunda familia de plantas cultivadas más importantes en el mundo. Actualmente la deficiencia de agua conlleva un problema en el desarrollo de las actividades agrícolas. Se sabe que los microRNAs (miRNAs) están involucrados en la regulación de la respuesta a estrés en las plantas. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de entre 21-24 nt que regulan post-transcripcionalmente genes mediante el apareamiento de bases con sus RNAs mensajeros. Nosotros estamos interesados en la caracterización de miRNAs leguminosa-específicos los cuales podrían revelar estrategias únicas de esta familia relacionadas con la respuesta al déficit de agua. Nuestro grupo de trabajo ha realizado la caracterización de: miR1514, miR2119 y miR2199 en *Phaseolus vulgaris*, sin embargo la disponibilidad de herramientas genéticas en esta planta han limitado la caracterización. Para sobrellevar esta situación decidimos utilizar la planta modelo *Medicago truncatula*, la cual ofrece ventajas para el estudio funcional de estos miRNAs. Realizando diferentes análisis en servidores y bases de datos encontramos que Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 están presentes en *M. truncatula* y regulan transcritos de: un factor transcripcional de la familia NAC, una enzima Alcohol Deshidrogenasa y un factor transcripcional de la familia bHLH respectivamente. Estos blancos son homólogos a los reportados para los miRNAs de *P. vulgaris*. Mediante un análisis bioinformático encontramos que Mtr-miR1514 de 22 nt podría regular su blanco mediante la generación de RNAs pequeños en fase. En función de caracterizar la participación de los miRNAs de interés y su relación con la respuesta a la baja disponibilidad de agua, se establecieron condiciones de crecimiento para medir la acumulación de los miRNAs en condiciones de deficiencia de agua. En los ensayo encontramos evidencia que muestra la participación de Mtr-miR1514 y Mtr-mir2199 en la respuesta al estrés en diferentes condiciones y etapas de desarrollo de la planta. Finalmente nosotros realizamos la adaptación de una metodología para la transformación transitoria de hojas de *M. truncatula*. Las conclusiones y resultados obtenidos en este estudio permitiran establecer pautas para el estudio exhaustivo y caracterización de los miRNAs leguminosa-específicos.

Abstract

Currently water deficit is considered as a severe environmental constraint to plant productivity. Legumes represent the second most-important crop family, and a key source of biological nitrogen in agriculture. MicroRNAs (miRNAs) are important stress-responsive regulatory molecules in plants. MiRNAs are 21-24 nt small RNAs involved in post-transcriptional gene regulation through base-pairing to target mRNAs. We are interested in the characterization of legume-specific miRNAs which might reveal novel strategies involved in response to water deficit unique to this family of plants. Our group has started the characterization of novel legume-specific microRNAs: miR1514, miR2119 and miR2199, in *Phaseolus vulgaris* however we have been thwarted by the limited availability of genetic resources. To overcome this situation we turned our attention to the analysis of these miRNAs in the model legume *Medicago truncatula*, which offers diverse advantages for functional characterization of these miRNAs. Using different bioinformatics analyses in web servers and public databases. We found that Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 and Mtr-miR2199 are present in *M. truncatula* and they regulate the mRNA of: a transcription factor of the NAC family, an Alcohol Dehydrogenase enzyme and a transcription factor of the bHLH family respectively. We also reported that these transcripts are miRNA targets homologous to those present in *P. vulgaris*. A bioinformatic analysis showed that Mtr-miR1514 is a 22 nt long miRNA that likely regulates its target, generating phased small interfering RNAs. To elucidate the participation of the miRNAs of interest in the response to low water availability, we established growth conditions to address the accumulation of the miRNAs under water deficit. In this assays we found evidence showing that Mtr-miR1514 and Mtr-miR2199 are involved in the response to low water availability in different conditions and development stages. Finally we reported the adaptation of a transient transformation methodology for *M. truncatula* leaves. The results and the conclusions obtained in this study allowed us to establish guidelines for the comprehensive study of these legume-specific miRNAs involved in water deficit response.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
1.1. Respuesta al estrés por déficit hídrico	1
1.2. MicroRNAs	3
1.2.1. MicroRNAs en plantas	5
1.2.2. miRNAs y la respuesta a déficit de agua	8
1.3. Las plantas leguminosas	10
1.3.1. <i>Medicago truncatula</i>	10
2. Antecedentes	11
3. Justificación	14
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
5.1. General	16
5.2. Particulares	16
6. Materiales y métodos	17
6.1. Análisis en bases de datos y servidores de análisis	17
6.2. Germinación	17
6.3. Crecimiento de plántulas de <i>Medicago truncatula</i> en condiciones de estrés osmótico y salino	18
6.4. Crecimiento de plantas adultas de <i>Medicago truncatula</i> en condiciones de estrés por sequía	18
6.4.1. Determinación del contenido relativo de agua en plantas	19
6.4.2. Monitoreo de la humedad del sustrato	19
6.4.3. Determinación de la osmolalidad en hojas	20
6.5. Análisis de miRNAs y blancos de leguminosas en <i>M. truncatula</i>	20
6.5.1. Determinación y cuantificación de miRNAs	20
6.5.2. Cuantificación de miRNAs por Northern blot	21
6.5.3. Obtención de cDNA de miRNAs	21
6.5.4. Obtención de cDNA de blancos	22
6.5.5. Cuantificación por PCR cuantitativa	22

6.6.	Expresión transitoria en hojas de <i>Medicago truncatula</i>	23
6.6.1.	Amplificación del precursor de pre-MIR398a-2119.....	24
6.6.2.	Transformación de células quimio-competentes de <i>Escherichia coli</i>	24
6.6.3.	Extracción del DNA plasmídico	24
6.6.4.	Recombinación del plásmido.....	25
6.6.5.	Transformación de células quimio-competente de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
6.6.6.	Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
6.6.7.	Agro-infiltración de <i>Medicago truncatula</i>	26
6.6.8.	Amplificación del transcrito exógeno del MIR398a-2119 de hojas agro-infiltradas de <i>M. truncatula</i>	26
7.	Resultados	27
7.1.	Los miRNAs de <i>P. vulgaris</i> que responden a déficit hídrico se encuentran en <i>M. truncatula</i> y se predicen blancos homólogos.....	27
7.2.	Acumulación en plántulas de microRNAs de leguminosas relacionados con la respuesta a déficit hídrico	34
7.3.	Acumulación en plantas adultas de microRNAs específicos de leguminosas relacionados con la respuesta a déficit hídrico en <i>M. truncatula</i>	37
7.3.1.	Efecto del estrés por sequía en plantas adultas de <i>M. truncatula</i>	37
7.3.2.	Mtr-miR2199 responde al estrés por sequía en la raíz de <i>M. truncatula</i>	38
7.4.	Expresión transitoria en hojas de <i>M. truncatula</i>	41
8.	Discusión	44
8.1.	Análisis de miRNAs poco abundantes en <i>M. truncatula</i>	44
8.2.	Transformación transitoria de hojas de <i>M. truncatula</i> como herramienta para la caracterización funcional de miRNAs linaje-específicos.....	46
8.3.	Mtr-miR1514 es un miRNA linaje-específico que se encuentra en <i>M. truncatula</i> , regula a su blanco por corte y genera phasiRNAs.....	47
8.4.	Mtr-MiR2199 responde a sequía en la raíz de <i>M. truncatula</i>	48
9.	Conclusiones	52
10.	Perspectivas	53
11.	Referencias	54
12.	Anexo A	61
13.	Anexo B	62
14.	Anexo C	63

15. Anexo D..... 65

Tabla de Figuras

Figura 1. Biogénesis de miRNAs y su modo de regulación en plantas.....	6
Figura 2. Generación de phasiRNAs mediada por miRNAs de 22 nt.....	8
Figura 3. MiRNAs leguminosa-específicos.....	11
Figura 4. Acumulación de Pvu-miRNAs ante diferentes condiciones de estrés.....	12
Figura 5. Presencia de miRNAs de <i>P. vulgaris</i> en plantas de otras especies.....	13
Figura 6. Alineamiento de miR1514, miR2119 y miR2199 de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. truncatula</i> . Transcritos Blancos de miRNAs de <i>M. truncatula</i>	28
Figura 7. Mtr-miR1514 en <i>M. truncatula</i>	29
Figura 8. Regulación del blanco de Mtr-miR1514.....	30
Figura 9. Acumulación relativa de miR159, Mtr-miR1514a, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en distintos órganos y estadios de desarrollo de <i>M. truncatula</i>	33
Figura 10. Crecimiento de plántulas de <i>M. truncatula</i> en manitol y acumulación relativa de Mtr-miR1514 en condiciones de estrés osmótico.....	35
Figura 11. Crecimiento de plántulas de <i>M. truncatula</i> bajo condiciones de salinidad y acumulación relativa de Mtr-miR1514 en condiciones de estrés salino.....	36
Figura 12. Estatus hídrico de plantas adultas de <i>M. truncatula</i> bajo condiciones control y sequía.....	38
Figura 13. Acumulación relativa de Mtr-miR2199 en plantas adultas de <i>M. truncatula</i> en condiciones control y sequía.....	39
Figura 14. Blancos de Mtr-miR2199 y su acumulación relativa en condiciones de estrés por sequía en plantas adultas de <i>M. truncatula</i>	40
Figura 15. Amplificación del transcrito exógeno del Mtr-MIR398a-2119 de hojas agroinfiltradas de <i>M. truncatula</i>	42
Figura 16. Cuantificación de miRNAs utilizando diferentes metodologías para la obtención de cDNA.....	45

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico (Abscisic acid, por sus siglas en inglés)

ABF: Factores de unión a ABA (ABA-binding factor, por sus siglas en inglés)

ABRE: Elementos de respuesta a ABA (ABA response elements, por sus siglas en inglés)

ADH1: Alcohol Deshidrogenasa 1 (Alcohol dehydrogenase 1)

AGO1: Proteína Argonauta 1

ATP: Adenosin trifosfato

bZIPD: Dominio básico de cremallera de leucinas (Basic leucin zipper domain, por sus siglas en inglés)

CBF: Factores de unión a repetidos C (C-repeat binding factor, por sus siglas en inglés)

DCL1: Tipo Dicer 1 (Dicer-like 1, por sus siglas en inglés)

cDNA: DNA complementario

COX: Citocromo oxidasa mitocondrial (Cytochrome oxidase mitochondrial)

CSD1: Superóxido dismutasa 1 (Copper superoxide dismutase 1)

DNA: Ácido desoxiribonucleico (Desoxyribonucleic acid, por sus siglas en inglés)

DRE: Elementos de respuesta a sequía (Drought response element, por sus siglas en inglés)

DRE/CTR: Elementos de respuesta a deshidratación/C-repetidos (Dehydration-responsive element/C-repeat)

DREB: Elementos de unión a DRE (DRE-binding protein, por sus siglas en inglés)

ERD1: Elementos de respuesta temprana a deshidratación (Early response to dehydration 1, por sus siglas en inglés)

hc-siRNAs: siRNAs heterocromáticos

HEN1: HUA ENHANCER 1

HYL1: Hyponastic leaves 1

LEA: Proteínas abundantes de la embrogenesis tardía (Late Embryogenesis Abundant, por sus siglas en inglés)

MIR: Genes que codifican para miRNAs

miRNAs: MicroRNAs

Mtr-miR: miRNA de *Medicago truncatula*

nat-siRNAs: siRNAs transcritos naturalmente anti-sentido

PARE: Análisis en paralelo de extremos de RNA (Parallel analysis of RNA ends, por sus siglas en inglés)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés)

phasiRNAs: siRNAs en fase

pre-microRNA: Precursor del microRNA

PTGS: Silenciamiento de genes post-transcripcional (Post-transcriptional Gene Silencing, por sus siglas en inglés)

Pvu-miR: miRNA de *Phaseolus vulgaris*

qPCR: PCR cuantitativa

RDR6: Polimerasa dependiente de RNA (RNA Dependent RNA Polymerase 6, por sus siglas en inglés)

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNA induced silencing complex por sus siglas en inglés)

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid, por sus siglas en inglés)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species, por sus siglas en inglés)

RT: por sus siglas en inglés Reverse Transcription

SGS3: Supresor del silenciamiento de genes (Suppressor of gene silencing 3, por sus siglas en inglés)

siRNAs: RNAs pequeños de interferencia (small interfering RNAs, por sus siglas en inglés)

sRNAs: RNAs pequeños (small RNAs, por sus siglas en inglés)

ta-siRNAs: siRNAs de acetación trans

TGS: Silenciamiento de genes transcripcional (Transcriptional Gene Silencing, por sus siglas en inglés)

ZF-HD: Homeo-dominio de dedos de zinc (zinc finger homeo domain, por sus siglas en inglés)

1. Introducción

Las plantas llevan a cabo el proceso de fotosíntesis mediante el cual transforman la energía luminosa en energía química, convirtiéndose así en los principales productores primarios de la mayoría de los ecosistemas terrestres.

A diferencia de los animales u otros organismos las plantas son organismos sésiles, debido a esta condición, las plantas han evolucionado desarrollando respuestas adaptativas eficaces que les han permitido proliferar en una gran diversidad de ambientes.

Naturalmente las plantas se encuentran recibiendo numerosos estímulos, provocados por su interacción con otros organismos, o debido a cambios ambientales como variaciones en la temperatura, deficiencia de agua, concentración de CO₂ o exposición a radiaciones solares, entre otros.

En particular el déficit de agua puede ser provocado por: la disminución de agua en el ambiente o bien la acumulación de osmolitos en el medio y las bajas temperaturas cuyos efectos son disminuir la disponibilidad de agua para la planta. Esta deficiencia de agua puede provocar cambios en el crecimiento y en el desarrollo óptimo, lo cual se conoce como “estrés por déficit hídrico”. Este tipo de estrés no sólo implica un problema para la planta *per se*, indirectamente afecta las actividades humanas, ya que la productividad y el rendimiento de los cultivos agrícolas se ve disminuida. Por lo anterior, se han realizado esfuerzos para caracterizar la respuesta de las plantas bajo condiciones de estrés por déficit hídrico.

1.1. Respuesta al estrés por déficit hídrico

Las plantas cuentan con diversos mecanismos de respuesta al estrés por déficit hídrico que dependen de la severidad y de la duración del estímulo. A pesar de que se conoce poco sobre la percepción del estrés, se sabe que la respuesta es mediada principalmente, pero no únicamente, por la fitohormona conocida como ácido abscísico (ABA). Este compuesto actúa como un mensajero endógeno dentro de la planta induciendo la respuesta temprana al estrés, exhibiendo de esta manera mecanismos de resistencia o de evasión implicados en el mantenimiento del estatus hídrico de los tejidos. De igual forma, el ABA actúa en el ajuste de la respuesta a estados severos y prolongados de déficit de agua, respondiendo

mediante mecanismos de escape donde el objetivo es completar el ciclo de vida (Ingram y Bartels, 1996).

El mantenimiento del estatus hídrico de los tejidos vegetales se realiza aumentando la eficiencia de consumo de agua mediante diversos mecanismos como: la reducción de la conductancia epidérmica (estomatal y cuticular), la reducción de la superficie de evapotranspiración (área de la hoja), o el incremento del sistema radicular, con fines de aumentar la capacidad de absorción del líquido. Conjuntamente se ha observado que las células promueven la acumulación de osmolitos compatibles de bajo peso molecular como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y polioles, los cuales son cruciales para el mantenimiento del equilibrio osmótico entre las células vegetales y su medio exterior (Harb y col., 2010).

Cuando ocurre el estrés se modifica el metabolismo celular. Esto es causado principalmente por la reducción de la asimilación del CO₂, que a su vez modifica la actividad de varias enzimas, especialmente de aquellas relacionadas con la fijación del CO₂ y la síntesis de ATP. De igual manera se ha observado un incremento del flujo de metabolitos a la vía de la fotorespiración, que incrementa la carga oxidativa provocando eventualmente un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) que finalmente induce la disminución de la tasa de crecimiento de la planta (Farooq y col., 2009).

A nivel molecular se desencadena la expresión de numerosos genes a partir de los cuales se producen proteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular durante el estrés como: chaperonas, proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), enzimas sintetizadoras de osmolitos compatibles, canales de agua, canales de iones, enzimas detoxificadoras y transportadores de azúcares, entre otros (Yamaguchi-Shinozaki y Kazuo-Shinozaki, 2006). Asimismo el estímulo por el estrés regula la maquinaria de transducción de señales que finalmente permitirá a las células responder al estímulo. Dentro de los componentes de señalización se encuentran las cinasas, los sistemas de señalización por fosfolípidos, factores transcripcionales, gradientes de Ca²⁺ y ROS, entre otros, los cuales actúan de forma cooperativa para formar complejas redes de regulación que permiten efectuar respuestas muy sofisticadas al estímulo provocadas por la disminución en la disponibilidad de agua (Jian-Kang Zhu, 2002).

Las rutas comunes de señalización de estrés se han dividido en dependientes de ABA e independientes de ABA. La mayoría de los genes claves en las rutas dependientes de ABA han sido identificados como: factores de transcripción tipo DREB (*DRE-binding protein*)/ CBF (*C-repeat binding factor*) que forman parte de la familia APETALA2 (AP2). Estos factores reconocen cajas DRE/CRT (Chinnusamy y col., 2003), MYC y MYB, que son activados *de novo* y de forma cooperativa inducen genes como RD22 (Abe y col., 1997; Bartels y Sunkar, 2005). Se han identificado también elementos de respuesta al estrés dependientes de ABA como ABRE (*ABA-responsive elements*)/ ABF (*ABA-binding factor*), que son reconocidos por factores transcripcionales con dominios tipo bZIP de unión a DNA (Choi y col., 2000). Además se han reportado elementos de respuesta a deshidratación DRE (*Dehydration responsive elements*) (Ramanjulu y Bartels, 2002; Bartels y Sunkar, 2005). De igual manera se sabe de factores tipo ZF-HD (*zinc finger homeo domain*), los cuales se unen a motivos específicos llamados ZFHDR que se encuentran en la región promotora de ERD1 (*Early response to dehydration 1*), y proteínas NAC (NAM ATAF CUC2) que reconocen secuencias NACRS, las cuales juegan un papel importante en la expresión de ERD1 (Tran y col., 2006).

Numerosos estudios señalan que la respuesta a déficit hídrico está íntimamente relacionada con el metabolismo del RNA (Covarrubias y Reyes, 2010). Por ejemplo, las mutantes *sad1* (*Supersensitive ABA and Drought 1*) y *abh1* (*ABA hypersensitive 1*) carecen de la proteína *Sm-like* involucrada en el transporte de RNA (SAD1) o una proteína nuclear de reconocimiento al 5'Cap de RNA (ABH1), respectivamente (Xiong y col., 2001; Hugouvieux y col., 2001). La mutante *fiery2* muestra tolerancia al estrés salino, y se ha encontrado que *FIERY2* codifica para una proteína de unión a RNA de doble cadena (Xiong y col., 2002). Existen mutantes *hyl1* (*Hyponastic leaves 1*) cuya respuesta a ABA está afectada (Lu y Fedoroff, 2000), se sabe que HYL1 cuenta con un factor de unión a RNA de doble cadena requerido para la biogénesis de RNAs pequeños no codificantes conocidos como miRNAs. A partir de la información obtenida en los estudios anteriores nosotros proponemos que existe una justificación del estudio de la relación del metabolismo de RNA y la respuesta al estrés por déficit hídrico.

1.2. MicroRNAs

Numerosos estudios reportan la existencia de pequeñas moléculas de RNA involucradas en la regulación de genes llamados sRNAs (*small RNAs*). Estas moléculas son conocidas como siRNAs (*small interfering RNAs*) y pueden ser clasificados en distintos tipos: los siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs), los siRNAs derivados de transcritos naturalmente anti-sentido (nat-siRNAs), los *siRNAs trans-acting* (ta-siRNAs) y otros siRNAs secundarios en fase (Axtell 2013; Brodersen y Voinnet, 2006). Estas categorías se diferencian unas de otras por el tipo de *loci* genómico del cual se originan, los componentes de su ruta de biogénesis, y el modo de acción sobre sus blancos. Además se sabe que los hc-siRNAs median silenciamiento de genes a nivel transcripcional (TGS, *Transcriptional Gene Silencing*) sobre el *locus* de DNA blanco, mientras que los otros siRNAs median el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS, *Post-transcriptional Gene Silencing*).

Existen otras moléculas de RNA capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional llamados microRNAs (miRNAs) (Jones-Rhoades y col., 2006). Los miRNAs son productos de transcritos con repetidos-invertidos que forman estructuras secundaria tallo-asa, estos transcritos son cortados por enzimas de la familia Dicer y/o Drosha para producir pequeños RNAs de aproximadamente 21 a 24 nucleótidos los cuales guían a proteínas Argonauta (AGO) para regular post-transcripcionalmente transcritos blancos que cuentan con secuencias complementarios a la del miRNA (Axtell y col. 2011).

Gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se ha podido elucidar un vasto universo de miRNAs; hasta este momento se encuentran registrados más de 28,000 miRNAs maduros en 206 especies diferentes en la versión actual de base de datos de registros de miRNAs miRBase ver. 21 (Kozomara y Griffiths-Jones, 2013). Esta abundancia sugiere que los miRNAs se encuentran involucrados en múltiples procesos celulares.

Los miRNAs se encuentran en plantas y animales, existen diferencias entre los dos reinos con respecto al mecanismo y al alcance de la regulación génica mediada por estas moléculas. Por ejemplo, el *locus* que produce el miRNA tiene distinto arreglo genómico en cada reino, además, los miRNAs son extraídos de precursores por diferentes rutas de biogénesis y se lleva a cabo en diferentes compartimentos celulares. Los miRNAs maduros de plantas y animales tienen diferentes *suites* de blancos directos; el número promedio de blancos directos para un miRNA animal generalmente excede el de un miRNA de planta por al menos una orden de magnitud (Bartel 2009). Además, en el caso particula de plantas se conocen escasos ejemplos de miRNAs cuyos sitios de unión se encuentren en las regiones no codificantes de sus mRNAs blanco; esto, en cambio, es una característica

común en los miRNAs de animales, los cuáles regulan a sus mRNAs blanco mediante la inhibición traduccional (Brodersen y Voinnet, 2006).

1.2.1. MicroRNAs en plantas

Los miRNAs en plantas se producen a partir de los genes *MIR* los cuales se localizan generalmente en regiones intergénicas y son transcritos por la RNA polimerasa II (Reinhart y col., 2002), la cual sintetiza un RNA primario (pri-miRNA o MIR) (Figura 1) que forma estructuras secundarias tipo tallo-asa. El pri-miRNA en plantas es procesado por una ribonucleasa tipo III llamada DCL1 (*Dicer-like protein 1*), que genera un RNA de estructura dúplex con extremos escalonados miRNA/miRNA*. Este proceso es asistido por proteínas con dominios de unión a RNA, como HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y la proteína con dedos de zinc-C2H2 SERRATE (SE), que interactúa con DCL1 (Kurihara 2005). Por otro lado, HUA ENHANCER 1 (HEN1) que es una proteína que lleva a cabo la metilación del grupo 2-hidroxil del extremo 3' terminal de la estructura dúplex del RNA, gracias a que cuenta con un dominio metiltransferasa capaz de metilar RNA de cadena sencilla (Figura 1) lo que confiere estabilidad al miRNA dúplex (Yu 2005). En las células vegetales el miRNA dúplex es transportado del núcleo al citoplasma mediante una proteína llamada HASTY. En el citoplasma miRNA/miRNA* se incorpora en un complejo multiprotéico de silenciamiento conocido como "complejo de silenciamiento inducido por RNA", (RISC, *RNA Induced Silencing Complex*). El componente central de este complejo es la proteína Argonauta 1 (AGO1) (Voinnet 2009). En este complejo se descarta la cadena de miRNA* y conserva la cadena de RNA miRNA la cual guía por complementariedad de bases al complejo RISC para identificar a los RNA mensajeros blancos regulando así post-transcripcionalmente (Figura 1).

Existen dos mecanismos generales de regulación por miRNAs; en la mayoría de los casos en plantas los blancos de miRNAs sucumben al corte catalizado por AGO1 cuando se encuentran con su miRNA. Este corte se lleva a cabo en la región de complementariedad del miRNA y su blanco, entre los nucleótidos complementarios +10 y +11 del miRNA comenzando por el extremo 5'. Sin embargo, no todas las interacciones blanco-miRNAs en plantas terminan en el corte catalizado por AGO, algunos miRNAs de plantas tienen conservado un desapareamiento central incrustado dentro de las regiones de bases

apareadas en los extremos 5' y 3' que permite la unión AGO/miRNA, pero que previene el corte (Brodersen y col., 2008) a este mecanismo de regulación se le conoce como represión de la traducción (Figura 1).

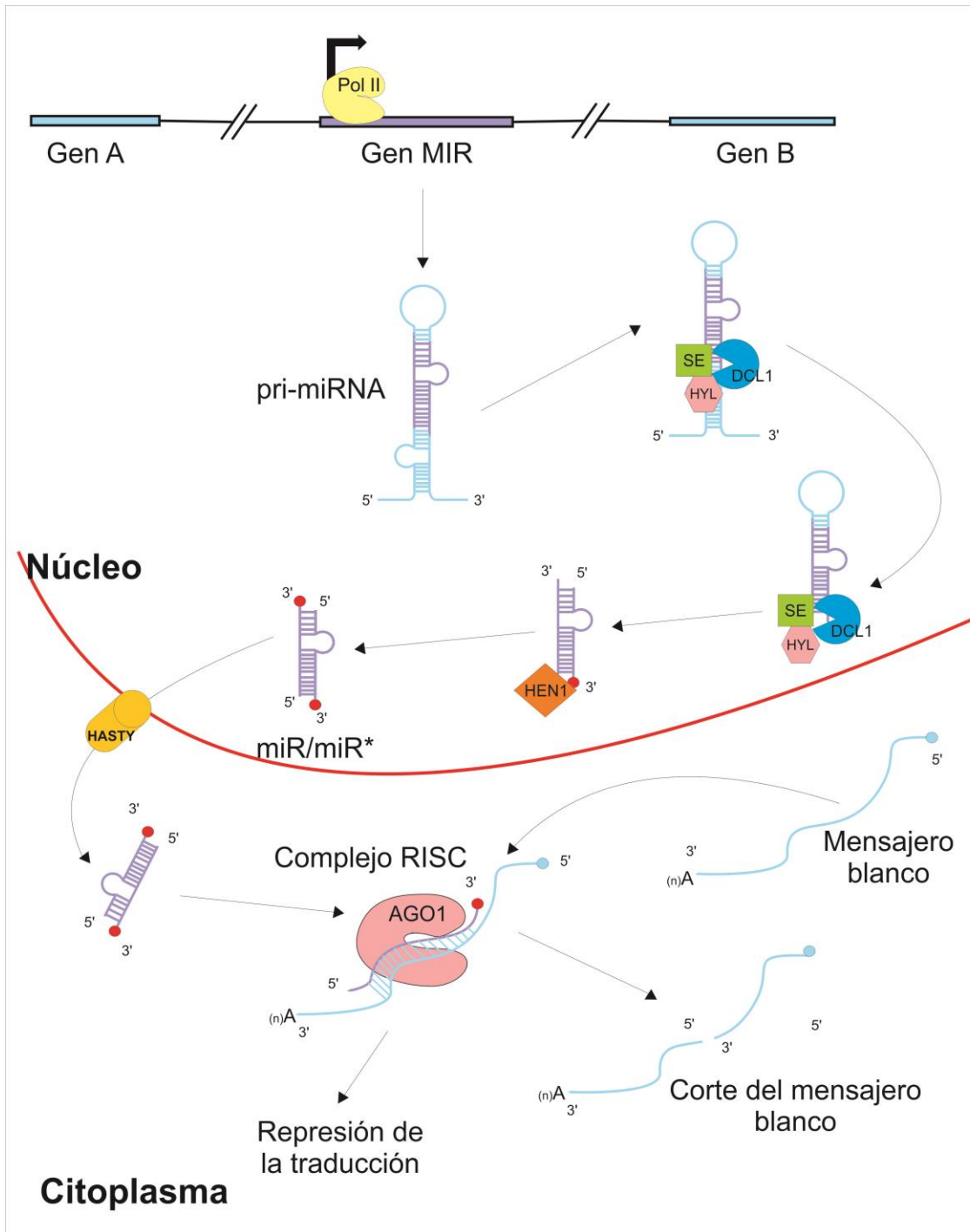


Figura 1. Biogénesis de miRNAs y modo de regulación en plantas.

Los genes *MIR* de la planta son transcritos por la RNA polimerasa II. El transcrito se pliega en una estructura tallo-asa denominado miRNA primario (pri-miRNA o MIR). La proteína Dicer-like 1 (DCL1), HYPONASTIC

LEAVES1 (HYL1) y SERRATE (SE), forman un complejo que corta al pri-miRNA formando una estructura duplex miRNA/miRNA*. El extremo 3' del miRNA y la cadena complementaria (miRNA*) es metilada por HUA ENHANCER1 (HEN1). La exportación hacia el citoplasma se lleva a cabo por HASTY; en el citoplasma la cadena de miRNA se asocia a la proteína AGO1 con la cual forma el complejo de silenciamiento (RISC) que dirige el corte del blanco o reprime la traducción. (Modificado de Soares-Capitao 2009).

Se sabe que en plantas los sitios canónicos de reconocimiento del blanco se encuentran en las regiones 5' UTR, ORFs y 3' UTRs, así como transcritos que no codificantes, sugiriendo que todos los contextos de RNA están igualmente disponibles para una regulación dirigida por los miRNAs. Los blancos de miRNAs en plantas han sido predichos en base a su extensa complementariedad con miRNAs, así como con experimentos de sobre-expresión del miRNA. Muchos de estos análisis han sido validados mediante el aislamiento de los productos de corte dirigidos por el miRNA utilizando la técnica de RLM-5' RACE (*RNA Ligase Mediated-Rapid 5' Amplification of cDNAs Ends*) modificada (Dalmy 2011). Adicionalmente existe otra metodología experimental llamada "Secuenciación de Degradoma" también conocido como "PARE" (*Parallel Analysis of RNA Ends*) para detectar directamente los blancos de miRNAs (Addo-Quaye y col., 2008). Esta técnica se fundamenta en que se ha demostrado que el corte guiado por siRNAs mediado por AGO sobre sus blancos mensajeros ocurre exactamente entre el décimo y onceavo nucleótido complementario relativo al extremo 5' del siRNA, donde el fragmento resultante es estable *in vivo* y conserva la firma de corte 5' monofosfato realizado por AGO (Llave 2002). La secuenciación masiva de los extremos 5' de mRNA poliadenilados captura los fragmentos o etiquetas que derivan de la reacción endonucleolítica de AGO y de esta manera puede conocerse aquellos mensajeros que hayan sufrido el corte mediado por RISC.

Recientemente se ha demostrado que la característica de un miRNA de tener 22 nt es suficiente para que este produzca siRNA secundarios en fase (Chen H. y col., 2010, Cuperus y col., 2010, Manavella y col., 2012). Este fenómeno de producción de siRNAs secundarios se basa en que la regulación post-transcripcional de un transcrito blanco guiada por un miRNA de 22 nt genera fragmentos que pueden fungir como templado para la síntesis de RNA de doble cadena por una polimerasa dependiente de RNA, *RNA Dependent RNA Polymerase 6* (RDR6), este proceso es asistido por el *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING3* (SGS3) (Figura 2). Los genes que generan éste tipo de transcritos blancos son conocidos como genes *PHAS*.

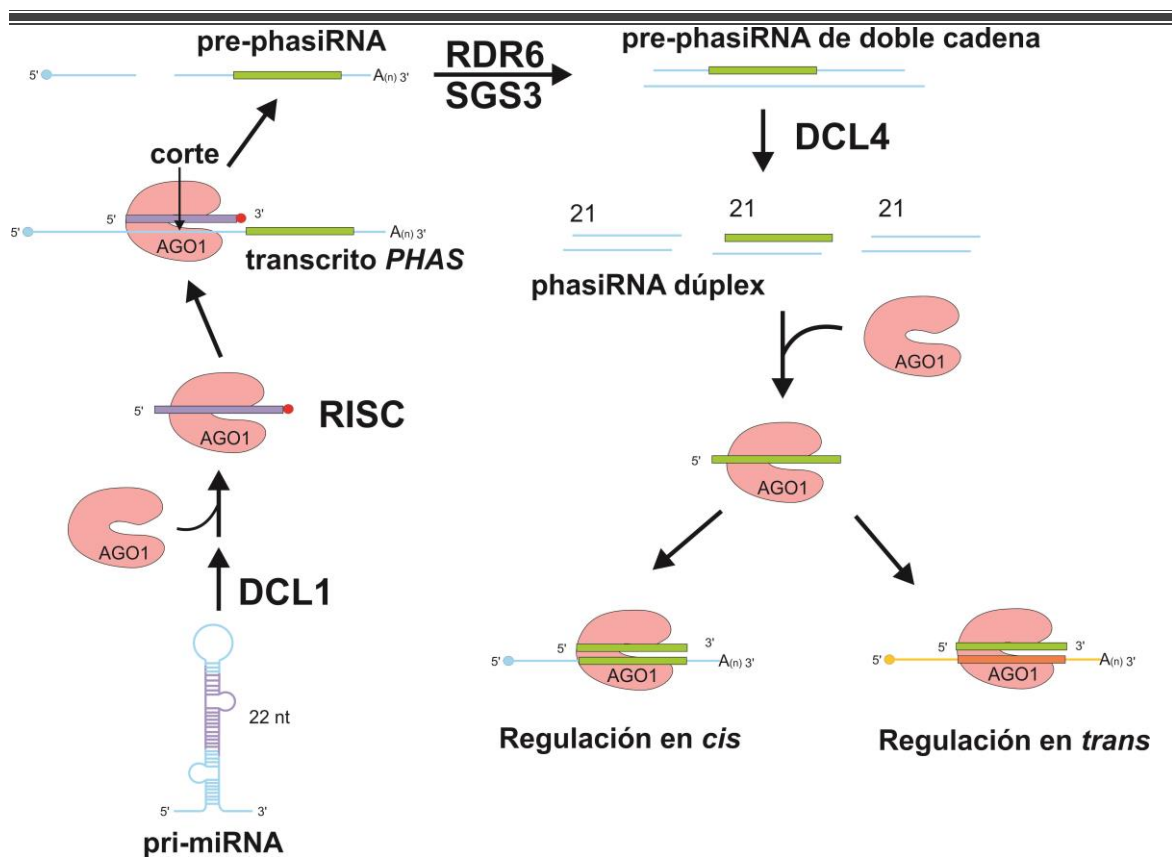


Figura 2. Generación de phasiRNAs mediada por miRNAs de 22 nt

Un pri-miRNA da origen a un miRNA de 22 nt asistido de la maquinaria de biogénesis previamente mencionada. Este miRNA regula el transcrito de un gen *PHAS* mediante su corte a través del complejo RISC. Se genera el pre-phasRNA el cual se utiliza como molde de RDR6 para generar un RNA de doble cadena, este proceso es asistido por SGS3. La proteína DCL4 realiza cortes en fase del pre-phasRNA de doble cadena generando RNAs dúplex de 21 nt los cuales pueden cargarse en AGO1 para llevar a cabo la regulación de mensajeros blancos en *cis* o en *trans*.

Posteriormente DCL4 procesa la doble cadena de RNA dando como resultado siRNAs en sucesión, en donde el extremo de corte es definido por la guía del miRNA. Los siRNAs secundarios resultantes muestran fuertes patrones de procesamiento en fase es decir, se encuentran a 21 nt uno del otro, lo cual da origen al nombre “phasiRNAs” (Chen H. y col., 2010). Estos siRNAs pueden llevar a cabo la regulación de su blanco en *cis* regulando al mismo transcrito del gen *PHAS* del que tuvo origen o en *trans* regulando un blanco diferente al de su origen (Figura 2).

1.2.2. miRNAs y la respuesta a déficit de agua

Existen evidencias que señalan la participación de miRNAs en respuesta a diferentes condiciones de estrés incluyendo déficit hídrico (Sunkar 2010; Covarrubias y Reyes, 2010;

Contreras-Cubas y col., 2012). Por ejemplo: se ha sugerido que miR393 es uno de los miRNA con expresión diferencial ante la respuesta al estrés en plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* (Sunkar y Zhu, 2004; Zhao y col., 2007; Arenas-Huertero y col., 2009; Trindade y col., 2010). MiR393 regula al mRNA de genes *TAAR* (*TIR1/AFB2 Auxin Receptor*) los cuales son importantes en diferentes programas de desarrollo y en respuestas ambientales ya que se permiten de la degradación de los represores transcripcionales AUX/AAI de respuesta a auxina (Windels y col., 2014). Por otro lado, miRNAs de la familia miR169 responden diferencialmente a sequía, salinidad y bajas temperaturas; en arroz se ha observado que los miRNAs miembros de esta familia modulan la expresión del factor nuclear de transcripción *NF-YA* el cual responde al estrés por alta salinidad y sequía y se sabe que responde a ABA (Zhao y col., 2009). En *A. thaliana*, plantas KO *nf-ya* o sobre-expresoras de miR169 muestran más sensibilidad a la sequía (Li y col., 2008). Por el contrario, en tomates, la planta sobre-expresora de miR169c cuyo blanco está involucrado en la apertura y el cerrado de los estomas, resulta más tolerante a sequía (Zhang y col., 2011).

Durante la germinación de *A. thaliana* se reportó un aumento en la acumulación de miR159 bajo tratamiento con ABA y en condiciones limitantes de agua. Se sabe que este miRNA modula los niveles del transcrito de los factores de transcripción MYB33 y MYB101, que actúan como reguladores positivos de la respuesta a ABA (Reyes y Chua, 2007). En particular, en *M. truncatula* se ha observado la expresión diferencial de miR408 y de miR398 bajo condiciones de deficiencia de agua, ambos incrementan su acumulación tanto en la raíz como en la parte aérea. Dichos miRNAs regulan proteínas que se asocian a cobre, como COX5b (subunidad 5b de la citocromo oxidasa mitocondrial) y superóxido dismutasa CSD1, respectivamente. La regulación de estos genes por miR398a/b y miR408 sugiere una relación entre la homeostasis de cobre y la adaptación a un déficit progresivo de agua (Trindade y col., 2010).

Considerando la evidencia anterior nosotros creemos que es importante caracterizar la participación de los miRNAs en la respuesta a la deficiencia de agua ya que en el contexto actual la baja disponibilidad de agua es uno de los problemas que impacta con mayor fuerza el crecimiento óptimo de las plantas.

1.3. Las plantas leguminosas

Con más de 18,000 especies, la familia de las leguminosas conocidas como Leguminosae o Fabaceae figura como la tercera familia más grande de plantas superiores y la segunda más cultivada. Esta familia se caracteriza por la capacidad de formar relaciones simbióticas con bacterias de la familia *Rhizobiaceae* fijando así nitrógeno atmosférico, lo cual convierte a las leguminosas en organismos importantes en la biósfera y en sistemas de agricultura. Además, las leguminosas constituyen la principal fuente de proteína en la dieta humana en países latinoamericanos y africanos (Young 2003).

1.3.1. *Medicago truncatula*

Originaria del Mediterráneo y comúnmente conocida como barretón, *Medicago truncatula* es una planta adaptada a condiciones semiáridas con suelos alcalino-arcillosos. Esta planta es ampliamente utilizada en el sur Australiano en la rotación de cultivos (Rose 2008). Esta leguminosa cuenta con un ciclo de vida corto de entre 7 y 10 semanas dependiendo de las condiciones ambientales y es de naturaleza autógena, con una alta producción de semillas.

En el campo de la biología molecular *M. truncatula* ha destacado debido a su diploidia ($2n=16$), su genoma pequeño (Jean-Michel 2008), y su alta capacidad de regeneración (Barker y col., 1990), un fenómeno relativamente extraño entre las leguminosas que ha sido aprovechado por los biólogos moleculares para obtener plantas transgénicas (Boisson-Dernier y col. 2001). Además ha sido utilizada para generar raíces transformadas con el uso de *Agrobacterium rhizogenes* capaces de formar nódulos después de la inoculación con *Sinorhizobium meliloti* y de igual forma pueden ser colonizadas por hongos formadores de micorrizas arbusculares (AM), lo cual ha sido de gran ayuda para la investigación de fenómenos de simbiosis. Enfoques mutagénicos utilizando etil-metil-sulfonato (EMS), rayos gamma, bombardeo rápido con neutrones, T-DNA y el retrovirus de tabaco Tnt1, han generado un banco de mutantes de *M. truncatula* afectadas en simbiosis o en vías de desarrollo que han sido utilizadas en estudios de genéticos (Ané y col. 2008; Pereira 2011). Lo anterior, aunado al hecho de contar con la secuencia de su genoma completo, hace de esta planta un modelo genético invaluable para el estudio molecular de múltiples fenómenos en plantas de la familia *Fabaceae*.

2. Antecedentes

Existen miRNAs altamente expresados en angiospermas que se encuentran claramente conservados. Muchos de ellos funcionan como reguladores de factores transcripcionales involucrados en el control del desarrollo. Así mismo, gran variedad de experimentos han descubierto un grupo de miRNAs que se expresan débilmente conocidos como miRNAs no-conservados ya que solo se conservan en familias específicas de plantas o en especie específicas (Axtell y Bowman, 2008). Este último grupo de miRNAs no-conservado ha provisto de ideas sobre los orígenes de los miRNAs y sus blancos, ya que son utilizados para realizar estudios de conservación con lo cual es posible rastrear la evolución de estos miRNAs. Además su caracterización funcional ha permitido elucidar nuevas estrategias adaptativas en las que estos sRNAs están involucrados.

Hasta hoy se han reportado menos de 20 miRNAs específicos de leguminosas presentes en diferentes plantas modelo de esta familia.(Figura 3)(Bustos-Sanmamed y col., 2013; Formey y col., 2015). La mayoría de ellos fueron encontrados gracias a la secuenciación masiva de RNAs pequeños, sin embargo, pocos de ellos han sido caracterizados funcionalmente. Es por ello que en nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar algunos de estos miRNAs y en particular su papel en la respuesta al estrés por déficit hídrico, lo cual podría revelar estrategias únicas de esta familia de plantas relacionadas con la respuesta a la baja disponibilidad de agua

	miR1507	miR1508	miR1509	miR1510	miR1512	miR1514	miR1520	miR1521	miR2086	miR2109	miR2119	miR2199
<i>Glycine max</i>												
<i>Phaseolus vulgaris</i>												
<i>Medicago truncatula</i>												
<i>Lotus japonicus</i>												

Figura 3. MiRNAs leguminosa-específicos

miRNAs(columnas) presentes en diferentes plantas de la familia leguminosas (filas). Los cuadros llenos indican presencia mientras que los vacíos ausencia. (Información obtenida de Bustos-Sanmamed y col., 2013; Formey y col., 2015).

Existen plantas cuyo estudio resulta de mayor interés para las actividades humanas. En particular, *Phaseolus vulgaris* o frijol común, es una planta cuyos cultivos son de gran

importancia en países en desarrollo, ya que representan una de las fuentes más importantes de proteínas. Tan solo la producción de esta especie satisface el 22% de las necesidades totales de proteínas en todo el mundo (Kwapata y col., 2012). Es por ello que en nuestro grupo de trabajo se tiene un interés particular en la identificación y caracterización de miRNAs de *P. vulgaris* con el fin de descubrir las diferentes estrategias que utiliza esta leguminosa para hacer frente a diversas condiciones ambientales y en particular al déficit de agua.

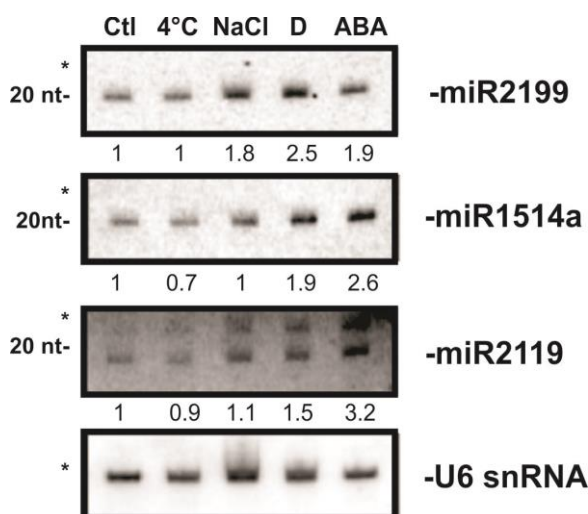


Figura 4. Acumulación de Pvu-miRNAs ante diferentes condiciones de estrés.

Plántulas de *P. vulgaris* de cuatro días de edad fueron expuestas a diferentes condiciones por 48 h: control, plantas irrigadas (Ctl), frío (4°C), NaCl (100 mM), sequía (D), y ABA (100 uM). RNA total (10 ug) de plántulas completas fue separado por PAGE 15% y usado para un análisis *Northern blot* utilizando sondas de oligonucleótidos específicas para cada miRNA. Las membranas fueron hibridizadas utilizando U6 snRNA como control de carga. La señal radioactiva se midió y se determinó la abundancia relativa de cada miRNA respecto al control normalizada por U6 snRNA (Modificado de Arenas-Huerta y col., 2009).

Mediante análisis de clonación-secuenciación y posteriormente por *Northern blot*, en nuestro laboratorio se logró identificar un nuevo grupo de miRNAs que presentan acumulación diferencial bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 4). Estos miRNAs solo fueron detectados en plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas (Arenas-Huerta y col., 2009) (Figura 5), concluyendo que existen miRNAs leguminosa-específicos. De este análisis se seleccionaron aquellos miRNAs cuyos patrones de expresión respondían a la deficiencia de agua en particular Pvu-miR1514, Pvu-miR2119 y Pvu-miR2199. Actualmente se realizan esfuerzos por caracterizar funcionalmente cada uno de estos miRNAs en *P. vulgaris*.

En frijol se sabe que Pvu-miR1514 es inducido en respuesta al estrés por sequía. Mediante el análisis de degradoma se encontró que sus blancos de regulación son dos factores de transcripción de la familia NAC (NAM, ATAF1,2 CUC2). Evidencia de datos de secuenciación masiva en frijol sugiere que este miRNA podría estar mediando un tipo de regulación post-transcripcional sobre sus blancos promoviendo la generación de

phasiRNAs derivados de estos mismos blancos (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, datos no publicados).

Por otro lado Pvu-miR2199 resulta un miRNA peculiar ya que en frijol se encontró que este miRNA tiene un probable segundo sitio de unión con su blanco confirmado por corte, dicho blanco codifica para un factor de transcripción bHLH (*basic Helix Loop Helix*). Esto constituye una característica interesante ya que el segundo sitio de unión conserva varios desapareamientos lo que podría señalar que la regulación sobre este sitio esta dado por la represión de la traducción del mensajero blanco, lo que resultaría en dos modos de regulación de un mismo blanco mediado por un miRNA (Velarde-Garduño 2012).

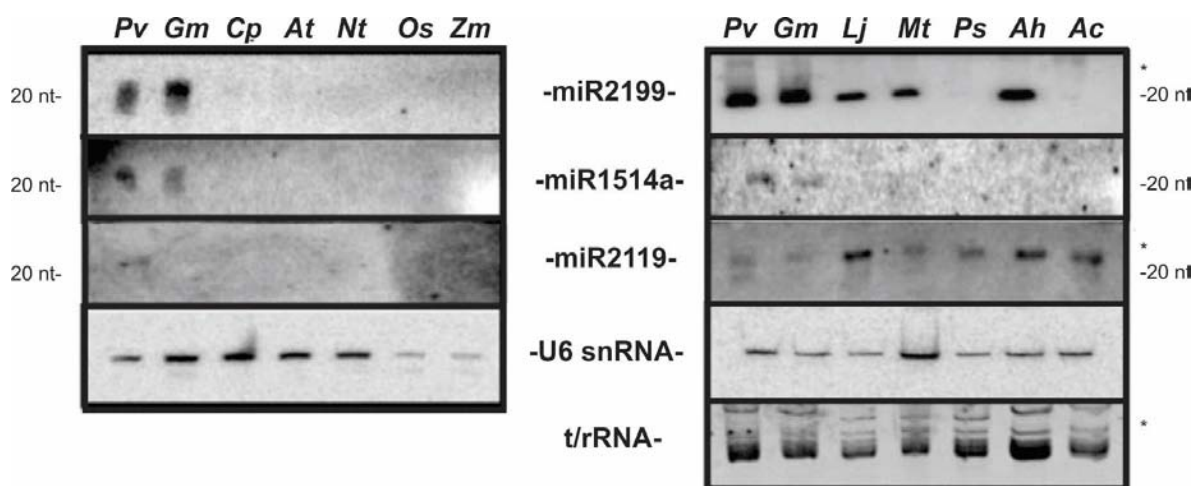


Figura 5. Presencia de miRNAs de *P. vulgaris* en plantas de otras especies.

Northern blot realizado para detección de Pvu-miRNAs utilizando sondas anti-sentido para Pvu-miR2199, Pvu-miR1514a y Pvu-miR2119. Izquierda: a) plántulas de *Phaseolus vulgaris* (Pv), *Glycine max* (Gm), *Cucurbita pepo* (Cp), *Arabidopsis thaliana* (At), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm). Derecha: plántulas de diferentes especies de leguminosas: *P. vulgaris* (Pv), *G. max* (Gm), *Lotus japonicus* (LJ), *M. truncatula* (Mt), *Pisum sativum* (Ps), *Arachis hypogaea* (Ah), *Acacia cochliacantha* (Ac). La hibridación con U6 snRNA se utilizó como controles de carga de RNA. Las muestras marcadas con un asterisco (*) simbolizan que la detección de tRNA y rRNA (t/rRNA) se realizó con bromuro de etidio como controles de carga de RNA. (Modificado de Arenas-Huertero y col. 2009).

Para Pvu-miR2119 se encontró que este miRNA funcional muestra patrones de acumulación que varían en función de la deficiencia de agua en esta planta. Lo que resulta más interesante de este miRNA es que se encuentra codificado en un mismo precursor bisistrónico que también contiene a miR398a, que es un miRNA conservado. Además se sabe que los miRNAs maduros de este precursor policistrónico Pvu-miR398a y Pvu-miR2119 regulan a dos blancos diferentes, los transcritos para Superóxido dismutasa 1 (CSD1) y Alcohol Deshidrogenasa 1 (ADH1) respectivamente (De la Rosa-Urena 2012).

3. Justificación

El marco metodológico para la caracterización de los miRNAs de interés en *P. vulgaris* muchas veces implica el uso de estrategias transgénicas en donde pueda modularse directa o indirectamente la actividad del miRNA. Se han propuesto diversas estrategias experimentales cuyo objetivo es controlar la expresión de miRNAs maduros. Para ello se generan construcciones donde la transcripción del precursor de un miRNA de interés (pre-miRNA o MIRNA) es controlada por promotores como 35S el cual es un promotor viral fuerte y constitutivo, resultando la sobre-expresión del miRNA maduro en todos los órganos y estadios de desarrollo de la planta. También puede utilizarse promotores específicos de genes, resultando en un patrón de expresión gen-específica. Por otro lado, la actividad del miRNA puede ser inhibida directa o indirectamente por metodologías novedosas como la generación de construcciones de blancos miRNA-resistentes y blancos miRNA-mimetizadores (Chen M. y col., 2010).

Los blancos miRNAs-resistentes se basan en el hecho de que un miRNA media el corte sobre sus blancos en función de la alta complementariedad entre su secuencia nucleotídica y la del sitio donde aparece con el transcrito de su blanco. Por lo tanto, una mutación silenciosa (mutación donde la secuencia de la proteína no es modificada) puede ser introducida por PCR en el sitio de apareamiento con el blanco, lo cual interrumpirá el sitio específico de reconocimiento con su miRNA. El fenotipo resultante por el cambio de expresión producido por el blanco miRNA-resistente puede ser analizado mediante diversos procedimientos (Palatnik y col., 2003; Mallory y col., 2004; Wang y col., 2005).

La construcción de blancos miRNA-resistentes fue reportada por Franco-Zorrilla y col. en 2007, ellos diseñaron una vía para la represión de miRNAs maduros. La región media del sitio de reconocimiento del blanco, normalmente 10-11 nt desde el extremo 5' del miRNA, es crítica para el corte guiado de AGO1. Por lo tanto, el diseño de un transcrito blanco cuyo sitio de reconocimiento por un miRNA contenga en su secuencia una complementariedad perfecta excepto por la zona media puede ser reconocida por un miRNA de interés, promoviendo el mecanismo de inhibición de la traducción donde el corte no es efectuado por AGO1. Finalmente, el miRNA o incluso sus homólogos serán secuestrados por un

pseudo-blanco. Es importante mencionar que el nivel de represión depende de diferentes factores como las características de la secuencia del pseudo blanco y los niveles de acumulación *in vivo* de los “verdaderos” transcritos blanco del miRNA que se quiere silenciar (Chen M. y col., 2010).

La adaptación de metodologías transgénicas no se ha logrado con total éxito en *P. vulgaris*. Para transformar frijol se han utilizado diversos métodos, siendo el más utilizado el mediado por *Agrobacterium rhizogenes* para obtener raíces pilosas, no obstante, se obtienen bajas eficiencias de transformación, esto sin considerar la dificultad de la regeneración de la planta y la interpretación de los resultados (Kwapata y col., 2012). Por lo anterior, en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto el uso de plantas modelo de la familia *Fabaceae* para la caracterización de los miRNAs, siendo *M. truncatula* el mejor candidato no solo por su relativa facilidad de transformación y de regeneración, sino por contar con numerosas herramientas que permiten hacer una exploración más amplia de los miRNAs de interés, y además, considerando que esta planta guarda una relativa cercanía filogenética con *P. vulgaris* comparada con otros sistemas modelo como *A. thaliana*.

En *M. truncatula* la mayoría de los reportes relacionados con miRNA se han enfocado en el análisis de estas moléculas y de la interacción de plantas con organismos simbiotes como *Glomus intraradices* (Devers y col., 2011) o rizobia (Boualem y col., 2008; Reynoso y col., 2012); mientras que la relación de los miRNAs con factores abióticos, y específicamente los desencadenados por el estrés por déficit de agua, es un área poco explorada. Los reportes que describen la relación entre miRNAs y la respuestas a déficit hídrico se han enfocado principalmente a la detección de estas moléculas por técnicas de secuenciación masiva (Wang y col., 2011; Long y col., 2014) y predicción de blancos por vías bioinformáticas. Al presente existe solo un reporte de caracterización de miRNAs y su relación con el estrés por déficit hídrico en *M. truncatula*, aunque cabe mencionar que el enfoque usado fue sobre miRNAs conservados (Trindade y col., 2009). Por lo anterior, consideramos que el uso de *M. truncatula* para la caracterización de miRNAs específicos en leguminosas como miR1514, miR2119 y miR2199 puede representar un campo interesante en el estudio de miRNAs leguminosa-específico en la respuesta a déficit de agua.

4. Hipótesis

- Existen miRNAs específicos de leguminosas (Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199) que responden al déficit hídrico en *Medicago truncatula*.

5. Objetivos

5.1. General

- Probar si existe una relación entre la acumulación de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 y la deficiencia de agua en *M. truncatula*

5.2. Particulares

- Realizar un análisis de los miRNAs específicos de leguminosas de interés (Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199) así como sus blancos de regulación en bases de datos y servidores de análisis en la red.
- Definir condiciones de déficit hídrico en *M. truncatula*.
- Analizar los patrones de acumulación de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 y sus blancos en condiciones de deficiencia de agua en *M. truncatula*.
- Establecer la metodología para la transformación transitoria en hojas de *M. truncatula*.

6. Materiales y métodos

6.1. Análisis en bases de datos y servidores de análisis

Se realizó una búsqueda de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en la base de datos miRBase Ver. 21.0, [Kozomara y Griffiths-Jones, 2013 (www.mirbase.org)] con el propósito de saber si estos han sido previamente reportados en *M. truncatula*.

Utilizando el servidor psRNATarget [Xinbin 2011 (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>)] se identificaron los blancos probables de cada uno de los miRNAs en la biblioteca de transcritos de *M. truncatula* Mt 4.0v1 de transcritos con splicing. Se reportaron los blancos con mejores puntuaciones.

Para Mtr-miR1514, que no se ha reportado en la base de datos miRBase, se buscó la secuencia del probable precursor en el portal de Genómica Comparativa en Plantas Phytozome 10.3 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>). Se realizó un análisis para predecir la estructura secundaria probable del precursor usando el servidor RNA Folding (Zuker 2003, <http://unafold.rna.albany.edu/>), se usaron los parámetros que aparecen por defecto en el servidor. Además se buscó evidencia de su acumulación en bases de datos de RNAs pequeños de *M. truncatula* [Nakano 2006 (NAR 34 (Database issue):D731-5)].

En el caso particular de Mtr-miR1514 se realizó un análisis sobre el blanco putativo con el fin de encontrar evidencias de regulación por corte mediadas por el miRNA utilizando bases de datos de degradoma o PARE. Finalmente se buscó evidencia de la acumulación de sRNAs secundarios derivados del transcrito blanco de miR1514 mediante “*Phasing Analysis*” [Nakano 2006 (<http://mpss.udel.edu/>)].

6.2. Germinación

Semillas de *M. truncatula* cv. Jemalong 17 se escarificaron sumergiéndose en ácido sulfúrico anhidro concentrado con agitación intermitente, la escarificación se detuvo hasta la aparición de pequeños puntos negros en la testa de las semillas (aproximadamente 8

min). Las semillas se enjuagaron tres veces con agua MQ estéril y finalmente se aseptizaron con una solución de cloro comercial al 20% durante 180 s, el cloro se eliminó realizando cinco lavados con agua estéril, este último paso se llevó a cabo bajo condiciones asépticas. (Modificado de *Medicago truncatula* Handbook, 2006). Las semillas asépticas se sembraron en cajas Petri con agar al 0.8% con medio Fahraeus (Anexo B), se incubaron durante 3 días a 4 °C en oscuridad con el fin de estratificarlas. Posteriormente, las semillas en las cajas se germinaron en una cámara de crecimiento (termo-periodo de 25/18°C día/noche y una humedad relativa de aprox. 40%) manteniéndose en condiciones de oscuridad cubriendo las cajas Petri que contenían las semillas con papel aluminio.

6.3. Crecimiento de plántulas de *Medicago truncatula* en condiciones de estrés osmótico y salino

Plántulas de *M. truncatula* de un día de edad germinadas con luz en posición vertical en una cámara de crecimiento (termo-periodo de 25/18°C día/noche, humedad relativa de aprox. 40%, foto-periodo de 16/8 h día/noche) fueron transferidas a cajas Petri con agar al 0.8% adicionadas con medio Fahraeus y complementadas con 150 o 200 mM de manitol e incubadas durante 3 días o con 150 y 250 mM de NaCl durante 48 h, las plántulas control se mantuvieron bajo las mismas condiciones de germinación. Se monitoreó el crecimiento de la raíz primaria de las plántulas utilizando el software *ImageJ 1.49v* para obtener resultados para gráficas de las cinéticas de crecimiento. Las plántulas sin cotiledones en condiciones control (Fahraerus sin NaCl) y estresadas (Fahraerus con 150 mM o 200 mM de NaCl) fueron colectadas diariamente durante los días de la cinéticas para la cuantificación de miRNAs.

6.4. Crecimiento de plantas adultas de *Medicago truncatula* en condiciones de estrés por sequía

Plántulas de dos días de edad se sembraron de forma individual en macetas de 3.25" por 3.25" y una altura de 3.5" que contenían *Turface® Quick Dry®*, el cual fue previamente humedecido hasta su capacidad máxima y esterilizado por calor húmedo. Las plantas se cultivaron bajo condiciones controladas de crecimiento (termo-periodo de 25/18°C día/noche, una humedad relativa de aprox. 40%, y foto-periodo de 16/8 h día/noche). Durante 21 días fueron regadas periódicamente con solución nutritiva Fahraeus, de forma

que se mantuviera un volumen constante de la solución en las charolas que contenían a las macetas. El estrés hídrico se indujo cumplidas las 3 semanas de edad; el estrés se provocó dejando de regar por un período de 9 u 11 días. Al mismo tiempo, plantas control fueron irrigadas con agua manteniéndose el volumen constante en las charolas. Se tomaron muestras de hoja (trifolio más viejo) y de raíz completa a distintos tiempos (0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 11 días). Para la cuantificación de los miRNAs y sus blancos. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes del experimento, donde en cada réplica se tenía un n=3 por cada tiempo y condición de muestreo.

6.4.1. Determinación del contenido relativo de agua en plantas

Se tomó el foliolo central del segundo trifolio más viejo de la planta, el foliolo colectado fue pesado inmediatamente después de haber sido colectado, éste peso es considerado el peso fresco (P_f). Posteriormente el foliolo fue colocado en una superficie de agua en donde el lado abaxial se mantuvo en contacto con el líquido para permitir la absorción del mismo. El foliolo se incubó por 48 horas para obtener su peso turgente (P_t). Finalmente el foliolo se secó en un horno a 60 °C por 3 días para así obtener el peso seco (P_s). El porcentaje del contenido relativo de agua se obtuvo a partir de la siguiente relación:

$$\%RWC = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} * 100$$

6.4.2. Monitoreo de la humedad del sustrato

Con el fin de conocer la humedad del sustrato durante el experimento de sequía, macetas con *Turface* que no contenían plantas fueron sometidas al mismo tratamiento de sequía que aquellas macetas que si contenían plantas, esto con el fin de cuantificar la pérdida de agua del sustrato provocada por el ambiente. Se registró el peso P_x de las macetas durante el tratamiento de sequía (0, 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 11 días) y sin tratamiento (sustrato-control). Finalmente, se calculó su contenido de agua durante el experimento considerando que el peso de la maceta a su capacidad máxima es el peso inicial en el día cero, el contenido de humedad se calculo utilizando la siguiente relación:

$$\%RWC = \frac{P_x - P_{seco}}{P_{capacidad\ máxima} - P_{seco}} * 100$$

Dicha determinación se realizó paralelamente con cada réplica biológica independiente realizada con 3 macetas para cada condición.

6.4.3. Determinación de la osmolalidad en hojas

Se colectó el tercer trifolio más viejo de la planta y se colocó en un tubo eppendorf de 0.5 ml perforado en la parte inferior. La muestra se sometió a cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, para ello, el tubo que contenía a los trifolios se mantuvo en nitrógeno líquido por 1 min, posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez realizados los cinco ciclos, la muestra se colocó en un tubo de 1.5 mL para centrifugarse a velocidad máxima por 20 minutos. De esta forma se colectó una suspensión resultado de la ruptura del tejido de los trifolios. Se determinó la osmolalidad de la solución obtenida utilizando un osmómetro (Vapro 5600 EliTechGroup, Princeton, N.J.) según las especificaciones del fabricante.

6.5. Análisis de miRNAs y blancos de leguminosas en *M. truncatula*

Tejidos de hoja y raíz de plantas adultas de 21 días de edad, flores colectadas de plantas de 3 meses de edad, plántulas de un día de edad germinadas en oscuridad se usaron para la extracción de RNA total utilizando el agente químico Trizol (Invitrogen, Carlsbad, N.J.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración final e integridad del RNA obtenido se confirmó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y por electroforesis/Bioanalyzer. El RNA de cada muestra se utilizó para cuantificar la acumulación relativa de los miRNAs por *Northern blot* y RT-qPCR y los blancos probables por RT-qPCR.

6.5.1. Determinación y cuantificación de miRNAs

La detección eficiente y confiable de los miRNAs es un paso esencial en el entendimiento de su participación en diferentes procesos celulares. Para estos fines se han desarrollado técnicas tales como la clonación, la hibridación de RNA por *Northern blot* convencional o paquetes comerciales, como *mirVana™ miRNA Detection Kit* y el análisis por microarreglos

(Shi y Chiang, 2005). Sin embargo, estos ensayos resultan restringidos en términos de su alcance, sensibilidad y/o especificidad. Considerando que hoy en día los estudios de secuenciación masiva revelan complejas poblaciones de RNAs pequeños en plantas y otros organismos (Varkonyi-Gasic y col., 2007), la detección y cuantificación de miRNAs poco abundantes o miRNAs que difieren en unos cuantos nucleótidos resulta casi imposible utilizando estos métodos. Con el fin de superar el limitado alcance de las tecnologías convencionales se ha utilizado la transcripción reversa aunada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR por sus siglas en inglés) también conocida como PCR en tiempo real, la cual actualmente es considerada como el ensayo por excelencia de medición de abundancia de transcritos, incluyendo RNAs pequeños, debido a su precisión, sensibilidad y rápida obtención de resultados. Cabe resaltar que aunque la técnica de qPCR aparentemente es una metodología sencilla, se deben de tener un entendimiento pleno de esta técnica, ya que cualquier usuario inexperimentado es capaz de producir rápidamente resultados sin el cuidado de realizar el flujo de trabajo adecuado lo cual impide la obtención de datos y de conclusiones confiables (Derveaux y col., 2010).

La técnica RT-qPCR ha sido utilizada exitosamente en la medición de la acumulación de genes que codifican para proteínas o transcritos largos, sin embargo, debido a su pequeño tamaño, la cuantificación de miRNAs y otros sRNAs resulta técnicamente complicada, por lo que se han optimizado métodos para la cuantificación específica de estas moléculas como lo es el uso de oligonucleótidos tipo tallo-asa (*stem-loop*). Además comercialmente existen paquetes especializados como *NCode™ First Strand cDNA Synthesis Kit*, basado en la poliadenilación de RNAs pequeños y su posterior conversión en cDNA utilizando un oligonucleótido de oligo-dT. Con lo anterior se entiende que a pesar de que existan métodos para la cuantificación de miRNAs, es importante estandarizar y optimizar los ensayos de determinación y cuantificaciones específicos para los objetivos establecidos.

6.5.2. Cuantificación de miRNAs por Northern blot

Se utilizó el método reportado por Contreras-Cubas y col. en 2013. Las secuencias de las sondas utilizadas se encuentran en el Anexo A, Tabla 1.

6.5.3. Obtención de cDNA de miRNAs

A partir de 1 µg del RNA extraído de cada muestra de tejido colectado se sintetizó cDNA utilizando el método de síntesis Multiplex de cDNA de miRNAs por *stem-loop* (modificado de Axtell, comunicación personal, ver Anexo C). Para el diseño de los oligonucleótidos de los miRNAs se consideraron las especificaciones de Varkonyi-Gasic y col. en el 2007. Los oligonucleótidos RT de los miRNAs y el gen de referencia U6 snRNA se muestran en el Anexo A, Tabla 1.

6.5.4. Obtención de cDNA de blancos

A partir de 200 ng de RNA total, previamente tratado con DNAsa I (*Thermo Scientific*), se obtuvo el cDNA de los blancos putativos de los miRNAs. Se utilizó el método convencional en donde se utiliza oligo-dT para la reacción de transcripción reversa. Para ello, se utilizó a la enzima *RevertAid* (*Thermo Scientific*) según las especificaciones del fabricante.

6.5.5. Cuantificación por PCR cuantitativa

El ensayo se realizó en un equipo *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems*, el paquete utilizado fue *Maxima SYBR Green/Rox* (*Thermo Scientific*). La concentración final de los oligonucleótidos para miRNAs fue de 200 nM, mientras que para los blancos la concentración final de oligonucleótidos fue de 300 nM. Se utilizó 1.5 µl del cDNA en un volumen final de reacción de 15 µl.

La corrida de amplificación consta de los siguientes pasos:

Paso 1: 95°C por 10 min

Paso 2: 95°C por 5 seg para miRNAs y 15 seg para blancos

Paso 3: Temperatura de amplificación** por 10 seg para miRNAs y por 30 seg para blancos

Paso 4: se va del Paso 2 al Paso 3 40 veces

Paso 5: 95°C por 15 seg para miRNAs y 30 seg para blancos

**La temperatura de amplificación se especifica en la Tabla 5, Anexo A.

El gradiente de temperaturas utilizado para realizar las curvas de disociación fue de 60°C a 95°C, realizando aumentos de 0.2°C para los miRNAs y de 0.5°C para blancos. Se debe

obtener solo un pico en la curva de disociación lo cual indica la amplificación de un solo miRNAs o transcrito blanco.

Para cada transcrito blanco o miRNA que se amplificó se obtuvo una curva de eficiencia realizando diluciones seriales del cDNA obtenido, la eficiencia y las especificaciones de las curvas obtenidas se encuentran en la Tabla 5, Anexo A.

El control de carga o gen de referencia para la normalización de miRNAs fue U6 snRNA, los oligonucleótidos de los miRNAs y del gen de referencia se muestran en el Anexo A, Tabla 1 y 2.

Para la normalización de los genes blancos de miR2199 (Medtr7g080780 y Medtr4g009540) se probaron tres transcritos de genes diferentes: el factor de iniciación de la elongación eIFα (Medtr4g019170), el transcrito de la enzima gliceraldehído deshidrogenas mtr-GADPH (Medtr3g085850) y el gen de ubiquitina mtr-UBQ (Medtr3g091400), sin embargo en nuestras condiciones de trabajo solo el mtr-UBQ se mantenía estable por lo que es el que se utilizó para la normalización. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 4, Anexo A.

La medición de la expresión relativa de los miRNAs y blancos se obtuvo utilizando el método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Para aquellos genes en donde los oligonucleótidos no tienen el 100% de eficiencia en su amplificación se utilizó la siguiente fórmula para la corrección de la acumulación relativa (<http://blog.mcbryan.co.uk/2013/06/qpcr-normalisation.html>).

$$RE = \frac{Ef (Gen)^{C_T (Gen,un) - C_T (Gen,tra)}}{Ef (ReGen)^{C_T (ReGen,un) - C_T (ReGen,tra)}}$$

En donde:

RE= Expresión relativa del gen

Ef= $10^{-1/\text{pendiente de la curva de eficiencia}}$

Gen= Gen o miRNA a cuantificar

ReGen= Gen o miRNA de referencia o control interno

C_T= Ciclo umbral

un= muestra sin tratamiento

tra= muestra con tratamiento

6.6. Expresión transitoria en hojas de *Medicago truncatula*

6.6.1. Amplificación del precursor de pre-MIR398a-2119

Se diseñaron oligonucleótidos capaces de amplificar el precursor putativo del miRNA (Ver Anexo A, Tabla 4) a partir de DNA genómico, para ello se realizó un alineamiento de la secuencia del precursor de Mtr-miR398a-2119 reportado en miRBase con el genoma de *M. truncatula* 4.0 V1. Se encontró que la secuencia de este probable precursor se encuentra en el cromosoma 5 en la siguiente posición chr5 chr5:19179531..19181346 (-strand).

El amplicón resultante se separó en un gel de agarosa al 1% y se purificó con el paquete comercial *Gene Jet Gel Extraction Kit* (de *Thermo Scientific*). Una vez obtenido el producto purificado, éste se clonó en el vector pENTR™/SD/D-TOPO® (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante para generar el plásmido pENTR-pre-mtr-miR398a-miR2119.

6.6.2. Transformación de células quimio-competentes de *Escherichia coli*

Se transformaron 50 µl de un cultivo saturado de células quimio-competentes de *E. coli* DH5α donadas por Rendon D. del laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias, Instituto de Biotecnología, UNAM. Para ello, las células se dejaron reposar en hielo durante 20 min. Posteriormente, se agregó el total de la reacción de clonación (5 µl). Las células se sometieron a 2 ciclos de choque térmico para permitir que el plásmido clonado con el precursor se introdujera en las células. Cada ciclo consiste en someter a la suspensión celular a una temperatura de 42 °C por un min e inmediatamente enfriar en hielo durante 1 min. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB líquido al cultivo y se incubó la muestra durante 1 h a 37 °C con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó 1 min a 12000 X g, se eliminaron 850 µl del sobrenadante y las células suspendidas en el resto del volumen se sembraron en una caja Petri con LB sólido con kanamicina (25 µg mL⁻¹) como agente de selección. Este cultivo se incubó a 37 °C durante toda la noche.

6.6.3. Extracción del DNA plasmídico

Se inocularon 3 ml de medio LB suplementado con kanamicina ($25 \mu\text{g m}^{-1}$) con las colonias de *E. coli* que por PCR de colonia se confirmó contenían el plásmido de interés. Las bacterias se cultivaron a 37°C con agitación constante durante toda la noche. Se extrajo el plásmido con el paquete comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific)*. La identidad del inserto de interés fue confirmada por secuencia (Unidad de Secuenciación, IBT, UNAM).

6.6.4. Recombinación del plásmido

Se utilizó el protocolo de recombinación del sistema *Gateway*® con la enzima LR Clonasa según las especificaciones del fabricante para transferir el inserto de interés que se encontraba en el vector pENTR al vector destino pB7WGD2 (Karimi 2002), el cual contiene sitios de recombinación para insertar el el fragmento de interés por recombinación bajo el promotor 35S y al gen reportero a GFP bajo el promotor de *proID* (ver esquema en el Anexo D, FiguraC). De esta forma se obtuvo el plásmido que denominamos pB7WG2D pre-mtr-miR398a-miR2119.

6.6.5. Transformación de células quimio-competente de *Agrobacterium tumefaciens*

Se adicionó $1 \mu\text{g}$ del DNA plasmídico de interés a células de *A. tumefaciens* quimio-competentes C58G donadas por Solorsano R. del laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias, Instituto de Biotecnología, UNAM. Las bacterias se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente ser descongeladas a 37°C por 3-5 min. Una vez realizado este choque térmico, las células se incubaron por 1 min en hielo. Las células se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubaron por 2 h a 28°C . Posteriormente, se sembraron en cajas con medio sólido LB y espectinomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), rifampicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubaron por 3 días a 28°C .

6.6.6. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Se seleccionó la colonia en la que por PCR de colonia se confirmó la presencia del plásmido de interés. La colonia fue inoculada en 2.5 ml de LB suplementado con espectinomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y rifampicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), se cultivó a 28°C por 48 h en agitación constante.

Se tomó 1 ml del cultivo para inocular 15 ml de medio LB líquido con 10 mM de MES pH 5.6 y 20 µl de acetosiringona 100 µM. Las bacterias se cultivaron a 28 °C durante 16 h en agitación. Cuando se alcanzó una O.D. 600 1.0 las bacterias se recuperaron por centrifugación (4000 rpm, 10 min) y el *pellet* fue resuspendido en 15 mL de una solución 10 mM de MgCl₂, al cual se adicionó 75 µl de acetosiringona 100 µM y se mantuvo a temperatura ambiente por al menos 3 horas.

6.6.7. Agro-infiltración de *Medicago truncatula*

Utilizando una jeringa de insulina sin aguja, la suspensión celular de *A. tumefaciens* que contenían la construcción molecular de interés se infiltró por el lado abaxial de la hoja de plantas de *M. truncatula* de 3-4 semanas de edad. Finalmente se colectó el tejido a los 2 días para determinar la expresión del precursor y el gen repotero GFP mediante PCR punto final.

6.6.8. Amplificación del transcrito exógeno del MIR398a-2119 de hojas agro-infiltradas de *M. truncatula*

Se obtuvo RNA de las hojas agro-infiltradas con la suspensión de *A. tumefaciens* transformadas con el vector vacío pB7WG2D y el vector pB7WG2D que contiene el casete de sobre-expresión del precursor policistrónico MIR398a-2119. Para la extracción del RNA se utilizó Trizol (Invitrogen, Carlsbad, N.J.) según las especificaciones del fabricante.

A partir de 200 ng de RNA total, previamente tratado con DNAsa I (*Thermo Scientific*), se obtuvo el cDNA de los de las hojas agro-infiltradas de *M. truncatula*. Se utilizó oligo-Random para la reacción de transcripción reversa. La reacción fue catalizada por la enzima *RevertAid* (*Thermo Scientific*) según las especificaciones del fabricante.

El cDNA obtenido se utilizó como templado para la amplificación del transcrito EgfpER los oligonucleótidos utilizados para la reacción de amplificación por PCR se encuentran en la Tabla 4 del Anexo A, el amplicón esperado es de 153 pb. El precursor exógeno MIR398a-2119 se amplificó utilizando un oligonucleótido sentido que alinea específicamente con una secuencia interna del inserto, mientras que el oligonucleótido reverso aparea con una región que se encuentra en el extremo 3' MIR398a-2119 se espera un amplicón de 556 pb.

7. Resultados

7.1. Los miRNAs de *P. vulgaris* que responden a déficit hídrico se encuentran en *M. truncatula* y se predicen blancos homólogos

Arenas-Huertero y col. en 2009 reportaron miRNAs presentes en *Phaseolus vulgaris* relacionados con la respuesta al estrés por deficiencia de agua, de los cuales miR1514, miR2119 y miR2199 (Figura 6) fueron detectados únicamente en plantas pertenecientes a la familia *Fabaceae*. En el presente trabajo consideramos que el uso de *M. truncatula* permitirá ampliar el estudio de la función de estos RNAs pequeños. Por lo anterior, se realizó una búsqueda de los miRNAs en bases de datos de RNAs pequeños de *M. truncatula*, además se utilizó como referencia la base de datos miRBase Ver. 21.0, (www.mirbase.org). Descubrimos así que Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 habían sido reportados previamente en bibliotecas de RNAs pequeños de *M. truncatula* (Jagadeeswaran y col. 2009) (Figura 6b).

Los blancos de los miRNAs (Figura 6) se identificaron utilizando psRNATarget el cual realiza el análisis de blancos de RNAs pequeños, este servidor cuenta con dos funciones de análisis: 1) el apareamiento reverso complementario entre el miRNA y el transcrito blanco utilizando un esquema de puntuación demostrado, 2) la accesibilidad del sitio de apareamiento con el blanco mediante la evaluación de la energía de desapareamiento requerida para abrir la estructura secundaria alrededor del sitio de reconocimiento del miRNA y 3) distingue regulación por inhibición de la traducción o corte sobre el transcrito blanco (Xinbin y col., 2011). En la Figura 6 se muestran los blancos dados por el servidor con las mejores puntuaciones para los tres miRNAs, en este análisis se utilizó la biblioteca de transcritos de *M. truncatula* Mt 4.0v1 de transcritos con splicing. El transcrito blanco probable de Mtr-miR2119 codifica para una enzima clasificada como Alcohol deshidrogenasa (Medtr3g089970.1) (Figura 6b), dato que coincide con el previamente reportado por Devers y col. en 2011 en un análisis de degradoma de micorrizas de *M. truncatula*. De igual forma, el mismo blanco se encontró para Pvu-miR2119 en frijol (De la Rosa-Urena 2012). En el trabajo de Devers y col. se reportó que Mtr-miR2199 tiene como blancos dos factores transcripcionales bHLH (basic/Helix-Loop-Helix) (Medtr04g09540)

que pertenecen a una superfamilia de factores transcripcionales, uno de ellos fue predicho por el servidor (Figura 6c).

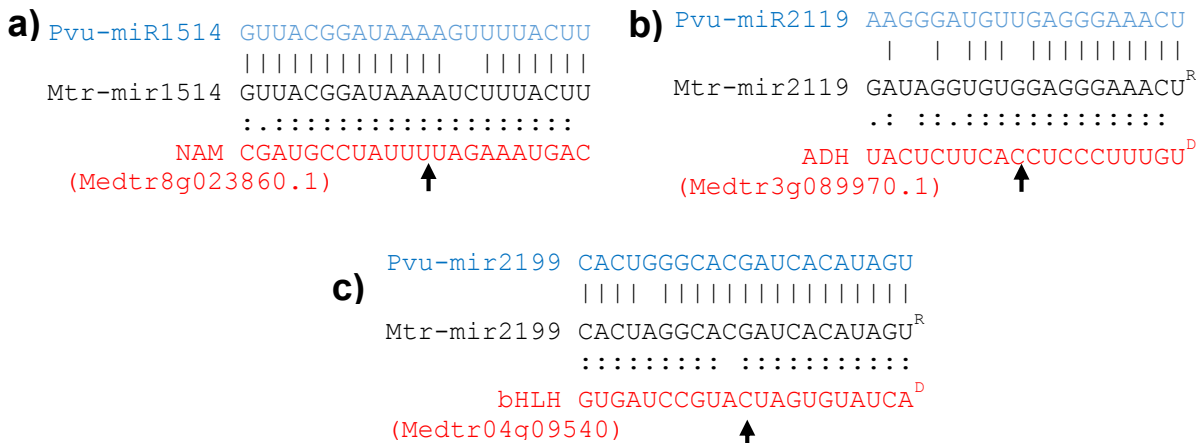


Figura 6. Alineamiento de miR1514, miR2119 y miR2199 de *P. vulgaris* y *M. truncatula*. Transcritos Blancos de miRNAs de *M. truncatula*.

Alineamiento de los miRNAs de *M. truncatula* (en negro) con los miRNAs de *P. vulgaris* (en azul), “|” indica identidad. Apareamiento de los miRNAs de *M. truncatula* con sus blancos probables (en rojo), “:” indica apareamiento. La flecha indica el lugar del corte mediado por AGO1 sobre los blancos de los miRNAs, el tipo de regulación fue predicha utilizando el servidor psRNATarget (Xinbin y col. 2011). Las secuencias de los miRNAs están dados en dirección 3’->5’, mientras que los blancos se encuentran en dirección 5’->3’. ^R indica que miR han sido previamente reportados (Jagadeeswaran y col. 2009). ^D Indica que el blanco ha sido reportado en un análisis de degradoma por Devers y col. en 2011.

MiR1514 no fue detectado previamente en el trabajo de Arenas-Huertero 2009 (Figura 5) probablemente porque se utilizó una sonda diseñada para Pvu-miR1514 en frijol. Nosotros hallamos evidencia en bases de datos de la presencia de Mtr-miR1514 en *M. truncatula* (Figura 7c). Es de mencionar que miR1514 solo había sido reportada en *P. vulgaris* y *Glycine max*. Utilizando el portal de Genómica Comparativa en Plantas Phytozome 10.3 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>), se encontró el precursor probable de Mtr-miR1514 es un EST (asembl_5372.medicagopmtv4_pasa3) que deriva de la región del cuarto cromosoma de *M. truncatula* (Figura 7a). Se predijo la estructura secundaria de dicho precursor probable para comprobar la existencia de la estructura tallo-asa (Figura 7b), lo cual es indicativo de que éste transcrito es candidato a ser un sustrato de DCL1. Para ello se utilizó el servidor mFold (Zuker 2003, <http://unafold.rna.albany.edu/>), y se comprobó que la estructura secundaria más probable del transcrito primario probable de Mtr-miR1514 forma el tallo-asa, donde el tallo contiene tanto la secuencia del miRNA como su secuencia del RNA complementaria el miR1514*. Además, fue posible encontrar evidencia de la presencia de este RNA pequeño en bases de datos de secuenciación masiva en 12 bibliotecas de RNAs pequeños obtenidas de diferentes condiciones de crecimiento, estadios de desarrollo

y mutantes de *M. truncatula* (Nakano 2006), donde la mayor abundancia de Mtr-miR1514 fue encontrada en hojas de *M. truncatula* (Figura 7c).

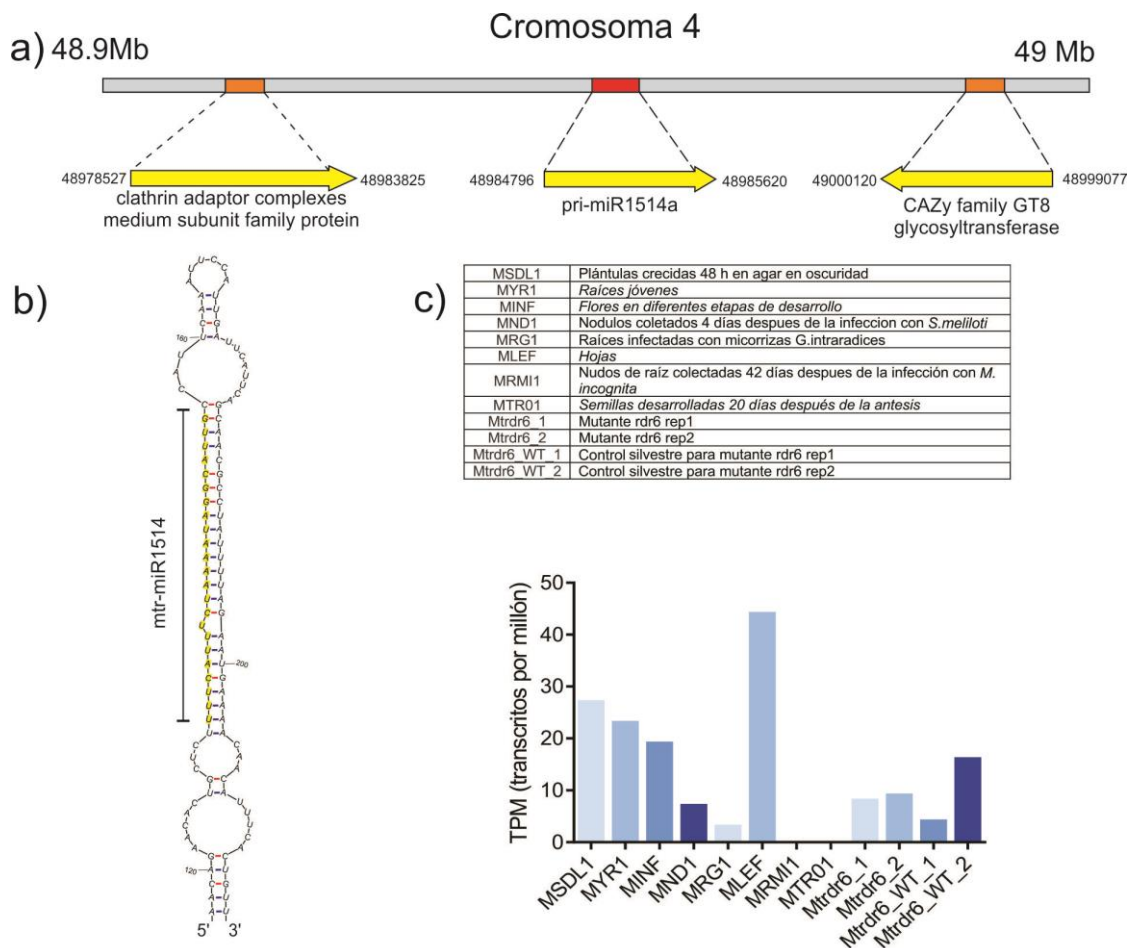


Figura 7. Mtr-miR1514 en *M. truncatula*

a) Localización del precursor de Mtr-miR1514 en el cuarto cromosoma de *M. truncatula*, en la figura se muestran los genes que flanquean al precursor. **b)** Estructura secundaria del precursor de Mtr-miR1514 de *M. truncatula* (predicha con el servidor mFold, Suker 2003). La secuencia de Mtr-miR1514 se muestra en amarillo. **c)** Lecturas de Mtr-miR1514 en bases de secuenciación masiva de RNAs pequeños de *M. truncatula* (Nakano 2006, MPSS).

Se predijo que el blanco de Mtr-miR1514 es un factor transcripcional de la familia NAC (Medtr8g023860.1) (Figura 6a) lo cual coincide con lo reportado para este miRNA en *P. vulgaris* (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, datos no publicados). Realizando un análisis de tres bibliotecas de degradoma o PARE de *M. truncatula* (Nakano 2006) se encontró que la etiqueta de corte más abundante, "TAGAAATGACAACATCATTG" (Figura 8a), coincide con la décima posición del apareamiento del gen blanco y Mtr-miR1514 (5'→3') (Figura 6a), sugiriendo que el miRNA es capaz de regular a este blanco por corte endonucleolítico de AGO1 (Figura 8b).

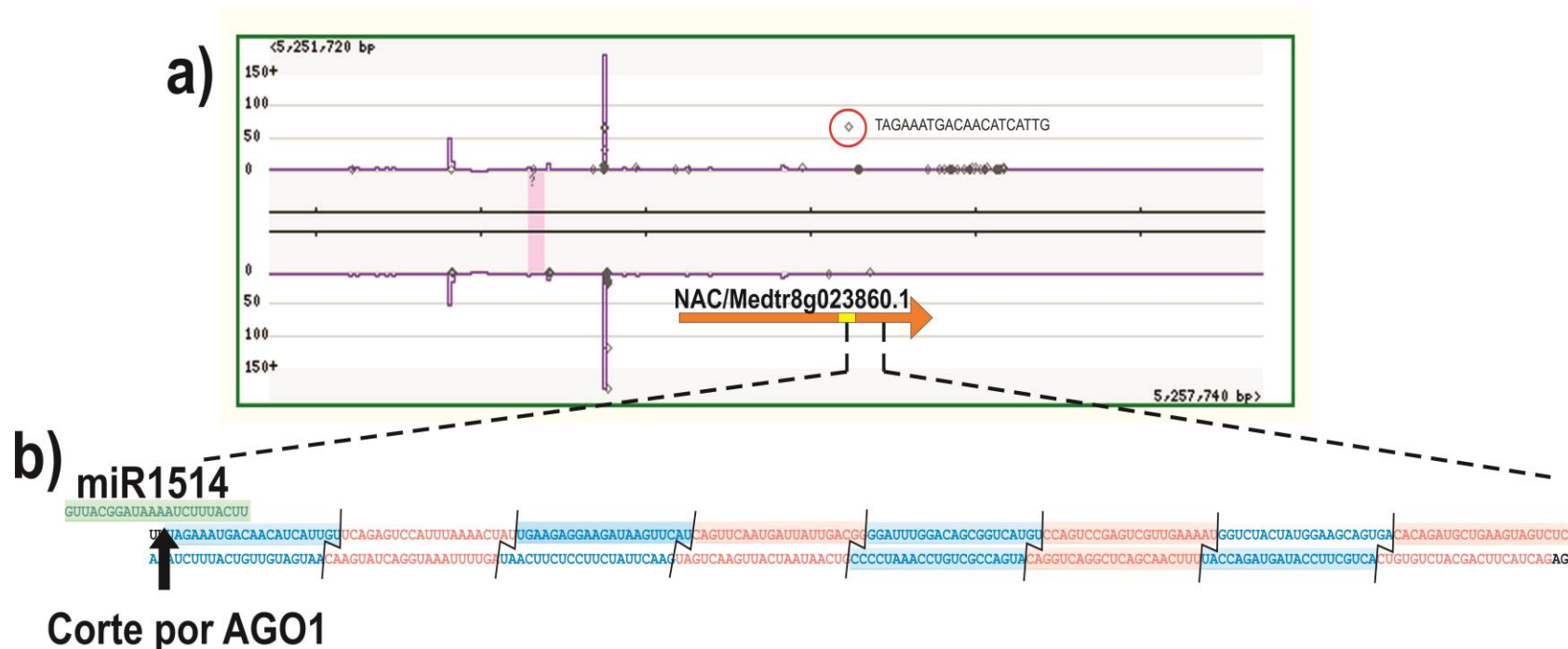


Figura 8. Regulación del blanco de Mtr-miR1514

a) La figura muestra la región donde se localiza el blanco predicho de Mtr-miR1514 (representado por la flecha naranja donde la sección amarilla señala el lugar de apareamiento con Mtr-miR1514). El rombo blanco indica la posición de la etiqueta "TAGAAATGACAACATCATTG" que coincide con el sitio de corte de AGO1 con un registro de 5.2 lecturas por millón. b) sRNAs en "fase" donde la posición de corte predicha por miR1514 indica el inicio de fase. Las rayas negras señalan los ciclos de corte de DCL4. La cadena complementaria tiene un cambio de fase de -2 debido al 2-nt 3' sobresaliente característico del corte por Dicer. Score en fase=15.1, suma de abundancias en fase=43, suma de abundancias fuera de fase=21, # de posiciones en ciclo de fase ocupados=7. Los sRNAs encerrados en rectángulos corresponden a los phasiRNAs cuya abundancia y ocupación esta validada por datos de secuenciación masiva (Nakano 2006 MPSS).

Considerando que Mtr-miR1514 es un miRNA de 22 nt y que se ha reportado que esta característica sugiere que regule genes tipo *PHAS* (Chen H. y col. 2010, Cuperus y col. 2010, Manavella y col. 2012), se realizó un análisis de generación de sRNAs en fase generados a partir del transcrito que deriva del *locus* donde se ubica el blanco probable utilizando bases de datos de secuenciación masiva de sRNAs en *M. truncatula* (Nakano 2006)(Colaboración con Rui Xia, investigador posdoctoral, Instituto de Biotecnología, Departamento de Plantas y Ciencias del Suelo, Universidad de Delaware). Este análisis considera la abundancia del sRNA y su frecuencia de ocupación en los ciclos en fase (Figura 8b). El análisis arrojó una puntuación de 15.1 (calculado como se describe por Howell et al., 2007), lo cual sugiere que blanco de miR1514 el factor transcripcional tipo NAC (Medtr8g023860) podría ser un gen *PHAS*, ya que se tiene reportado que una puntuación mayor de 15 sugiere que el transcrito da origen a sRNA en fase (Zhai y col. 2011).

Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 se acumulan diferencialmente en distintos órganos y estadios de desarrollo de *M. truncatula*

Con el fin de conocer la acumulación estadio-específica u órgano-específica de los miRNAs de interés, se colectaron plántulas completas de un día de edad germinadas en oscuridad, hoja y raíz de plantas adultas de tres semanas de edad y flores colectadas de plantas adultas de 3 meses de edad para medir la abundancia de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199. En este análisis, se utilizó miR159 como control positivo de acumulación de miRNAs, ya que este microRNA se encuentra altamente conservado en las plantas vasculares. Se sabe que se acumula en todos los tejidos y que juega un papel importante en el crecimiento de la planta. Se ha relacionado con la regulación del crecimiento vegetativo, tiempo de floración, desarrollo de la antera, y la forma y germinación de la semilla, además se sabe que miR159 restringe la expresión de algunos factores transcripcionales tipo MYB que a su vez son controladores positivos de la respuesta a ABA (Li y col. 2011).

Es importante mencionar que en un principio del proyecto la obtención de cDNA de los miRNAs de interés se obtenía utilizando el paquete comercial *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit*. Con esta metodología se exploró la acumulación de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en diferentes estadios de desarrollo, órganos y condiciones de crecimiento de *M. truncatula* sin embargo no se obtenía reproducibilidad en la cuantificación de la abundancia de los miRNAs. En el caso particular de Mtr-miR1514 no fue posible

obtener señal de detección utilizando *NCode*. Lo anterior nos sugería que esta metodología tiene baja sensibilidad ya que se tenía evidencia de la acumulación de Mtr-miR1514 en bases de datos de secuenciación masiva de RNAs pequeños en *M. truncatula* en las condiciones probadas (Figura 7c). Además los problemas de cuantificación no ocurrían con miRNAs abundantes como miR159. Los resultados anteriores sugerían que los miRNAs de interés y en particular Mtr-miR1514 tienen bajos niveles de acumulación en *M. truncatula*, lo cual se ha reportado como una característica común de miRNAs no conservados (Quin y col., 2014).

Varkonyi-Gasic y col., en 2007 reportaron una técnica para la obtención y cuantificación de miRNAs llamado “*stem-loop*/RT-qPCR”, ellos reportaron que esta metodología tiene una alta sensibilidad en la detección de miRNAs poco abundantes. Por lo anterior se estableció y estandarizó esta metodología para la cuantificación de la abundancia de los miRNAs de interés (Véase Materiales y métodos). Con esta metodología fue posible obtener la abundancia relativa de Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en este proyecto.

Nosotros encontramos que los miRNAs en estudio se acumulan de forma diferencial en estadios de desarrollo y órganos de *M. truncatula* (Figura 9). La alta acumulación de Mtr-miR1514 en hoja coincide con lo encontrado en las bases de datos de secuenciación masiva de RNAs pequeños (Figura 7c). De igual forma, los resultados indican que existe una acumulación significativa de miR1514 en plántulas de *M. truncatula*, lo cual también sucede en *P. vulgaris* (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, resultados no publicados). Sin embargo, en frijol existe una acumulación significativa de Pvu-miR1514 en raíces de plantas adultas cultivadas en condiciones óptimas de crecimiento lo cual no fue detectado en raíces de *M. truncatula*.

La presencia de Pvu-miR2119 solo se ha analizado en tejidos de hoja y raíz de plantas adultas de frijol y se sabe que existe una acumulación similar en ambos órganos (De la Rosa-Urena 2012) lo cual también se observa en *M. truncatula*. Lo anterior sugiere que este miRNA desempeña funciones similares en ambas especies vegetales, regulando a blancos homólogos, sin embargo, se requieren estudios más detallados para poder confirmar dicha hipótesis.

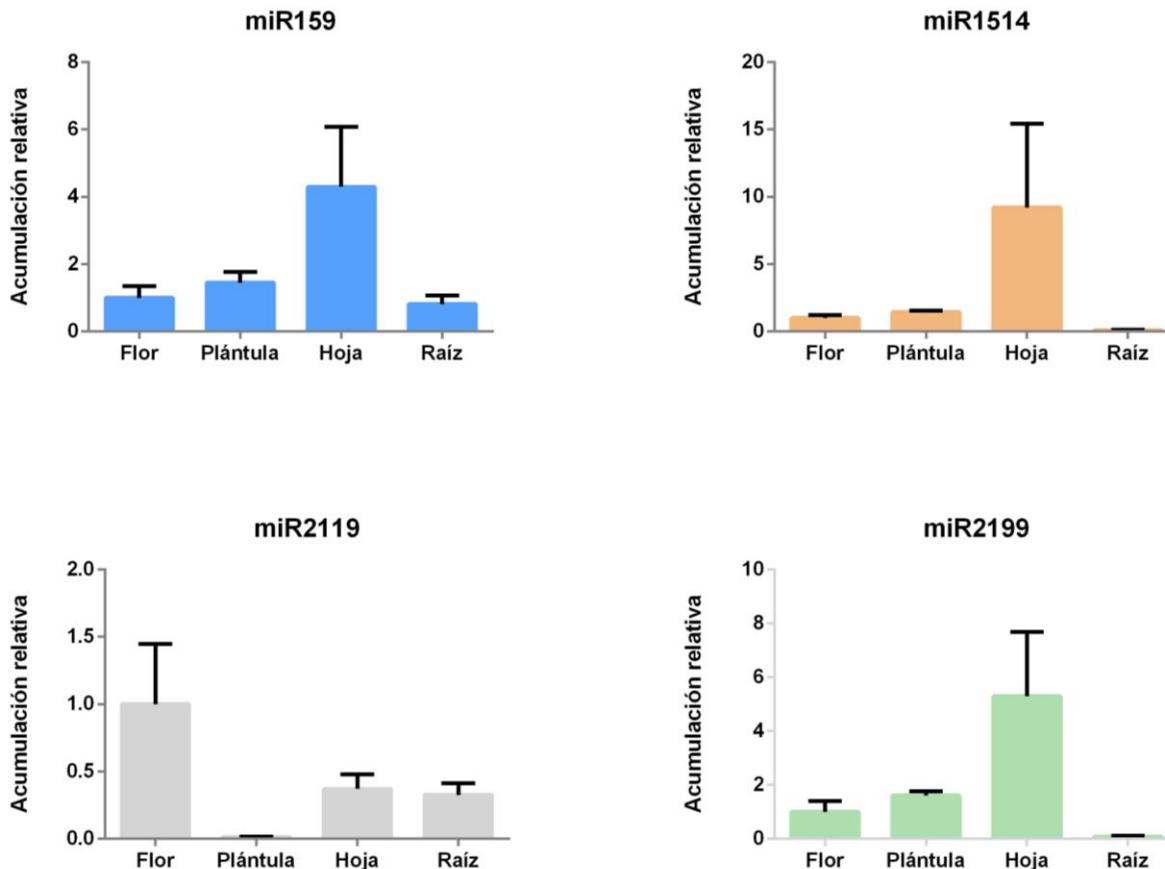


Figura 9. Acumulación relativa de miR159, Mtr-miR1514a, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en distintos órganos y estadios de desarrollo de *M. truncatula*.

Se utilizaron flores colectadas de plantas de 3 meses de edad, plántulas de un día de edad germinadas en oscuridad, las hojas y raíces utilizadas se colectaron de plantas adultas de 21 días. Se utilizó U6 snRNA como gen de referencia. La abundancia es relativa a flor. Las barras de error representan la S.D. geométrica de tres réplicas técnicas.

En *P. vulgaris* se ha estudiado el papel de Pvu-miR2199 en plántulas de tres días post-germinación debido a que es en este tejido en donde este miRNA se acumula preferencialmente y es donde exhibe una respuesta al estrés por déficit hídrico (Velarde-Garduño 2012). En *M. truncatula* Mtr-miR2199 también se acumula en plántulas de un día de edad, pero además se observa una acumulación significativa en flor y hoja, por lo que sería interesante estudiar su papel en estos órganos. Debido a que los miRNAs de interés fueron detectados en distintos órganos de *M. truncatula* se diseñaron los siguientes experimentos con el fin de descubrir la participación de estos miRNAs en la respuesta a la deficiencia de agua tanto en plántulas como en plantas adultas de *M. truncatula*.

7.2. Acumulación en plántulas de microRNAs de leguminosas relacionados con la respuesta a déficit hídrico

Considerando que el estadio de plántula es de fácil y rápida obtención, se diseñaron experimentos exploratorios donde se siguió la cinética de crecimiento de plántulas de *M. truncatula* en condiciones de baja disponibilidad de agua para determinar si hay presencia y respuesta al estrés de los miRNAs de interés en este estadio. El medio de crecimiento fue suplementado con manitol para disminuir la disponibilidad de agua en el ambiente estresando así a las plántulas osmóticamente (Figura 10a).

Se cuantificó la acumulación relativa de Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en las muestras obtenidas en este experimento. No obstante, los valores de acumulación no fueron detectables para estos dos miRNAs, lo cual contrasta nuestros resultados previos del análisis de acumulación de miRNAs en plántulas de *M. truncatula* (Figura 9). Sin embargo cabe mencionar que en los experimentos con manitol los cotiledones de las plántulas fueron retirados en función de optimizar la extracción de RNA con el método de trizol, mientras que para obtener los datos presentados en la Figura 8 se utilizaron plántulas completas. Lo anterior sugiere que la acumulación de Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 en plántulas es mayor en los cotiledones o bien la acumulación de este miRNA ocurre solo cuando las plántulas son germinadas en oscuridad.

Por otro lado, Mtr-miR1514 si fue detectable en plántulas sin coteledones. Sin embargo este miRNA no responde al estímulo de estrés bajo estas condiciones, ya que no se observa una diferencia significativa en la acumulación en las diferentes concentraciones de manitol ni a través del tiempo (Figura 10 c). Al mismo tiempo, se observaron cambios en el fenotipo de las plántulas bajo el estrés (Figura 10a), entre ellos un menor crecimiento de la raíz (Figura 10b), e inhibición del desarrollo de los cotiledones.

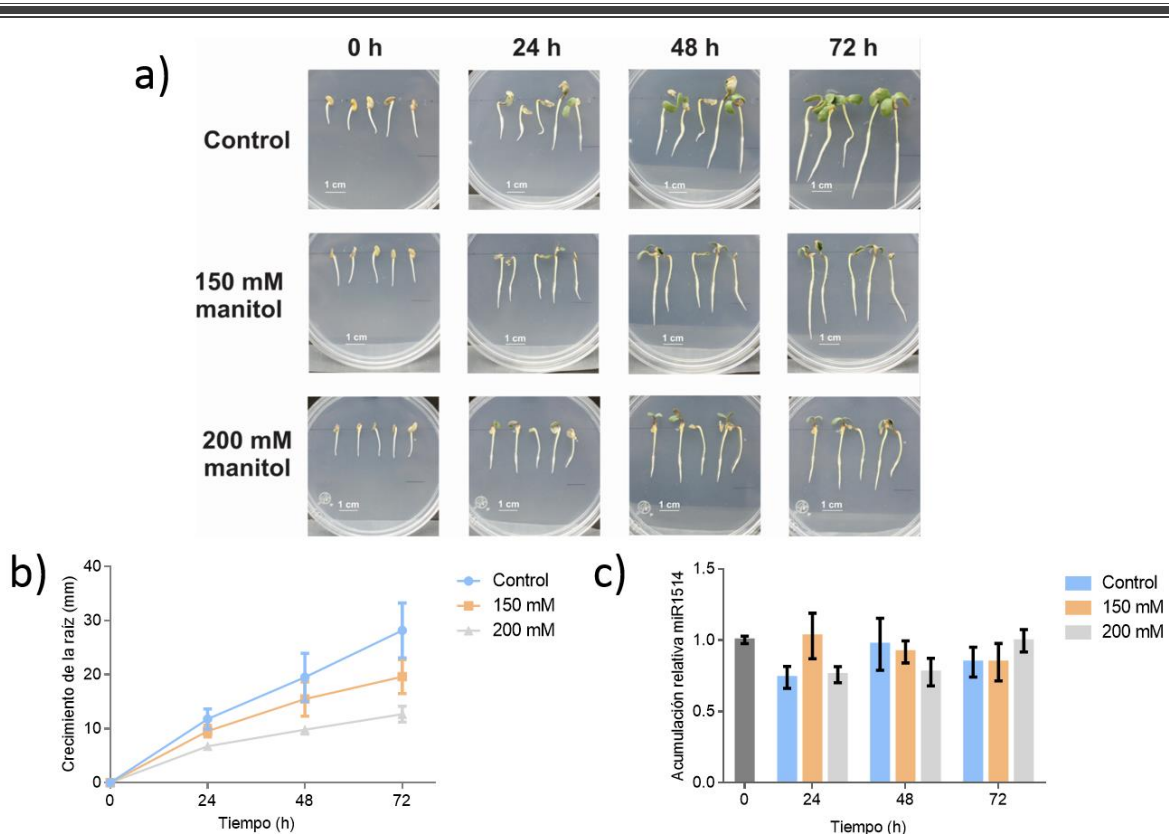


Figura 10. Crecimiento de plántulas de *M. truncatula* en manitol y acumulación relativa de Mtr-miR1514 en condiciones de estrés osmótico

a) Fenotipo de plántulas de *M. truncatula* en condiciones de estrés osmótico (150 y 200 mM de manitol) durante 72 h **b)** Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plántulas de *M. truncatula* bajo condiciones de estrés osmótico. Las barras de error representan S.D., n=6 **c)** Acumulación relativa de Mtr-miR1514 en plántulas sin cotiledones de *M. truncatula* bajo distintas concentraciones de manitol a través del tiempo. Se utilizó U6 snRNA como gen de referencia; la acumulación de las muestras son relativas a las 0 horas. Las barras de error representan la S.D. de tres réplicas técnicas.

Debido a que se tenía el antecedente de que Pvu-miR1514 se acumula en plántulas de frijol cuando éstas son sometidas a estrés por sequía (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, datos no publicados), las plántulas de *M. truncatula* se sometieron a estrés hídrico utilizando NaCl en el medio (Figura 11a), el cual disminuye la actividad de agua y además de generar estrés iónico.

En este experimento exploratorio, se cuantificó el crecimiento de la raíz de las plántulas como indicador del estrés. Las plántulas en 150 mM y 250 mM de NaCl muestran un decremento en el crecimiento de la raíz con respecto a las plántulas en medio control (Figura 11b). Además el desarrollo de pelos radicales en la raíz primaria de las plántulas se ve afectado en los medios suplementados con la sal, lo cual no fue observado en las plántulas que se cultivaron en presencia de manitol ni en las plántulas control. Sin embargo,

el desarrollo de los cotiledones es afectado en menor nivel si se compara con el desarrollo de los cotiledones de las plántulas control y de las plantas crecidas en medio adicionado con manitol (Figura 10a, Figura 11a). Por lo anterior, se concluye que las plantas sufren una modificación en crecimiento y desarrollo cuando son crecidas en un medio suplementado con NaCl. Es importante decir que los dos osmolitos utilizados causan distintos efectos en las células de las plantas. Las altas concentraciones de NaCl o manitol pueden producir estrés osmótico, sin embargo el NaCl es una sal que en solución acuosa de disocia en iones imponiendo un estrés iónico o salino en las células cuando se encuentra en altas concentraciones.

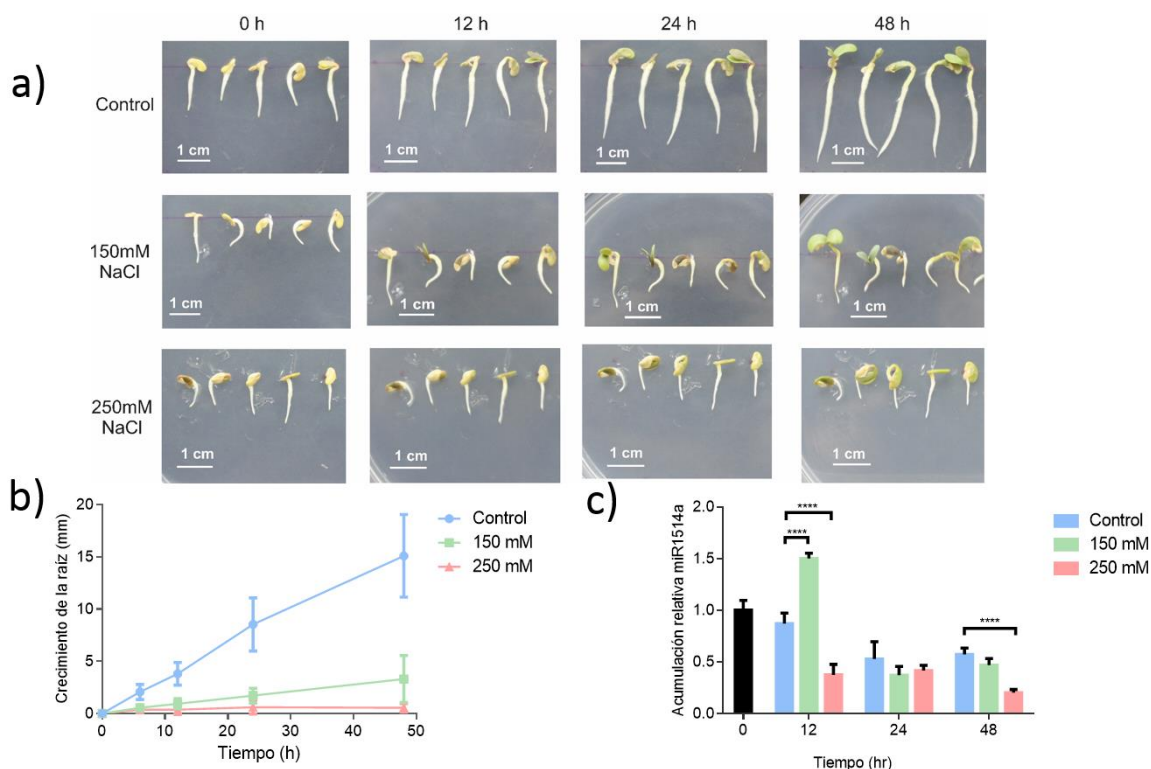


Figura 11. Crecimiento de plántulas de *M. truncatula* bajo condiciones de salinidad y acumulación relativa de Mtr-miR1514 en condiciones de estrés salino

a) Fenotipo de plántulas de *M. truncatula* crecidas en condiciones de salinidad 150 y 250 mM de NaCl durante 48 h **b)** Cinética de crecimiento de la raíz primaria de plántulas sin cotiledones de *M. truncatula* bajo las condiciones de estrés, las barras de error representan la S.D., n=6 **c)** Acumulación relativa de Mtr-miR1514 en plántulas de *M. truncatula* bajo distintas concentraciones de NaCl. Se utilizó U6 snRNA como gen de referencia; la acumulación de las muestras son relativas a las 0 horas. Las barras de error representan la S.D. de 3 réplicas técnicas.

Mtr-miR1514 responde al estímulo del estrés causado por NaCl, se observa un cambio significativo en su acumulación en tiempos tempranos tras 12 horas de exposición al estrés con 150 mM, además en la condición de 250 mM de NaCl se observa una disminución de su acumulación a las doce horas la cual se mantiene durante todo el experimento (Figura

11c, Garcias-Morales, Estancia de verano). Lo anterior puede explicarse si consideramos que el estrés provocado por la alta concentración de sal en el medio (250 mM de NaCl) es tan severo que podría limitar programas de desarrollo y respuesta en particular aquellas relacionadas con la acumulación de miRNAs ya que en todos los tiempos de la cinética donde se realizó la cuantificación del miRNA la acumulación del Mtr-miR1514 es menor cuando se compara con la del día cero. Además se sabe que la mayoría de estas plántulas no logran establecerse para formar plantas adultas.

La acumulación de Pvu-miR1514 en periodos poco prolongados de estrés por deficiencia de agua también fue observada en plántulas de frijol, en donde la acumulación significativa del miRNA se observa a las 12 horas después de someter al estrés por sequía (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, datos no publicados). Estos resultados sugieren que este miRNA se encuentra desempeñando funciones similares en ambas leguminosas.

7.3. Acumulación en plantas adultas de microRNAs específicos de leguminosas relacionados con la respuesta a déficit hídrico en *M. truncatula*

7.3.1. Efecto del estrés por sequía en plantas adultas de *M. truncatula*

Se realizó una cinética de crecimiento en condiciones de estrés por déficit hídrico en plantas adultas de *M. truncatula* con el fin de determinar la acumulación diferencial de los miRNAs de interés en este estadio de desarrollo. Para conocer el estatus hídrico de las plantas se monitoreó el contenido relativo de agua de las hojas y del sustrato durante la cinética de estrés por sequía. El porcentaje de agua del sustrato bajo condiciones control se mantuvo estable durante los nueve días del tratamiento, lo que se reflejó en el contenido relativo de agua de las hojas de estas plantas, las cuales mantuvieron un porcentaje de agua estable de entre 70-80% a lo largo del experimento. La pérdida de humedad en el sustrato durante los nueve días de la sequía mostró una disminución lineal con respecto al tiempo, llegando a niveles de humedad de aproximadamente 60%. El contenido relativo de agua en las plantas en sequía durante los días 0 a 3 se mantuvo constante con un porcentaje aproximado de 80% y, posteriormente éste disminuyó hasta un 30%. Lo anterior indica que el estatus hídrico de las plantas se modifica por cambios por el tratamiento de sequía probado en este ensayo el cual induce el estrés hídrico en *M. truncatula* (Figura 12a).

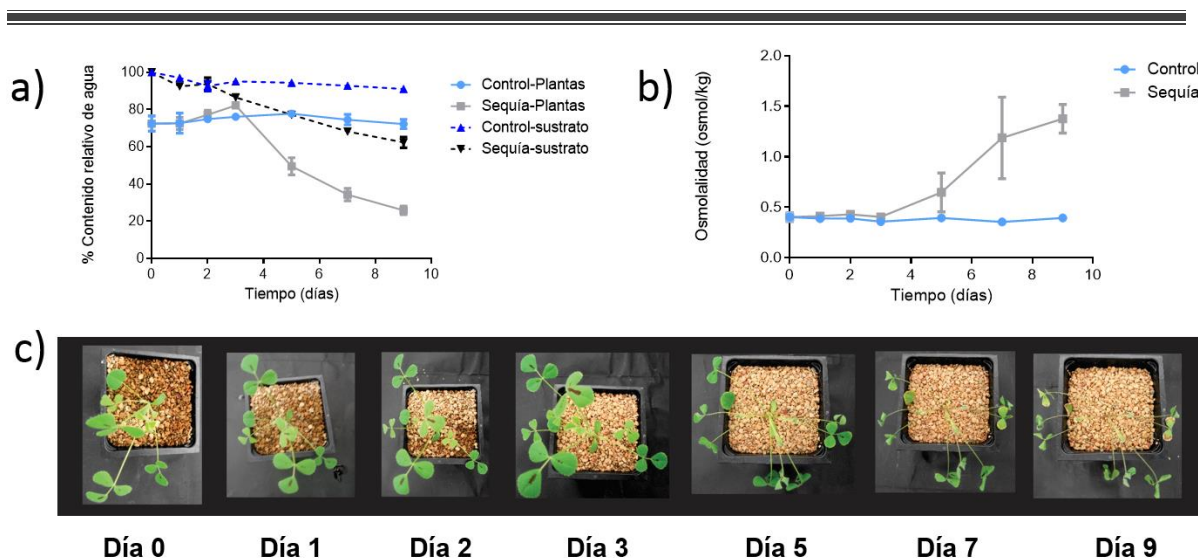


Figura 12. Estatus hídrico de plantas adultas de *M. truncatula* bajo condiciones control y sequía.

Plantas de 3 semanas de edad fueron sometidas a sequía, para lo cual se suspendió el riego por 9 días. Las plantas control fueron irrigadas continuamente, manteniendo un nivel de agua constante en las charolas que contenían a las macetas con las plantas durante la cinética de crecimiento en condiciones de estrés. **a)** Contenido relativo de agua en hojas control y sequía de *M. truncatula* (líneas continuas). Contenido de agua del sustrato en condiciones control y sequía en el que fueron sembradas las plantas (líneas puntuadas). Las barras de error representan el S.E. de tres réplicas independiente con n=3 cada una. **b)** Osmolalidad (Concentración de las partículas osmóticamente activas contenidas en una disolución, expresada en osmoles por kilogramo de disolvente) de suspensiones obtenidas de hojas control y sequía. Las barras de error representan el S.E. de 3 réplicas biológicas independientes **c)** Fenotipo de las plantas sometidas al estrés por sequía durante 9 días.

Además del contenido relativo de agua en las hojas de las plantas sometidas a estrés, se cuantificó la osmolalidad (Figura 12b). Dicho parámetro es una medida indirecta del potencial de solutos en las células. Las plantas de *M. truncatula* en condiciones de sequía mantuvieron una osmolalidad en las hojas similar a la del grupo de plantas control hasta el tercer día del ensayo y, posteriormente, se observó un incremento en este valor debido a la pérdida de agua (contenido de relativo), sin embargo, no podemos descartar que el aumento en la osmolalidad también se deba a la acumulación de osmolitos compatibles que se sabe se sintetizan con fines de mantenimiento del potencial osmótico en las células (Harb y col., 2010). Estos datos corroboran que las condiciones experimentales empleadas en estos ensayos efectivamente inducen el estrés hídrico en *M. truncatula*.

7.3.2. Mtr-miR2199 responde al estrés por sequía en la raíz de *M. truncatula*

Se obtuvieron los patrones de la acumulación de Mtr-miR2199 en hojas y raíces en condiciones control y sequía mediante qPCR y *Northern blot*. Se observó que en hoja la acumulación de Mtr-miR2199 se mantiene sin cambio significativo a lo largo del

experimento (Figura 13a, d), mientras que en raíz la acumulación del miRNA aumenta significativamente en las plantas en sequía después de 7 días sin hidratación, en estas condiciones el contenido relativo de agua en estas plantas es menor del 40%. Por lo que podemos decir que este miRNA responde al estrés en condiciones de sequía severas y prolongadas.

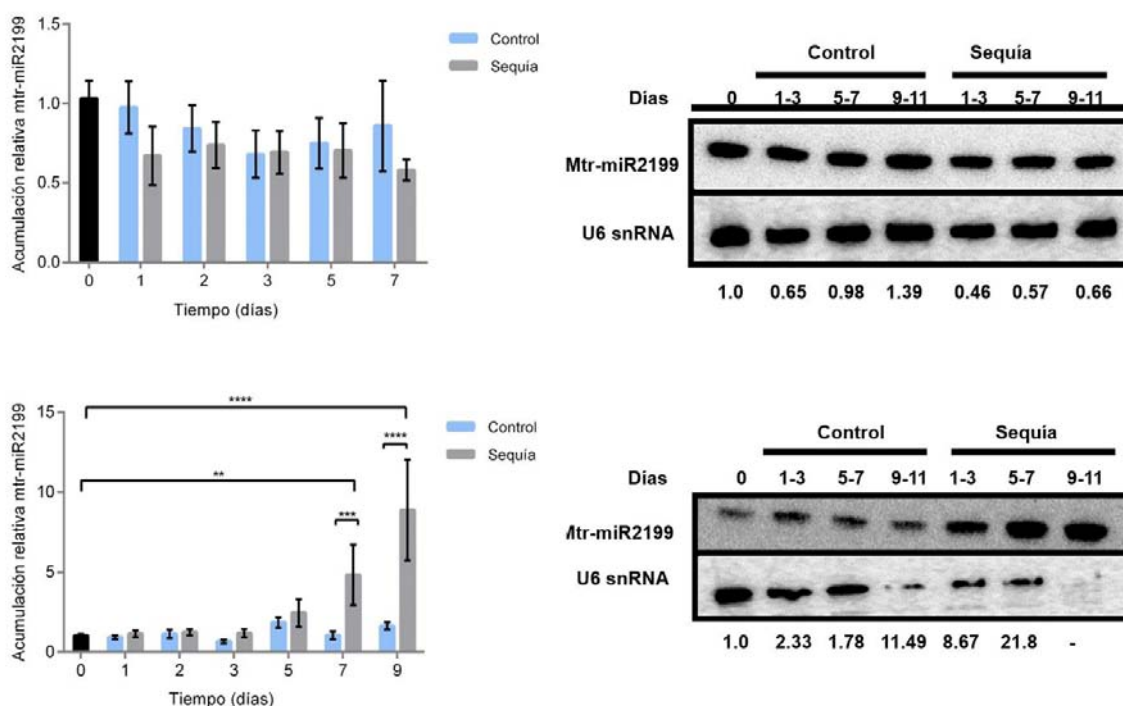


Figura 13. Acumulación relativa de Mtr-miR2199 en plantas adultas de *M. truncatula* en condiciones control y sequía

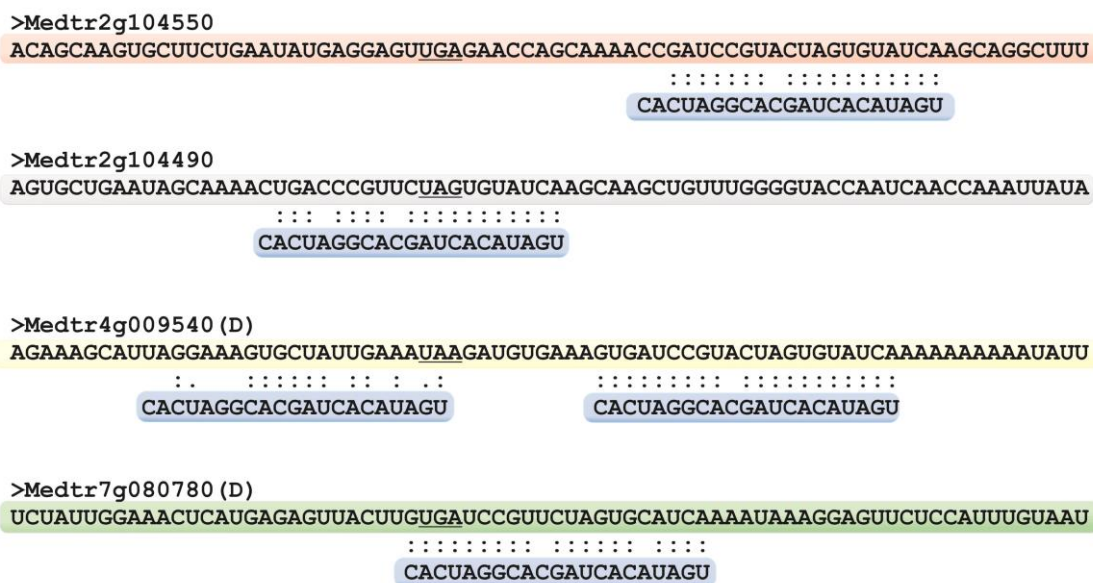
Acumulación del miRNA evaluado por qPCR en hojas **a)** y raíces **b)** de plantas adultas. Se utilizó U6 snRNA como gen de referencia; la acumulación de los miRNAs es relativa al día 0. Las barras de error representan el E.S. de tres réplicas biológicas independientes, n=3, con sus 3 réplicas técnicas correspondientes. Acumulación del miRNA en hojas **c)** y raíces **d)** de plantas adultas determinada por *Northern blot*, utilizando sondas de oligonucleótidos específicas para cada Mtr-miR2199. Las membranas fueron hibridadas utilizando U6 snRNA como control de carga. La señal se midió utilizando un Phosphorimager y se determinó la abundancia relativa de cada miRNA. La señal de la muestra en el día 0 fue utilizada como 1.0 y el número indica el aumento relativo.

Este hecho fue corroborado mediante ensayos *Northern blot* (Figura 12b, d) realizados en una cuarta réplica biológica independiente. En este experimento se juntaron las muestras de RNA obtenidas en los días 0, día 1-3, 5-7 y 9-11, esto considerando las grandes cantidades de RNA que se requieren para este tipo de ensayo. Como se puede observar en la Figura 12d, el gen de referencia U6 en raíz muestra una señal muy baja en algunas muestras lo cual se debió a problemas en la hibridación o revelado. Sin embargo cabe

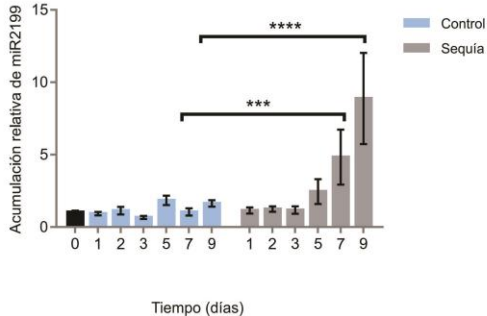
mencionar que los experimentos más robustos que se realizaron son los reportados utilizando qPCR.

Continuando con la exploración de la función de Mtr-miR2199 en respuesta al estrés por déficit hídrico, se realizó una predicción bioinformática de los blancos de MtrmiR2199 (psRNATarget, Xinbin y col., 2011). En este estudio, se predijo que los transcritos de 4 factores transcripcionales tipo bHLH podrían ser candidatos de blancos para este miRNA, los genes de estos factores transcripcionales están localizados en tres de los ocho cromosomas de *M. truncatula*. (Figura 13a).

a)



b)



c)

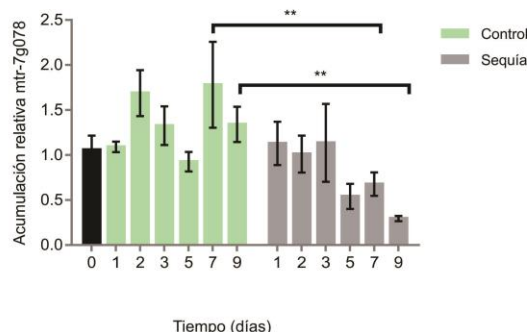


Figura 14. Blancos de Mtr-miR2199 y su acumulación relativa en condiciones de estrés por sequía en plantas adultas de *M. truncatula*.

a) Apareamiento entre las secuencias de Mtr-miR2199 y la secuencia de sus blancos predichos con el servidor psRNATarget, (Xinbin y col., 2011), (D) indica que la regulación por miR2199 ha sido confirmado experimentalmente utilizando ensayos de degradoma (Devers y col. 2011). Acumulación relativa de de miR2199 b) y de blanco de Mtr-miR2199 en *M. truncatula* con anotación Medtr7g080780 c) durante la cinética de estrés por sequía en raíces cuantificada por qPCR. Se utilizó UBQ y U6 snRNA como genes de referencia

para el blanco y el miRNA respectivamente. La abundancia del Mtr-miR2199 y el transcrito de Medtr7g080780 son relativas al día 0. Las barras de error representan el E.S. de tres réplicas biológicas independientes, n=3. Con sus 3 réplicas técnicas correspondientes.

Devers y col. en 2011 confirmaron por análisis de degradoma a dos de cuatro blancos predichos para miR2199 correspondientes a Medtr7g080780 y Medtr4g009540, por lo que para fines de este estudio, se cuantificó la acumulación relativa de estos transcritos por qPCR en las raíces de las plantas del experimento. Se diseñaron oligonucleótidos específicos a la región 3' UTR, sitio cercano al lugar de apareamiento con el miRNA. Debido a la homología entre ambos genes blancos (70.1%), fue necesario realizar un alineamiento de las secuencias de los transcritos de los dos factores transcripcionales para identificar las zonas divergentes y diseñar oligonucleótidos específicos para cada blanco (Anexo D, Figura B).

Se cuantificaron por RT-qPCR ambos blancos sin embargo, no fue posible amplificar el transcrito de Medtr4g009540 a pesar de que se probaron los oligonucleótidos en DNA genómico y se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (Anexo D, Figura A). Por lo anterior podemos decir que el transcrito de Medtr4g009540 no es detectable en las condiciones estudiadas. El transcrito de Medtr7g080780 se cuantificó encontrándose un patrón de acumulación muy interesante, ya que muestra una correlación de su acumulación con respecto a la del miRNA en los días 7 y 9 después de quitar la irrigación en las plantas. Lo anterior sugiere fuertemente que este factor transcripcional es un blanco de Mtr-miR2199, ya que se tiene evidencia por degradoma y se encontró una correlación negativa de su acumulación con respecto a Mtr-miR2199.

7.4. Expresión transitoria en hojas de *M. truncatula*

Por lo general el estudio de la función de los miRNAs implica el uso de estrategias transgénicas donde pueda modularse directa o indirectamente la actividad de estos sRNAs *in vivo*. De esta manera es posible observar fenotipos que elucidan la función específica de los miRNAs. Uno de los objetivos del estudio de miR1514, miR2119 y miR2199 en *M. truncatula* es elucidar su función en el estrés por déficit hídrico aprovechando las metodologías establecidas para el estudio molecular en esta planta modelo, lo cual facilitará la tarea de caracterizar funcionalmente de estos miRNAs específicos de leguminosas.

Nosotros estandarizamos un método de transformación transitoria en *M. truncatula* basándonos en el protocolo publicado por Picard y col. (Rose 2013). Se utilizó el vector de expresión binaria pB7WG2D (Anexo C, Figura C), este vector contiene un módulo que incluye al promotor rolD dirigiendo la secuencia que codifica para una versión de GFP que tiene ligada a una señal de retículo endoplásmico (EgfpER), y otro módulo con secuencias de recombinación dirigidas por el promotor 35S.

Con el fin de estudiar uno de los miRNAs de interés se clono el precursor putativo de Mtr-miR2119. Se encontró que al igual que en frijol este miRNA también se encuentra codificado en un precursor bicistrónico, compartiendo el transcrito con el precursor de Mtr-miR398a. Se realizó la recombinación con este precursor probable, de esa forma se obtuvo el plásmido pB7WG2D con el precursor de este miRNA policistrónico (Mtr-MIR3098a-2119) dirigido por un promotor fuerte. Se infiltraron hojas de *M. truncatula* con una suspensión de *A. tumefaciens* transformadas con el vector vacío pB7WG2D y el vector pB7WG2D que contiene el casete de sobre-expresión del precursor policistrónico MIR398a-2119.

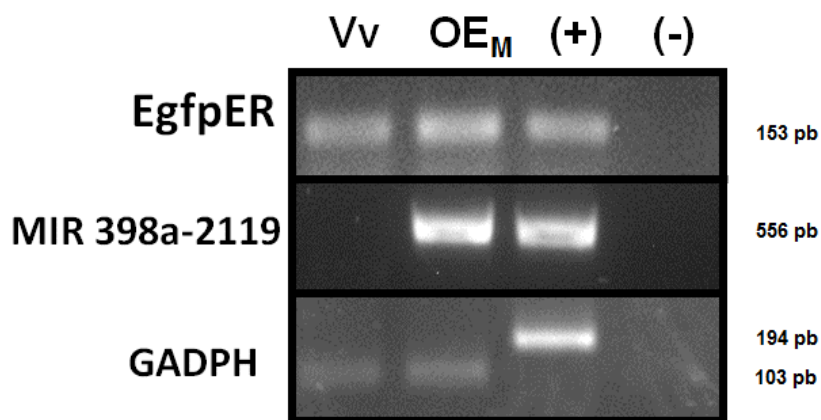


Figura 15. Amplificación del transcrito exógeno del Mtr-MIR398a-2119 en hojas agroinfiltradas de *M. truncatula*.

Gel de agarosa al 1.5% con las muestras obtenidas por PCR que resultan de la amplificación del transcrito de: GFP (gen reportero), MIR398a-2119 exógeno de las hojas de *M. truncatula* agroinfiltradas con la suspensión de *A. tumefaciens* que contenía: el vector vacío (Vv) o el vector sobre-expresante del precursor (OE_M). Se utilizó como control de carga GADPH. (+) Indica controles positivos de amplificación, para GFP se utilizó el plásmido vacío purificado, para Mtr-MIR-398-2199 se utilizó el plásmido con el casete de Mtr-MIR398a-2119 purificado y para GADPH se usó DNA genómico de *M. truncatula* (la secuencia genómica de GADPH contiene un intron de 91 pb). (-) indica controles negativos de amplificación. El gel fue teñido con bromuro de etidio.

Una forma de comprobar la transformación genética transitoria es amplificando el cDNA del transcrito de EgfpER y del precursor Mtr-MIR398a-2119 que se obtiene de las hojas

agroinfiltradas de *M. truncatula*. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos para amplificar Egfp, además se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar el precursor exógeno de tal forma que fue posible discriminar entre el precursor nativo y el introducido por la transformación. El resultado de dicha amplificación se muestra en la Figura 14. Los resultados obtenidos indican que se logró amplificar el transcrito de la proteína verde fluorescente en las hojas transformadas con el vector vacío así como en aquellas transformadas con el vector sobre-expresante del precursor del miRNA. Debido a que se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del precursor exógeno este sólo fue detectado en las hojas sobre-expresantes. En este ensayo no se cuantificó la acumulación de los miRNAs maduros por lo que no sabemos si el precursor putativo seleccionado es procesado por DCL1.

Alternativamente se monitoreó la fluorescencia de EgfpER en las hojas agroinfiltradas irradiándolas con una lámpara que genera rayos ultravioleta. No detectamos señal de la fluorescencia en las hojas lo que podría indicarnos que a pesar de que es detectable el RNA mensajero de Egfp (Figura 15), este transcrito probablemente presenta problemas en la traducción, lo que explicaría la ausencia de señal de fluorescencia o bien la tasa de traducción es tan baja que las cantidades de proteínas no son suficientes para observar fluorescencia. Sin embargo cabe mencionar que las mismas construcciones utilizadas para la infiltración en hojas de *M. truncatula* fueron probadas en *Nicotiana benthamiana* donde fue fácil observar la fluorescencia (Datos no mostrados). Con estos resultados descartamos problemas del plásmido utilizado para la transformación, particularmente en la secuencia de los genes de interés. Este hecho nos sugiere que alternativamente a los problemas de traducción del transcrito de Egfp, la fluorescencia de esta proteína podría ser indetectable debido a las características de las hojas de *M. truncatula* como el grosor o la mayor cantidad de cera cuticular comparada con la de las hojas de *N. benthamiana*.

A pesar de lo anterior con los resultados obtenidos podemos decir que fue posible transformar células de las hojas de *M. truncatula* capaces de expresar de interés lo cual podría aprovecharse como herramienta para la caracterización funcional de miRNAs en este órgano de *M. truncatula*.

8. Discusión

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva han revelado un número sorprendente de miRNAs no-conservados en múltiples especies. Los miRNAs no-conservados son definidos como aquellos con una distribución filogenética limitada. Este tipo de miRNAs son evolutivamente recientes y solo aquellos miRNAs integrados en redes genéticas de regulación indispensables para las plantas realizan la transición evolutiva de ser no-conservados a conservados (Axtell y Bowman 2008). Es interesante resaltar que miR1514, miR2119 y miR2199 tienen una conservación que se limita a la familia Leguminosae o Fabaceae e interesantemente responden al estrés por déficit de agua en frijol (Arenas-Huerta y col., 2009; De la Rosa-Urena 2012; Sosa, Tesis de doctorado, datos no publicados) y en *M. truncatula* (Figura 1c, 13b), lo que nos sugiere que están involucrados en nuevas y únicas estrategias de esta familia y que se han seleccionado para contener al menos contra éste estrés.

8.1. Análisis de miRNAs poco abundantes en *M. truncatula*

Se sabe que los miRNAs no-conservados en plantas por lo general son poco abundantes, y presentan patrones de acumulación muy específicos (Quin y col., 2014), por lo que es importante contar con metodologías confiables de cuantificación y detección de estos RNAs pequeños. Como aportación de este trabajo se estandarizó un método de cuantificación de miRNAs poco abundantes (Mtr-miR1514 y Mtr-miR2199) por RT-qPCR en *M. truncatula* con el fin de contar con una metodología que nos permitiera conocer los patrones de acumulación de los miRNAs bajo las condiciones de interés. El método de cuantificación previamente utilizado en nuestro laboratorio se fundamenta en la obtención de cDNA de miRNAs utilizando el paquete comercial *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit*, en el cual se realiza la poliadenilación de miRNAs de RNA total y la síntesis de la cadena complementaria de DNA de los miRNAs poliadenilados para su medición por PCR cuantitativa. En nuestra experiencia, con éste método no se obtuvo reproducibilidad de los resultados entre las réplicas biológicas, además, la sensibilidad en la cuantificación de miRNAs poco abundantes era baja debido probablemente a que no hay especificidad en la síntesis de cDNA. Con el fin de superar estos problemas se adaptó una nueva técnica en

nuestro laboratorio a partir del método de obtención de cDNA con oligonucleótidos *stem-loop* reportado por Varkonyi-Gasic y col., en 2007, el cual es descrito como una metodología de alto alcance para la detección y cuantificación de la acumulación relativa de miRNAs que es rápida, sensible y específica. En este método se utilizan oligonucleótidos *stem-loop* RT específicos los cuales forman un tallo-asa. Uno de los extremos del tallo se une a la porción 3' del miRNA, de esta manera, se inicia la transcripción reversa del miRNA. Posteriormente los productos de la RT son amplificados utilizando un oligonucleótido sentido específico para el miRNA y un oligonucleótido anti-sentido universal que aparea con una secuencia del oligonucleótido *stem-loop* RT, para su medición (Figura 15b).

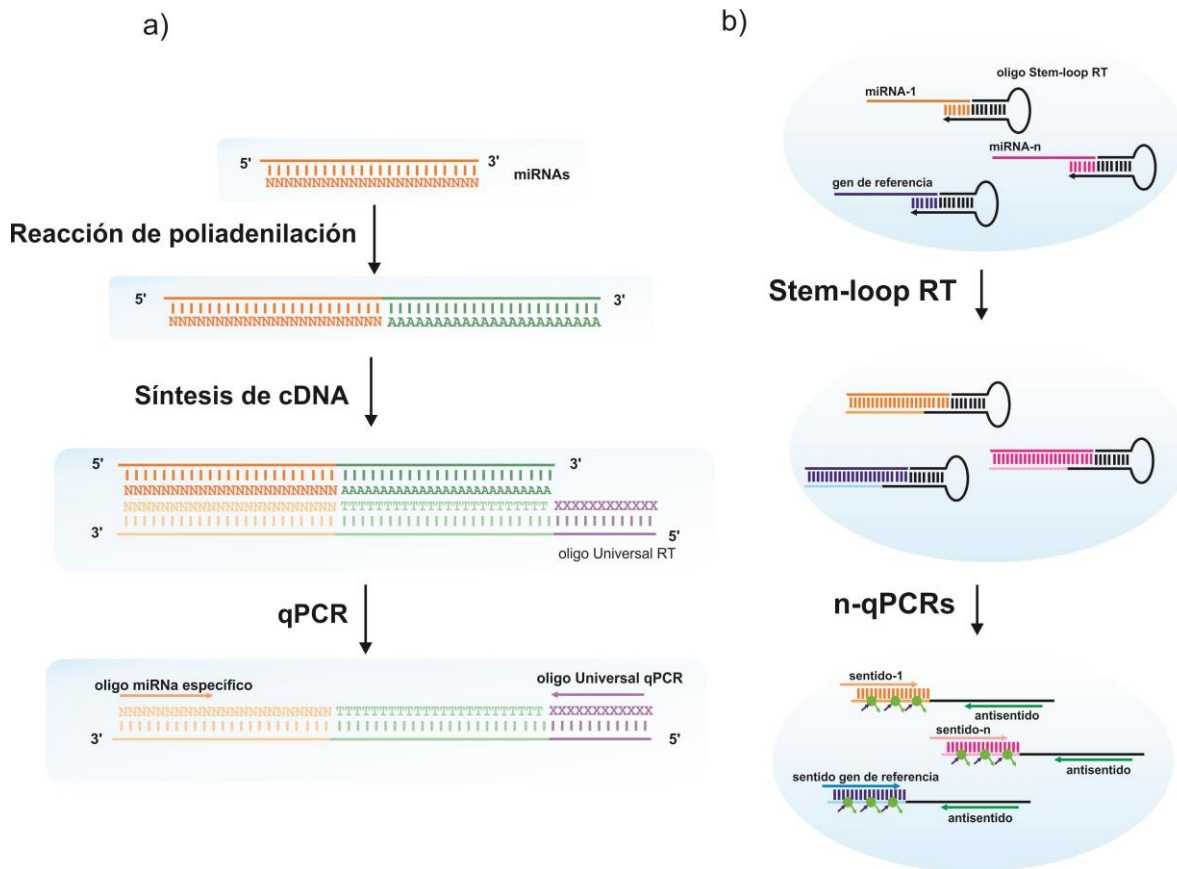


Figura 16. Cuantificación de miRNAs utilizando diferentes metodologías para la obtención de cDNA Utilizando a) el paquete comercial *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis* b) el método de síntesis multiplex de cDNA de miRNAs por *stem-loop* (Varkonyi-Gasic y col. 2007), Método modificado del Dr. Axtel, Universidad de Pensilvania.

El protocolo establecido por Varkonyi-Gasic tiene una limitación que radica en que puede haber errores en la normalización de la cuantificación por qPCR con el gen de referencia,

ya que se requiere realizar una reacción de cDNA por cada miRNA o gen de referencia que se requiere cuantificar. Por lo anterior nosotros modificamos el método de obtención de cDNA y se utilizó una estrategia multiplex (Turner y col. 2013) , que permite cuantificar hasta 4 miRNAs diferentes y su gen de referencia utilizando oligonucleótidos *stem-loop específicos* en la misma muestra de cDNA. Lo anterior se realizó con modificaciones sugeridas por el grupo del Dr. Axtell de la Universidad del Estado de Pensilvania. Con el método desarrollado fue posible obtener una mejor repetibilidad entre réplicas biológicas y una mayor sensibilidad.

8.2. Transformación transitoria de hojas de *M. truncatula* como herramienta para la caracterización funcional de miRNAs linaje-específicos

La transformación transitoria en hojas es una estrategia rápida y fácil para el estudio de genómica funcional y caracterización de promotores, se utiliza ampliamente en plantas modelo como *Nicotiana benthamiana* y *A. thaliana*, ya que se ha mostrado una alta eficiencia de transformación en este tipo de plantas, sin embargo esta metodología no ha podido implementarse en cualquier especie vegetal ya que muchas presentan recalcitrancia a la transformación.

Los miRNAs de interés de este proyecto son específicos de leguminosas, lo que reduce su espectro de estudio en las plantas. En particular, la planta modelo de estudio en nuestro laboratorio *P. vulgaris* ha sido extremadamente de manipular genéticamente por sus recalcitrancia a la regeneración *in vitro*, creando un cuello de botella para establecer de forma eficiente un protocolo de transformación. Estrada-Navarrete y col. en 2006 desarrollaron un protocolo utilizando *Agrobacterium rizhogenes* para producir raíces pilosas en diversas variedades y cultivares de *P. vulgaris* sin embargo este tipo de transformaciones se limita al estudio funcional de genes en raíces. Por otro lado se ha reportado un método de silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS) mediante el uso del virus del moteado de vainas de frijol (BPMV) para el silenciamiento de genes endógenos así como la expresión de proteínas en hojas de frijol (Díaz-Camino y col., 2011), pero este método se limita al silenciamiento. Es por ello que se requiere desarrollar herramientas particulares para la caracterización funcional de estos miRNAs en otras plantas leguminosas como *M. truncatula*.

Recientemente se describió un protocolo para la transformación transitoria en hojas de *M. truncatula* (Rose 2013) donde se logró expresar exitosamente el factor de transcripción LEGUME ANTHOCYANIN PRODUCTION (LAP1), el cual incrementa la acumulación de transcritos de genes clave para la biosíntesis y acumulación de pigmentos relacionados con las antocianinas. Nosotros logramos implementar esta técnica de transformación en *M. truncatula*, sobre-expresando exitosamente el precursor de miR398a-2119 en hojas. Lo que permitirá diseñar experimentos para el análisis funcional de estos miRNAs, y de otros así como genes de interés en esta planta modelo en hojas para proponer modelos de regulación donde estas moléculas están involucradas. Por otro lado es importante establecer en el laboratorio otras herramientas de estudio en esta especie como la transformación utilizando *A. rhizogenes* para generar raíces pilosas además de la transformación estable, las cuales nos permitirá enriquecer los resultados obtenidos.

8.3. Mtr-miR1514 es un miRNA linaje-específico que se encuentra en *M. truncatula*, regula a su blanco por corte y genera phasiRNAs.

Aunque análisis previos a este estudio no habían reportado la existencia de Mtr-miR1514 en *M. truncatula*, nosotros obtuvimos evidencia experimental de su existencia en esta planta mediante búsquedas en bases de datos de secuenciación masiva de RNAs pequeños y además fuimos capaces de detectarlo y cuantificarlo evidenciando su respuesta a salinidad por qPCR en plántulas de *M. truncatula*. Mediante predicciones bioinformáticas y análisis de degradoma fue posible encontrar que Mtr-miR1514 regula post-transcripcionalmente a un factor transcripcional tipo NAC. Se sabe que en *P. vulgaris* el blanco de este miRNA también pertenece a la familia de proteínas NAC y que miR1514 está involucrado en la producción de phasiRNA que derivan de la regulación post-transcripcional y del procesamiento de este blanco (Sosa, Tesis de doctorado, datos no publicados). Los genes NAC (NAM, ATAF1, 2 CUC2) son factores transcripcionales específicos de plantas codificados por más de 100 genes en *A. thaliana*, se han relacionado con diversas funciones como programas de desarrollo embrionario y floral, formación de raíces laterales, señalización por auxinas, defensa y estrés abiótico (Olsen y col., 2005). Es importante mencionar que la función del factor transcripcional NAC (Medtr8g023860.1), blanco de Mtr-miR1514 (este trabajo) y los NAC Phvul.010G121000 y Phvul.010G120700 blancos de Pvu-miR1514 (Sosa-Valencia, Tesis de doctorado, datos no publicados) aún no ha sido determinada, por lo que no es posible inferir cual es la función de miR1514 en el estrés por

déficit hídrico en leguminosas. No obstante el estudio de miR1514 nos permite postular que existe una regulación post-transcripcional de este factor transcripcional tipo NAC, vía la producción de phasiRNA que derivan del procesamiento post-transcripcional del mRNA de este factor transcripcional mediada por miR1514, es cual es específico de leguminosa y responde al estrés por deficiencia de agua.

Como evidencia adicional en *M. truncatula* se evaluó la producción de phasiRNAs en la base de datos de secuenciación masiva de RNAs pequeños de la mutante con cambio de sentido en el gen que codifica para RDR6 (Nakano 2006), proteína involucrada en la generación de phasiRNAs, se encontró que no hay generación de phasiRNAs a partir del *locus* del transcrito NAC en esta mutante, lo que suma evidencia de que este miRNA genera estos siRNAs secundarios como modo de regulación.

Zhai y col. en 2011 estudiaron en detalle la diversidad de siRNA de 21 nt en fase (phasiRNAs) en diversas bibliotecas de soya y de *M. truncatula* e identificaron 114 y 41 *PHAS-loci* respectivamente. Los autores postulan que estos phasiRNAs se encuentran relacionados con una compleja regulación de los transcritos de genes NB-LRRs, los cuales se han relacionado con la formación de interacciones simbióticas. Lo anterior sugiere que los miRNAs pueden fungir como reguladores maestros de una familia grande de genes. A pesar de que los phasiRNAs derivados de la regulación de Mtr-miR1514 descritos en esta tesis (Figura 8b) no fueron detectados por Zhai y col. (2011), es factible considerar que la función de este miRNA podría llevar a cabo una función similar como regulador maestro de una familia de genes, en donde este miRNA de 22 nt es capaz de amplificar una señal de regulación mediante la generación de los phasiRNAs. Se sabe que estas grandes redes de regulación por phasiRNAs se encuentran aparentemente ausentes en *A. thaliana*, por lo que se cree que las implicaciones de la importancia de los phasiRNAs se extiende a la familia de algunas plantas y en particular de leguminosas.

8.4. Mtr-MiR2199 responde a sequía en la raíz de *M. truncatula*

Numerosos esfuerzos se han realizado en nuestro laboratorio para la caracterización de miR2199 en frijol. Sabemos que este miRNA responde al estrés por sequía en plántulas de frijol y que regula a un factor transcripcional tipo bHLH (*basic-hélix-loop-hélix*). En particular, este miRNA es sumamente interesante ya que tiene dos sitios de apareamiento con uno de

sus blancos en frijol y esta cualidad aparentemente se conserva en varias leguminosas (Velarde-Garduño 2012). Actualmente se realizan esfuerzos para caracterizar detalladamente esta función de Pvu-miR2199 (Sierra- Sarabia, Tesis de maestría, datos no publicados), sin embargo, la limitación de trabajar con una planta no modelo y las escasas herramientas disponibles para el estudio de genómica funcional en esta planta han dificultado ésta tarea. Por lo anterior en este trabajo propusimos utilizar *M. truncatula* como un modelo de estudio de este y de otros miRNAs de interés. Mtr-miR2199 se acumula en respuesta a sequía en raíces adultas, además se observó que este miRNA presenta una relación con la acumulación con Medtr7g080780 (Factor transcripcional tipo bHLH), uno de sus blancos predichos. Como se puede observar en la Figura 13a, Medtr4g009540 es el único de los blancos predichos de Mtr-miR2199 en *M. truncatula* que conserva el doble sitio de apareamiento con su Mtr-miR2199, en donde uno de los sitios tiene un mejor apareamiento que el otro. Lo anterior sugiere que los dos sitios de apareamiento son regulados de forma distinta; el sitio con mejor apareamiento podría sufrir una regulación por corte endonucleolítico por AGO1 y el segundo sitio con pobre apareamiento podría ser susceptible a una regulación de la represión de la traducción, ya que se ha reportado que este mecanismo de represión depende del apareamiento entre el miRNA y su blanco (Brodersen y col., 2008). Desafortunadamente, este blanco no se detectó en plantas adultas, lo que indica que el transcrito de este factor transcripcional no se expresa bajo las condiciones probadas. Con respecto a los otros dos blancos predichos utilizando el servidor psRNATarget (Medtr2g104550 y Medtr2g104490) se desconoce si este miRNA es capaz de realizar una regulación sobre estos blancos, por lo que valdría la pena realizar experimentos para confirmar la regulación sobre estos transcritos.

Respecto al blanco Medtr7g080780, aunque no se conoce aún su función, se sabe que su homólogo más cercano en *A. thaliana* es un factor transcripcional bHLH llamado *NA1*, relacionado con la presencia de cuerpos endosomales, los que a su vez se han relacionado con la respuesta a daño del tejido celular, jasmonato y defensa contra herbívoros (Matsushima y col., 2004). Los genes bHLH constituyen una de las familias más grandes de factores transcripcionales (Stevens y col. 2008), y están involucrados en una gran variedad de procesos de señalización y desarrollo en plantas (Heim y col., 2003; Toledo-Ortiz y col., 2003). La región característica de los bHLH consta de 60 aminoácidos compuestos por una región básica de 15-20 residuos, seguida de una región HLH compuesta por dos hélices anfipáticas constituidas por residuos hidrofóbicos unidas por regiones *loop*. La región BHL es el dominio de interacción proteína-proteína y la región básica de dos homodímeros o

heterodímeros bHLHs son capaces de unirse a DNA en una secuencia específica conocida como caja E (5'-CANNTG-3'). Alrededor de 133 genes bHLH se describieron inicialmente en *A. thaliana* mostrando un amplio patrón de expresión (Heim y col., 2003). En leguminosas, ningún estudio referente a bHLH se ha realizado a pesar de que existen más de 100 bHLH reportados en *M. truncatula* (MTGEA) (Benedito y col., 2008). La participación de solo dos genes bHLH en raíz de leguminosas ha sido descrita: GmSAT, un factor transcripcional involucrado con el transporte de amonio en soya (Chiasson y col. 2014), y LjRHL1, involucrado en el desarrollo de pelos radicales en *Lotus japonicus*. (Karas y col. 2009), sin embargo, ninguno de estos los bHLH son homologos a los blancos de Mtr-miR2199, lo que de nuevo retrasará la interpretación de la funcional de miR2199 y su respuesta a estrés en leguminosas.

Debido a la limitación en tiempo no fue posible corroborar la relación entre la acumulación de Mtr-miR2119 con respecto a sequía en *M. truncatula*. A pesar de ello, logramos caracterizar su acumulación órgano-específica, además, se observó que este miRNA no tiene una acumulación detectable en plántulas y no responde al estímulo osmótico en las condiciones probadas. Se sabe que muchos de los miRNAs no-conservados en plantas tienen como blancos transcritos que codifican otras proteínas además de factores transcripcionales, lo cual es poco común para miRNAs conservados. MiR2119 es un miRNA particular, ya que su blanco es una enzima Alcohol Deshidrogenasa que se sabe está involucrada en la producción de etanol a través de la vía de fermentación. Se ha reportado que en plantas la fermentación alcohólica se lleva a cabo cuando estas son sometidas a limitación de oxígeno. Asimismo, miR2119 tiene la peculiaridad de ser co-transcrito con otro miRNA, miR398a, el cual ha sido caracterizado funcionalmente tanto en *A. thaliana* como en *M. truncatula*. Se sabe que este miRNA participa en la respuesta a déficit hídrico y que su blanco es la enzima superóxido dismutasa, la cual está involucrada en la conversión del radical superóxido en oxígeno molecular y en peróxido de hidrógeno, regulando así a las especies reactivas de oxígeno producidas durante numerosos estreses. De la Rosa-Urena en 2012 se encargó de caracterizar a Pvu-miR2119 en frijol, y observó una relación con la sequía, su relación con la expresión de miR398a, y su relación con sus respectivos blancos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados a la fecha, no se ha logrado entender claramente si existe una relación entre la regulación de dos estos miRNAs, uno conservado y otro no-conservado, así como en la regulación de sus blancos, cuya co-regulación no es clara en el contexto del estrés por déficit hídrico.

El objetivo de este trabajo fue comprobar la existencia de miRNAs específicos de leguminosas, que además respondieran al estrés por baja disponibilidad de agua en *M. truncatula*. Para ello se utilizaron herramientas bioinformáticas, se hizo uso de datos que aprovechan la tecnología de secuenciación masiva y se diseñaron experimentos que nos permitieran encontrar la relación entre estos miRNAs y el estrés. Los resultados obtenidos en este trabajo y sus alcances podrían considerarse como exploratorios en el campo del estudio de la función de estos miRNAs. Sin embargo las conclusiones obtenidas en este proyecto permitirán establecer las pautas para el estudio exhaustivo de la caracterización de estos miRNAs leguminosa-específicos en *M. truncatula*.

9. Conclusiones

- Los miRNAs Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 se encuentran en *M. truncatula* y se predicen blancos homólogos a los miRNAs de frijol.
- Mtr-miR1514 es un miRNA leguminosa-específico que se acumula en plántulas de *M. truncatula*. La evidencia en bases de datos de degradoma sugiere que regula a su blanco por corte y además genera phasiRNAs.
- Los Mtr-miR1514, Mtr-miR2119 y Mtr-miR2199 se acumulan diferencialmente en órganos y estadios de desarrollo de *M. truncatula*.
- La acumulación de Mtr-miR2199 aumenta por sequía en la raíz de plantas adultas de *M. truncatula*, en estas condiciones existe una correlación negativa entre la acumulación de Mtr-miR2199 y su blanco de regulación predicho.

De alcance metodológico

- Se definieron y caracterizaron condiciones de déficit hídrico en plántulas y plantas adultas de *M. truncatula*.
- Se estableció un método de cuantificación confiable de miRNAs poco abundantes en *M. truncatula*
- Se logró establecer un método de transformación transitoria de hojas de *M. truncatula*

10. Perspectivas

M. truncatula hoy en día es un modelo para el estudio de plantas leguminosas que resulta ser amigable debido a las características intrínsecas de la planta además de su extensa caracterización genómica, y las numerosas estrategias experimentales que se han desarrollado para el estudio en esta planta. Gracias a los resultados obtenidos podemos concluir que resulta conveniente continuar con el estudios de miRNAs en esta planta, extendiéndose las perspectivas futuras a un sinfín de experimentos que nos permita caracterizar funcionalmente a los miRNAs de interés en la condiciones de sequía, sin embargo para fines de este trabajo se plantean las siguientes perspectivas inmediatas;

- Comprobar la regulación del blanco de miR2199 por 5'RACE modificado en *M. truncatula*.
- Para validar la utilidad de la transformación transitoria de hojas en *M. truncatula*; medir la acumulación de miR398a y Mtr-miR2119 así como su blanco de regulación.
- Determinar la respuesta de Mtr-miR1514 y Mtr-miR2119 al estrés por déficit hídrico en plantas adultas de *M. truncatula*.

11. Referencias

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Sekic, M., Shinozakic, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. "Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling". *Plant Cell*, 15 :(2003) 63–78.

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K, "Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs indrought- and abscisic acid-regulated gene expression". *Plant Cell* 9 (1997):1859–1868.

Addo-Quaye, Charles, Tifani W. Eshoo, David P. Bartel y Michael J. Axtell. "Endogenous SiRNA and MiRNA Targets Identified by Sequencing of the Arabidopsis Degradome." *Current Biology* 18.10 (2008): 758-62.

Ané, Jean-Michel, Hongyan Zh y Julia Frugoli. "Recent Advances in *Medicago Truncatula* Genomics." *International Journal of Plant Genomics* 2008 (2008): 1-11.

Arazi, Tzahi, Mali Talmor-Neiman, Ran Stav, Maike Riese, Peter Huijser y David C. Baulcombe. "Cloning and Characterization of Micro-RNAs from Moss." *The Plant Journal* 43.6 (2005): 837-48.

Araújo, Susana De Sousa, Ana Sofia Roldão Lopes Amaral Duque, Dulce Maria Metelo Fernandes Dos Santos y Manuel Pedro Salema Fevereiro. "An Efficient Transformation Method to Regenerate a High Number of Transgenic Plants Using a New Embryogenic Line of *Medicago Truncatula* Cv. Jemalong." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78.2 (2004): 123-31.

Arenas-Huertero, Catalina, Beatriz Pérez, Fernando Rabanal, Daniel Blanco-Melo, Carlos La Rosa, Georgina Estrada-Navarrete, Federico Sanchez, Alejandra Alicia Covarrubias y José Luis Reyes. "Conserved and Novel MiRNAs in the Legume *Phaseolus Vulgaris* in Response to Stress." *Plant Molecular Biology* 70.4 (2009): 385-401.

Aukerman, M. J. "Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes." *The Plant Cell Online* 15.11 (2003): 2730-741.

Axtell, Michael J. y John L. Bowman. "Evolution of Plant MicroRNAs and Their Targets." *Trends in Plant Science* 13.7 (2008): 343-49.

Axtell, Michael J., Jakub O. Westholm y Eric C. Lai. "Vive La Différence: Biogenesis and Evolution of MicroRNAs in Plants and Animals." *Genome Biol Genome Biology* 12.4 (2011): 221.

Axtell, Michael J. "Classification and Comparison of Small RNAs from Plants." *Annual Review of Plant Biology Annu. Rev. Plant Biol.* 64.1 (2013): 137-59.

Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Datteé Y., Duc G., "*Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis". *Plant Molecular Biology Reporter* 8 (1990): 40—49.

Bartel, David P. "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136.2 (2009): 215-33.

Bartels D y Sunkar R. "Drought and salt tolerance in plants". *Crit RevPlant Sci* 24 (2005): 23–58.

Benedito VA, Torres-Jerez I, Murray JD, Andriankaja A, Allen S, Kakar K, Wandrey M, Verdier J, Zuber H, Ott T. "A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*". *Plant Journal* 55(2008): 504–513.

Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard .G, Rosenberg C., Barker D.G., "Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations". *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (2001): 695--700.

Boualem, Adnane, Philippe Laporte, Mariana Jovanovic, Carole Laffont, Julie Plet, Jean-Philippe Combier, Andreas Niebel, Martin Crespi y Florian Frugier. "MicroRNA166 Controls Root and Nodule Development in *Medicago truncatula*." *The Plant Journal* 54.5 (2008): 876-87.

Brodersen, P y O. Voinnet. "The Diversity of RNA Silencing Pathways in Plants." *Trends in Genetics* 22.5 (2006): 268-80.

Brodersen, P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth y O. Voinnet. "Widespread Translational Inhibition by Plant MiRNAs and SiRNAs." *Science* 320.5880 (2008): 1185-190.

Chen, H.-M., L.-T. Chen, K. Patel, Y.-H. Li, D. C. Baulcombe y S.-H. Wu. "22-nucleotide RNAs Trigger Secondary SiRNA Biogenesis in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.34 (2010): 15269-5274.

Chen, M., Y. Meng, C. Mao, D. Chen y P. Wu. "Methodological Framework for Functional Characterization of Plant MicroRNAs." *Journal of Experimental Botany* 61.9 (2010): 2271-280.

Chiassona D. M., Patrick C. Loughlina, Danielle Mazurkiewicz, Manijeh Mohammadidehcheshmeha, Elena E. Fedorovac, Mamoru Okamoto, Elizabeth McLeand, Anthony D. M. Glasse, Sally E. Smitha, Ton Bisseling, Stephen D. Tyerman, David A. Dayg, y Brent N. Kaisera, "Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH₄⁺ transport", *PNAS*, 13.111 (2014): 4814–4819

Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B., Hong, X., Agarwal, M. y Zhu, "ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*". *Genes Dev.* 17(2003): 1043–1054.

Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. y Kim, S.Y. "ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors". *J. Biol. Chem.* 275, (2000): 1723–1730.

Contreras-Cubas Cecilia, Palomar Miguel, Arteaga-Vázquez Mario, Reyes José L. y Covarrubias Alejandra A. "Non-coding RNAs in the Plant Response to Abiotic Stress." *Planta* 236 (2012): 943-58.

Contreras-Cubas Cecilia, Covarrubias, Alejandra A. y José Luis Reyes. "Chapter 7 Determining Abundance of MicroRNAs and Other Small RNAs in Legumes." *Legume Genomics Methods and Protocols*. By Cecilia Contreras-Cubas. Vol. 1069. New York Heidelberg Dordrecht London: Springer, n.d. 81-92. *Methods in Molecular Biology*. Web

Covarrubias, Alejandra A. y José L. Reyes. "Post-transcriptional Gene Regulation of Salinity and Drought Responses by Plant MicroRNAs." *Plant, Cell & Environment* 33 (2010): 481–489.

Cuperus, Josh T., Alberto Carbonell, Noah Fahlgren, Hernan Garcia-Ruiz, Russell T. Burke, Atsushi Takeda, Christopher M. Sullivan, Sunny D. Gilbert, Taiowa A. Montgomery, and James C. Carrington. "Unique Functionality of 22-nt MiRNAs in Triggering RDR6-dependent SiRNA Biogenesis from Target Transcripts in *Arabidopsis*." *Nat Struct Mol Biol Nature Structural & Molecular Biology* 17.8 (2010): 997-1003.

Dalmay, Tamas. *MicroRNAs in Development: Methods and Protocols*. New York: Springer, 2011

De La Rosa-Urena C. "Análisis Funcional De Un MicroRNA De Leguminosas, MiR2119 En Respuesta a Déficit Hídrico." Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma De México, 2012.

Derveaux S, Vandessompele J, Hellemans J, "How to do successful gene expression analysis using real-time PCR", Jan Hellemans, *Methods* 50 (2010): 227–230

Devers, Emanuel A., Anja Branscheid, Patrick May, and Franziska Krajinski. "Stars and Symbiosis: MicroRNA- and MicroRNA*-Mediated Transcript Cleavage Involved in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis." *Plant Physiology* 156.4 (2011): 1990-2010.

Díaz-Camino, Claudia, Padmanaban Annamalai, Federico Sanchez, Aardra Kachroo, and Said A. Ghabrial. "An Effective Virus-based Gene Silencing Method for Functional Genomics Studies in Common Bean." *Plant Methods* 7.1 (2011): 16.

Estrada-Navarrete Georgina, Alvarado-Affantranger Xochitl, Olivares Juan-Elías, Guillén Gabriel, Claudia Díaz-Camino, Campos Francisco, Quinto Carmen, Gresshoff Peter M, and Federico Sanchez. "Fast, Efficient and Reproducible Genetic Transformation of *Phaseolus Spp.* by *Agrobacterium Rhizogenes.*" *Nature Protocols* 2.7 (2007): 1819-824.

Farooq, M., A. Wahid, and N. Kobayashi. "Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management." *Agronomy for Sustainable Development* 29.1 (2009): 185-212.

Formey, Damien, Luis Pedro Iñiguez, Pablo Peláez, Yong-Fang Li, Ramanjulu Sunkar, Federico Sánchez, José Luis Reyes, and Georgina Hernández. "Genome-wide Identification of the *Phaseolus Vulgaris* SRNAome Using Small RNA and Degradome Sequencing." *BMC Genomics* 16.1 (2015)

Franco-Zorrilla, José Manuel, Adrián Valli, Marco Todesco, Isabel Mateos, María Isabel Puga, Ignacio Rubio-Somoza, Antonio Leyva, Detlef Weigel, Juan Antonio García, and Javier Paz-Ares. "Target Mimicry Provides a New Mechanism for Regulation of MicroRNA Activity." *Nature Genetics Nat Genet* 39.8 (2007): 1033-037.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature". *Nucleic Acids Res* 34(2006):140–D144.

Harb A., Krishnan A., Madana M.R., Pereira A., "Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis Reveals Early Responses Leading to Acclimatation in Plant Growth", *Plant Physiology*, Vol. 154 (2010): 1254-1271.

Heim, M. A. "The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity." *Molecular Biology and Evolution* 20.5 (2003): 735-47.

Hugouvieux V., Kwak J.M. & Schroeder J.I. "An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis". *Cell* 106 (2001): 477–487.

Ingram J. y Bartels D. "The molecular basis of dehydration tolerance in plants". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47 (1996): 377–403

Jagadeeswaran G, Zheng Y, Li YF, Shukla LI, Matts J, Hoyt P, Macmil SL, Wiley GB, Roe BA, Zhang W, Sunkar, "Cloning and characterization of small RNAs from *Medicago truncatula* reveals four novel legume-specific microRNA families" *RNew Phytol* 184. (2009):85-98.

Jian-Kang Zhu. "Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plant." *Annu Rev Plant Biol.* 53 (2002): 247-73.

Jean-Michel Ané, Hongyan Zhu, and Julia Frugoli. "Recent Advances in Medicago Truncatula Genomics." *International Journal of Plant Genomics* 2008 (2008): 1-11.

Jones-Rhoades, Matthew W., David P. Bartel, and Bonnie Bartel. "MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS." *Annual Review of Plant Biology* 57.1 (2006): 19-53.

Kakar K, Wandrey M, Czechowski T, Gaertner T, Scheible W-R, Stitt M, Torres-Jerez I, Xiao Y, Redman JC, Wu HC, Cheung F, Town CD and Udvardi MK, "A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*", *Plant Methods*, 4:18 (2008).

Karas, B., L. Amyot, C. Johansen, S. Sato, S. Tabata, M. Kawaguchi, and K. Szczygłowski. "Conservation of Lotus and Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Proteins Reveals New Players in Root Hair Development." *Plant Physiology* 151.3 (2009): 1175-185.

Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A., "Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation". *Trends Plant Sci.* 2002; 7(5): 193-195.

Kurihara, Y. "The Interaction between DCL1 and HYL1 Is Important for Efficient and Precise Processing of Pri-miRNA in Plant MicroRNA Biogenesis." *Rna* 12.2 (2005): 206-12.

Kozomara, A., and S. Griffiths-Jones. "MiRBase: Annotating High Confidence MicroRNAs Using Deep Sequencing Data." *Nucleic Acids Research* 42.D1 (2013).

Kwapata, Kingdom, Thang Nguyen, and Mariam Sticklen. "Genetic Transformation of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) with the Gus ColorMarker." *International Journal of Agronomy* (2012)

Lewis, Ricky W, Guiliang Tang, and David H McNear Jr. "Morphological and Genetic Changes Induced by Excess Zn in Roots of Medicago Truncatula A17 and a Zn Accumulating Mutant." *BMC Genomics* 5:657 (2012): 3-14.

Li, W.-X., Y. Oono, J. Zhu, X.-J. He, J.-M. Wu, K. Iida, X.-Y. Lu, X. Cui, H. Jin, and J.-K. Zhu. "The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance." *The Plant Cell Online* 20.8 (2008): 2238-251.

Li, Yang, Chaoqun Li, Guohui Ding, and Youxin Jin. "Evolution of MIR159/319 MicroRNA Genes and Their Post-transcriptional Regulatory Link to SiRNA Pathways." *BMC Evol Biol BMC Evolutionary Biology* 11.1 (2011): 122.

Llave, C. "Cleavage of Scarecrow-like mRNA Targets Directed by a Class of Arabidopsis MiRNA." *Science* 297.5589 (2002): 2053-056.

Long, Rui-Cai, Ming-Na Li, Jun-Mei Kang, Tie-Jun Zhang, Yan Sun, and Qing-Chuan Yang. "Small RNA Deep Sequencing Identifies Novel and Salt-stress-regulated MicroRNAs from Roots of Medicago Sativa and Medicago Truncatula." *Physiol Plantarum Physiologia Plantarum* 154.1 (2014): 13-27.

Lu, Cheng,y Nina Fedoroff. "A Mutation in the Arabidopsis HYL1 Gene Encoding a DsRNA Binding Protein Affects Responses to Abscisic Acid, Auxin, and Cytokinin." *The Plant Cell* 12.12 (2000): 2351.

Mallory, Allison C., Diana V. Dugas, David P. Bartel, and Bonnie Bartel. "MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs." *Current Biology* 14.12 (2004): 1035-046.

Mallory, A., and H. Vaucheret. "Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins." *The Plant Cell* 22.12 (2010): 3879-889.

Manavella, P. A., D. Koenig, and D. Weigel. "Plant Secondary siRNA Production Determined by MicroRNA-duplex Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.7 (2012): 2461-466.

Matsushima, R. "NAI1 Gene Encodes a Basic-Helix-Loop-Helix-Type Putative Transcription Factor That Regulates the Formation of an Endoplasmic Reticulum-Derived Structure, the ER Body." *The Plant Cell Online* 16.6 (2004): 1536-549

Nakano, M. "Plant MPSS Databases: Signature-based Transcriptional Resources for Analyses of mRNA and Small RNA." *Nucleic Acids Research* 34.90001 (2006).

Naya Loreto, Sujay Paul, Oswaldo Valdés-López, Ana B. Mendoza-Soto, Bárbara Nova-Franco, Guadalupe Sosa-Valencia, José L. Reyes, Georgina Hernández¹, "Regulation of Copper Homeostasis and Biotic Interactions by MicroRNA 398b in Common Bean". *PlosONE*.9 (2014).

Olsen, Addie Nina, Heidi A. Ernst, Leila Lo Leggio, and Karen Skriver. "NAC Transcription Factors: Structurally Distinct, Functionally Diverse." *Trends in Plant Science* 10.2 (2005): 79-87.

Palatnik J.F, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. "Control of leaf morphogenesis by microRNAs". *Nature* 425, (2003): 257–263.

Pereira, Andy. *Plant Reverse Genetics: Methods and Protocols*. New York: Humana, 2011

Qin, Zhengrui, Chunlian Li, Long Mao, and Liang Wu. "Novel Insights from Non-conserved MicroRNAs in Plants." *Frontiers in Plant Science Front. Plant Sci.* 5 (2014).

Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25: 141–151.

Reyes, José L., and Nam-Hai Chua. "ABA Induction of MiR159 Controls Transcript Levels of Two MYB Factors during Arabidopsis Seed Germination." *The Plant Journal* 49.4 (2007): 592-606.

Reinhart B J, Weinstein E G, Rhoades M W, Bartel B, Bartel D P, "MicroRNAs in plants" , *GenesDev*, 16 (2002): 1616–1626.

Reynoso, Mauricio Alberto, Flavio Antonio Blanco, Julia Bailey-Serres, Martín Crespi, and María Eugenia Zanetti. "Selective Recruitment of mRNAs and miRNAs to Polyribosomes in Response to Rhizobia Infection in *Medicago truncatula*." *The Plant Journal* 73.2 (2013): 289-301.

Rhoades, Matthew W., Brenda J. Reinhart, Lee P. Lim, Christopher B. Burge, Bonnie Bartel, and David P. Bartel. "Prediction of Plant MicroRNA Targets." *Cell* 110.4 (2002): 513-20.

Rose, Ray J. "Medicago Truncatula as a Model for Understanding Plant Interactions with Other Organisms, Plant Development and Stress Biology: Past, Present and Future." *Functional Plant Biology Functional Plant Biol.* 35.4 (2008): 253.

Rose, Ray J. "Capítulo 15. Transient Gene Expression in *Medicago Truncatula* Leaves via Agroinfiltration." *Legume Genomics: Methods and Protocols*. 2013.

Soares-Capitão Cláudio Francisco, "The Feedback Regulation of miRNA Biogenesis in Response to Water Deficit in *Medicago Truncatula*." Thesis. Universidade De Lisboa, 2009.

Stevens, Jeffrey D., Eric H. Roalson, and Michael K. Skinner. "Phylogenetic and Expression Analysis of the Basic Helix-loop-helix Transcription Factor Gene Family: Genomic Approach to Cellular Differentiation." *Differentiation* 76.9 (2008): 1006-042.

-
-
- Sunkar, R. "Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from Arabidopsis." *The Plant Cell Online* 16.8 (2004)
- Sunkar, R. "Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in Arabidopsis Is Mediated by Downregulation of MiR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance." *The Plant Cell Online* 18.8 (2006): 2051-065.
- Sunkar, Ramanjulu, and Guru Jagadeeswaran. "In Silico Identification of Conserved MicroRNAs in Large Number of Diverse Plant Species." *BMC Plant Biology* 8.1 (2008): 37.
- Sunkar, Ramanjulu. "MicroRNAs with Macro-effects on Plant Stress Responses." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21.8 (2010): 805-11.
- Toledo-Ortiz, G. "The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family." *The Plant Cell Online* 15.8 (2003): 1749-770.
- Tran, L.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S.D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. "Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis". *Plant J.* 49, (2006) 46–63.
- Trindade, Inês, Cláudio Capitão, Tamas Dalmay, Manuel Pedro Fevereiro, and Dulce Metelo Dos Santos. "MiR398 and MiR408 Are Up-regulated in Response to Water Deficit in *Medicago truncatula*." *Planta* 231.3 (2010): 705-16.
- Turner, Marie, Sajag Adhikari, and Senthil Subramanian. "Optimizing Stem-loop QPCR Assays through Multiplexed cDNA Synthesis of U6 and miRNAs." *Plant Signaling & Behavior* 8.8 (2013)
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP, "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs", *Plant Methods* (2007), 3:12
- Velarde-Garduño D. A. "Mecanismos Moleculares De La Regulación Por MiR2199 De Frijol (*Phaseolus Vulgaris*) En Respuesta Al Déficit Hídrico." Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma De México, 2012.
- Voinnet, Olivier. "Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs." *Cell* 136.4 (2009): 669-87.
- Wang, J.-W. "Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis." *The Plant Cell Online* 17.8 (2005): 2204-216.
- Wang Tianzuo, Chen Lei, Zhao Mingui, Tian Qiuying, Zhang Wen-Hao, "Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide highthroughput Sequencing", *BMC Genomics* , (2011) 12:367.
- Windels, David, Dawid Bielewicz, Miryam Ebner, Artur Jarmolowski, Zofia Szweykowska-Kulinska, and Franck Vazquez. "MiR393 Is Required for Production of Proper Auxin Signalling Outputs." *PLoS ONE* 9.4 (2014).
- Xinbin Dai and Patrick X. Zhao, psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server, *Nucleic Acids Research*, 2011.
- Xie, Z., E. Allen, N. Fahlgren, A. Calamar, S. A. Givan, and J. C. Carrington. "Expression of Arabidopsis MIRNA Genes." *Plant Physiology* 138.4 (2005): 2145-154.
-
-

Xiong L., Gong Z., Rock C.D., Subramanian S., Guo Y., Xu W., Galbraith D. & Zhu J.K. Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Developmental Cell* 1 (2001), 771–781.

Xiong, L., H. Lee, M. Ishitani, Y. Tanaka, B. Stevenson, H. Koiwa, R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, and J.-K. Zhu. "Repression of Stress-responsive Genes by FIERY2, a Novel Transcriptional Regulator in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.16 (2002).

Yamaguchi-Shinozaki K. y Kazuo Shinozaki. "Transcriptional Regulatory Networks In Cellular Responses And Tolerance To Dehydration And Cold Stresses." *Annual Review of Plant Biology* 57.1 (2006): 781-803.

Young, N. "Legume Genomes: More than Peas in a Pod." *Current Opinion in Plant Biology* 6.2 (2003): 199-204

Young, Nevin D, and Arvind K. Bharti. "Genome-Enabled Insights into Legume Biology." *Annual Review of Plant Biology* 63 (2012): 283-305.

Yu, B. "Methylation as a Crucial Step in Plant MicroRNA Biogenesis." *Science* 307.5711 (2005): 932-35.

Zhai, J., D.-H. Jeong, E. De Paoli, S. Park, B. D. Rosen, Y. Li, A. J. Gonzalez, Z. Yan, S. L. Kitto, M. A. Grusak, S. A. Jackson, G. Stacey, D. R. Cook, P. J. Green, D. J. Sherrier, and B. C. Meyers. "MicroRNAs as Master Regulators of the Plant NB-LRR Defense Gene Family via the Production of Phased, Trans-acting siRNAs." *Genes & Development* 25.23 (2011): 2540-553.

Zhang, X., Z. Zou, P. Gong, J. Zhang, K. Ziaf, H. Li, F. Xiao, and Z. Ye. "Over-expression of MicroRNA169 Confers Enhanced Drought Tolerance to Tomato." *Biotechnology Letters* 33.2 (2011): 403-09.

Zhao, Botao, Ruqiang Liang, Liangfa Ge, Wei Li, Huasheng Xiao, Hongxuan Lin, Kangcheng Ruan, and Youxin Jin. "Identification of Drought-induced MicroRNAs in Rice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354.2 (2007): 585-90.

Zhao, Botao, Liangfa Ge, Ruqiang Liang, Wei Li, Kangcheng Ruan, Hongxuan Lin, and Youxin Jin. "Members of MiR-169 Family Are Induced by High Salinity and Transiently Inhibit the NF-YA Transcription Factor." *BMC Molecular Biology* 10.1 (2009): 29.

Zuker, M. "Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction." *Nucleic Acids Research* 31.13 (2003): 3406-415.

12. Anexo A

Tabla 1. Sondas antisentido para *Northern blot* de miRNAs

miRNA	Secuencia
Asmtr-U6snRNA	(5'→3'): CCA ATT TTA TCG GAT GTC CCC G
Asmtr-2119	(5'→3'): CTA CTC CAC ACC TCC CTT TGA
Asmtr-2199	(5'→3'): GTG ATC CGT GCT AGT GTA TCA

Tabla 2. Oligonucleótidos para la cuantificación de miRNAs mediante el método *stem-loop*, la secuencia en rojo indica los nucleótidos que aparean con el transcrito del miRNA o el gen de referencia U6 snRNA

miRNA	Oligo RT (5'→3')	Oligo Fw (5'→3')
mtr-U6snRNA	GTGCAGGGTCCGAGGT TTTGGACCATTCTCGA T	GAGAAGATTAGCATGGCCCT
mtr-miR1514	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG CAATGC	CCGGCGTTCATTTCTAAAATAG
mtr-miR2119	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG CTACTC	ACATTCTCAAAGGGAGGTGTG
mtr-miR2199	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACG GTGATC	GTCGCTTGATACACTAGCACC

Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación de los blancos de mtr-miR2199 y genes internos de referencia

Gen	Oligo Fw (5'→3')	Oligo Rv (5'→3')
Medtr7g080780	ATGAAGAAGACAGCATGACCA	GCTCACAACTTTTCTCTTCA
Medtr4g009540	TGGTGGGTACAAAGTGACAG	TTATTAAGGAGAACCAACTG
mtr-eiFa	TGTCATTGGCCATGTGCACTCTGG	GAACCCAAGCATACTTGAATGAAC
mtr-UBQ	GCAGATAGACACGCTGGGA	AACTCTTGGGCAGGCAATAA
mtr-GAPDH	TGCCTACCGTCGATGTTTCAGT	TTGCCCTCTGATTCCTCCTTG

Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación de pre-miR398a-2119

Oligo	Secuencia
Mtr-398_2119Fw	(5'→3'): CAC CAA ATG TGT TGT CTT TCT CG
Mtr-398_2119RX1	(5'→3'): ATC ATG GTG CTA TTG GGC TG
3pENTinner	(5'→3'): CAA GAA AGC TGG GTC GGC GC
pENT-Not	(5'→3'): TCC GCG GCC GCC TTG TTT AAC

Tabla 5. Curvas de eficiencia de los transcritos o miRNAs cuantificados

Transcrito	Temperatura de amplificación	Diluciones utilizados en la curva de eficiencia	Curva de eficiencia	Coefficiente de correlación (R2)	Eficiencia
miR159	56°C	0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005	y=-3.171x+18.307	0.987	106.700%
miR1514	56°C	1.0, 0.2, 0.04, 0.01, 0.002	y=-3.255+27.276	0.956	102.880%
miR2119	56°C	0.1, 0.02, 0.004, 0.001, 0.00016	y=-2.974x+26.446	0.985	116.883%
miR2199	56 °C	0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.0001	y=-3.14x+27.221	0.982	108.205%
U6 snRNA	56°C	1.0, 0.1, 0.001, 0.0001, 0.00001	y=-3.93x+10.414	0.998	97.109%
Medtr7g080780	55°C	0.2, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005	y=-3.375+21.003	0.982	97.828%
Medtr4g009540	ND	ND	ND	ND	ND
mtr-eiFa	58°C	0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005	y=-3.54x+14.103	0.998	91.663%
mtr-UBQ	58°C	0.5, 0.1, 0.05, 0.001, 0.0005	y=-3.348x+25.858	0.990	98.915 %
mtr-GAPDH	55°C	0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005	y=-3.442x+14.697	0.995	95.207%

ND. No detectable

13. Anexo B

Medio Fahraerus

Soluciones stock 1000X			
Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Concentración (g/100mL)	Concentración (M)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.014	11.4	0.78
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	12	0.49
Citrato férrico	244.94	0.5	0.02
KH ₂ PO ₄	136.1	10	0.73
Na ₂ HPO ₄	141.96	13.13	0.92

NOTA: Los fosfatos pueden prepararse juntos

NOTA: El citrato férrico se disuelve al autoclavar

Solución stock de microelementos 1000X			
Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Concentración (g/L)	Concentración (mM)
KCl	74.55	3.73	50.0
H ₃ BO ₃	61.83	1.55	25.1
MnSO ₄ H ₂ O	169.01	0.85	5.0
CuSO ₄ 5H ₂ O	249.604	0.13	0.5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	287.6	0.58	2.0
Na ₂ MoO ₄	205.91	0.018	0.1

Solución stock de nitrato 100x			
Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Concentración (g/100mL)	Concentración (M)
KNO ₃	101.1	8.098	0.8

14. Anexo C

Método de síntesis *Multiplex* de cDNA de miRNAs por *stem-loop*, modificado de Axtell

1. Preparar un *stock* de RNA en agua a una concentración de 125 ng/μl. Se requieren al menos 8μl del stock
2. El stock de RNA se trata con DNasaI (*Thermo Scientific* # EN0521)
 - 8 μl RNA (125 ng/μl)
 - 1 μl 10 x DNasa Buffer
 - 1 μl DNasa I (1U/μl)

Se incuba por 30 min a 37°C, posteriormente se detiene la reacción con 1μL de EDTA 50 mM, finalmente se incuba por 10 min a 65 °C, las muestras de RNA DNasado deberá utilizarse inmediatamente de lo contrario se recomienda su almacenamiento en condiciones de congelación.

3. Para cada muestra de RNA distinta se tiene una muestra +RT y un control negativo -RT, además por cada experimento se debe de contemplar un control no-RNA.
4. Transcripción reversa pulsada *Multiplex*

Un oligonucleótido miRNA *stem-loop* específico es utilizado para la síntesis de cDNA de miRNAs, se ha comprobado la amplificación por RT-qPCR de hasta 4 miRNAs diferentes en la misma muestra de cDNA, además se utiliza un oligonucleótido de U₆ snRNA (gen de referencia), por lo que el mismo cDNA es utilizado para la cuantificación de los miRNAs y el gen de referencia.

Se recomienda la preparación de un *Master-Mix* si se trabajara con más de una muestra. El *Master-Mix* deberá contener lo siguiente por cada muestra de RNA distinta;

- 0.75 μl de oligonucleótido miRNA *stem-loop* específico 1μM por cada miRNA que se requiera cuantificar
- 0.25 μl de oligonucleótido U₆ snRNA 1 μM
- 1 μl de mix dNTPs 10 mM
- Se completa a un volumen de 14.5 μl con agua libre de RNAsas

Se distribuye 14.5 μl en tubos individuales de PCR y se adicionan 2 μl del RNA tratado de DNasa. Para el control no-RNA se adicionan 2 μl de agua libre de RNAsas. Lo anterior se realiza en hielo.

Las muestras se colocan 5 min a 65°C para desnaturalizar el RNA. Pasados los 5 min se colocan los tubos en hielo por al menos 60 s.

Síntesis de cDNA

Se recomienda la preparación de un *Master-Mix* cuando se trabaje con más de una muestra, debe tomarse en cuenta que cada muestra distinta de RNA tendrá su control negativo –RT y que además se tiene un control no-RNA. El *Master-Mix* deberá contener lo siguiente por cada muestra:

- 4 µl del *Buffer* de reacción 5X (*Thermo Scientific* # EP0441)
- 0.1 µl del inhibidor de RNasas Ribolock 40U/µl (*Thermo Scientific* #E00381)

Se adicionan 4.1 µl del *Master-Mix* anterior a cada muestra –RT

- 0.25 µl RevertAid 200U/µl (*Thermo Scientific* # EP0441)

Se distribuyen 4.35 µl del Master con RevertAid por cada muestra +RT y control no-RNA.

Finalmente se realiza la reacción pulsada de RT

Paso 1: 30 min a 16°C

Paso 2: 30 s a 30°C

Paso 3: 30 s a 42°C

Paso 4: 1 s a 50°C

Paso 5: se va del paso 2 al 4 59 veces más

Paso 6: 15 min a 70°C (para detener la reacción)

El cDNA puede almacenarse a 20°C si se utilizará en la próxima semana, de lo contrario se recomienda almacenarlo a -70°C.

15. Anexo D

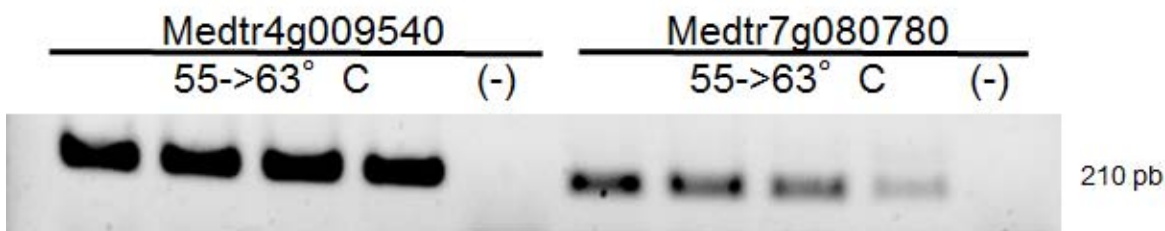


Figura A. Amplificación de los blancos de miR2199 en gDNA. Gel de agarosa al 1.0% teñido con Bromuro de etidio con las muestras de PCR de la amplificación de Medtr4g009540 y Medtr7g080780 a partir de DNA genómico.

```

mtr-7g780   ATGGATGAAGAAGACAGCATGACCAATGGATGACCTGTGGAAAATCTGAGAAAATATCTA 60
mtr-4g540   ATGGGTGGTGGGTACAAAGTGACAGTGAATGATCTAGTGAAAAGCATTAGGAAAGTGCTA 60
            ****.*.:*.. ***..****.*.*.*** **.*.*.*.*.* **.*.* : ***
mtr-7g780   TTGAAACTCATGAGAGTTACTTGTGATCCGTTCTAGTGCATCAAAATAAAGGAGTTCTC 120
mtr-4g540   TTGAAATAAGATGTGA-----AAGTGATCCGTTACTAGTGTATCAAAAAAAAAATATTAGA 115
            ***.*.:* : ***:** :*****:***** *****:***..*.*. .
mtr-7g780   CATTTGTAATTATAATAATGGAATGAGGATATTTTGAGAAATCGTTTCTATTTTGTGGA 180
mtr-4g540   ACAAGTTCCTATTG--TGTTGGAAT-TGCAAGTTT--TAATCTATGCTCTTTT----- 164
            ..::**.*.:*.*. :.***** :* *:.**** :.*:** :* **.*****
mtr-7g780   TTGGTTTGTTTTCTTGTGTTGTCACATGAAGAGAAAAGGTTGTGAGCATG 230
mtr-4g540   TAGGTTT-TTATATAGTTTGTTCAGTGTGGTTCTCCTTAATAAAG--- 210
            *.***** **.*.:***** :** **:*.*. :.:. *:.*.*.
    
```

Figura B. Alineamiento de los blancos predichos de Mtr-miR2199. En rojo se marca la secuencia de apareamiento con los oligonucleótidos utilizados para su amplificación por PCR, subrayados en amarillo se señala el apareamiento con el miRNA

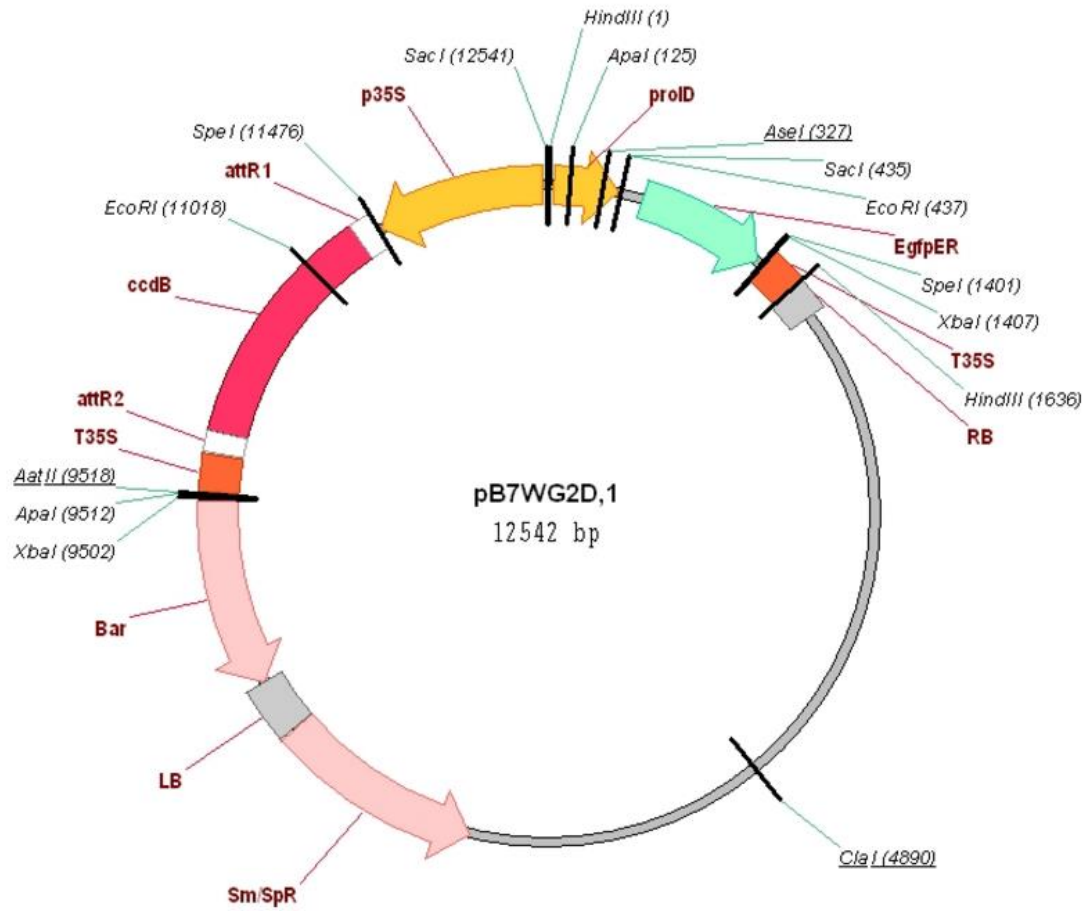


Figura C. Esquema del vector pB7WG2D