



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DE pvu-miR1514a Y SU
PARTICIPACIÓN ANTE EL DÉFICIT HÍDRICO EN FRIJOL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
BIÓL. GUADALUPE SOSA VALENCIA

TUTOR PRINCIPAL
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (IIB-
UNAM)

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT-UNAM)

TUTORA INVITADA
DRA. ALEJANDRA A. COVARRUBIAS ROBLES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (IBT-UNAM)

CUERNAVACA; MORELOS. MAYO 2017



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.

Este trabajo se realizó para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Laboratorio de la Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles perteneciente al Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología (IBT) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Recibí financiamiento mediante una beca para realizar estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 239786, además de contar con el apoyo económico de los proyectos DGAPA-PAPIIT (IN-205015) (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) y CONACYT (151571) a JLR.

El comité tutorial se conformó por el Dr. Juan Miranda Ríos, el Dr. Enrique Merino Pérez y como tutora invitada la Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles y fungiendo como tutor principal el Dr. José Luis Reyes Taboada. Por otra parte, el comité evaluador del examen de grado se compuso por la Dra. Esperanza Martínez Romero siendo Presidenta, el Dr. José Luis Reyes Taboada como secretario y en función de vocales los doctores Dr. Christian Sohlenkamp, la Dra. Leonor Pérez Martínez y finalmente la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez.

Agradecimientos académicos:

Al Dr. José Luis Reyes (Pepe), por su infinita paciencia hacia conmigo, por sus enseñanzas por sus consejos, ayuda, aportaciones a mi trabajo, por confiar en mi y su amistad.
MUCHAS GRACIAS :)

A la Dra. Alejandra Covarrubias (jefa), por motivarme a realizar una buena ciencia, por sus valiosas observaciones y críticas, además por formar parte de su grupo de trabajo.

A mi comité tutorial por aportarme tanto en todos estos años, así como a mi comité jurado de mi examen de grado por revisar y evaluar mi trabajo de tesis.

A todo los miembros del laboratorio 22 del Departamento de biología molecular de plantas perteneciente al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por sus comentarios, por toda su ayuda, así como hacer más ameno y divertido este periodo en el laboratorio.

Agradecimientos personales:

A mi mamá, a mi hermanita favorita y a mi papá, por todo su apoyo y amor siempre.

A mis amigos y a TODOS los que me apoyaron/ayudaron a levantarme cuando INFINIDAD de veces los ánimos cayeron muy al fondo y que me faltaría espacio en esta hoja para agradecerles, saben muy bien quienes son. ¡A ell@s muy especialmente!

¿Qué otra cosa vislumbras en la lejanía, allá en el abismo del tiempo?

William Shakespeare - La tempestad.

RESUMEN.

Recientes estudios en *Phaseolus vulgaris* (frijol) han identificado elementos de regulación genética a nivel post-transcripcional que participan en respuesta a contender contra el estrés abiótico, en el que se incluye el déficit hídrico. Se ha reportado que miR1514a es un microRNA específico de leguminosas que se induce en condiciones de déficit hídrico, además de estar presente en la familia de las leguminosas.

En este trabajo determinamos que miR1514a muestra un nivel de acumulación diferencial en variedades contrastantes a la sequía en diversos tejidos en la planta, así como en diferentes estadios de desarrollo, acumulándose significativamente en raíces.

Por otro lado, miR1514a regula post-transcripcionalmente a dos transcritos de factores transcripcionales tipo NAC Phvul.010g121000 (NAC 000) y Phvul.010g120700 (NAC 700), sin embargo en raíces de frijol sometidas a déficit hídrico sólo Phvul.010g120700 (NAC 700) está presente. Además, mediante la aplicación de un algoritmo bioinformático en bibliotecas de ARNs pequeños de frijol, descubrimos que miR1514a produce phasiRNAs a partir del sitio de corte con el transcrito de NAC 700, los cuales muestran una acumulación diferencial a lo largo de cinéticas de déficit hídrico.

Así mismo, demostramos que la regulación de los niveles de acumulación de miR1514a afectan directamente al módulo miR1514a/NAC 700/phasiRNAs, esto mediante la modulación de los niveles de acumulación de miR1514a en “*hairy roots*” de frijol. Más aún, encontramos que algunos phasiRNAs derivados de NAC 700 están presentes en otras leguminosas e inclusive están asociados a AGO-1, lo que sugiere su funcionalidad.

Finalmente, el transcriptoma de “*hairy roots*” con niveles reducidos de miR1514a reveló transcritos con distintos niveles de acumulación, destacando genes involucrados en el metabolismo y respuesta a estrés, proponiendo que estos cambios son regulados por factores transcripcionales de tipo NAC y/o por phasiRNAs. En conjunto, describimos una nueva función de miR1514a en la regulación del factor transcripcional de tipo NAC 700 mediante la producción de phasiRNAs en frijol bajo condiciones de déficit hídrico, sugiriendo ser un mecanismo conservado en la familia *Fabaceae* en respuesta al déficit hídrico.

ABSTRACT

Recent studies in *Phaseolus vulgaris* (common bean) have identified different post-transcriptional regulation factors participating during abiotic stresses, in particular under water deficit conditions. We characterized miR1514a, which is a non-conserved microRNA present only in the legume family, and miR1514a have a differential accumulation levels in two common bean cultivars with distinct drought resistance, where roots tissues shown the most significant accumulation level.

On the other hand, miR1514a targets two transcripts encoding proteins belonging to the NAC family of transcription factors (Phvul.010g121000 (NAC 000) and Phvul.010g120700 (NAC 700), however in roots of common bean under water deficit only NAC 700 is present, and a recent deep sequencing analysis of small RNAs indicated that only Phvul.010g120700 produces phasiRNAs from the miR1514a site of cleavage. PhasiRNAs derived from NAC 700 show different expression levels during water deficit.

The miR1514a/NAC 700/phasiRNAs regulatory module was confirmed when we regulated the miR1514a activity in *hairy roots* of common bean. Moreover, some phasiRNAs generated from NAC 700 are conserved in others members of legume family and additionally they are loaded into AGO-1, suggesting that they may be functional.

Finally, a transcriptome analysis of transgenic roots with reduced miR1514a levels revealed several differentially expressed transcripts, mainly involved in metabolism and stress responses, suggesting they are directly regulated by the NAC TF and/or by phasiRNAs. Altogether, we uncovered a role for the non-conserved miR1514a in the regulation of a NAC transcription factor and phasiRNA production in common bean, suggesting their participation during water deficit stress responses in legumes.

ÍNDICE

RESUMEN.	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ABREVIATURAS.	8
INTRODUCCIÓN.	10
<i>Phaseolus vulgaris</i> (FRIJOL).	10
El origen y domesticación de frijol.....	11
Importancia económica del frijol.	12
El estrés abiótico en plantas: déficit hídrico.....	12
Los ARNs pequeños no codificantes en plantas.	14
Los microRNAs.	18
La descripción de los phased secondary siRNAs (phasiRNAs) y los trans-acting siRNAs (tasiRNAs).....	27
¿Qué se conoce sobre de microRNAs, phasiRNAs y tasiRNAs en frijol bajo déficit hídrico?.....	30
HIPÓTESIS.	32
OBJETIVO GENERAL.	32
OBJETIVOS PARTICULARES.	32
RESULTADOS.	32
La determinación de los <i>loci</i> de miR1514a en frijol.....	32
El miR1514a presenta un nivel de acumulación diferencial en raíces de frijol en dos cultivares con tolerancia a la sequía contrastante.	34
El miR1514a regula a dos factores transcripcionales de la familia NAC en condiciones de déficit hídrico.	38
El transcrito de NAC 700 es procesado por miR1514a produciendo phasiRNAs.....	43
La modulación de los niveles de miR1514a tiene un efecto directo sobre la abundancia del transcrito NAC 700 y de los phasiRNAs derivados de este.	50
La asociación de phasiRNA-1 con AGO-1.....	53
El efecto de la modulación de miR1514a.	55
El análisis de motivos de ADN en la región 1 kb arriba del sitio de inicio de la transcripción en los transcriptomas con expresión alterada de miR1514a.	62
DISCUSIÓN.	65
El miR1514a en frijol presenta una expresión diferencial durante el déficit hídrico.	65
El miR1514a modula post-transcripcionalmente a NAC 700.....	66
NAC 700 es generador de phasiRNAs	67
Transcritos potencialmente regulados por NAC 700.	72

CONCLUSIONES.	74
Con respecto a miR1514a:	74
Con respecto a phasiRNA 1:	74
Con respecto a la función de NAC:	74
PERSPECTIVAS.	75
Sobre miR1514a:	75
Sobre phasiRNAs generados por NAC 700:	75
Sobre NAC 700:	75
MATERIALES Y MÉTODOS.	77
Material biológico y condiciones de crecimiento:	77
Aislamiento de RNA y análisis tipo Northern blot.	78
Análisis tipo Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR):	78
Inmunoprecipitación de AGO-1.	79
Construcción de los plásmidos empleados en este estudio y la generación de <i>hairy roots</i> de frijol.	80
Experimentos de secuenciación masiva de ARN y análisis de ontología en raíces <i>hairy roots</i> de frijol.	81
Análisis <i>in silico</i> para el descubrimiento de motivos en la región 1 kb río arriba del inicio de la transcripción de los genes presentes en el análisis de secuenciación masiva de ARN y en la comparación entre genes NAC:	82
Predicción de mensajeros blanco de los phasiRNAs provenientes de NAC 700:	82
REFERENCIAS	84
NOTAS FINALES.	98
ANEXOS.	
Anexo 1.	91
Anexo 2.	106
Anexo 3.	112
Anexo 4.	115
Anexo 5.	115
Anexo 6.	116
Anexo 7.	118
Anexo 8.	119
Anexo 9.	120
Anexo 10.	121
Anexo 11.	122
Anexo 12.	123
Anexo 13.	126
Anexo 14.	127
Anexo 15.	128
Anexo 16.	129
Anexo 17.	130
Anexo 18.	131

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

ADNc - ADN complementario o ADN copia

AGO-1 –por sus siglas en inglés Argonaute-1, Argonauta-1.

ARN - Ácido ribonucleico.

ARNm - Ácido ribonucleico mensajero.

BM – Bayo Madero.

CC – Capacidad de campo.

miRNA – abreviación de microRNA.

microRNA* - microRNA estrella.

NAC TF – por sus siglas en inglés No Apical Meristem (NAM), Arabidopsis transcription activator factor 1/2 and Cup-Shaped Cotyledon 2; y por Transcription Factor.

nt- nucleótidos.

pb – pares de bases.

phasiRNA – por sus siglas en inglés phased secondary small interfering RNAs. ARN interferentes, secundarios, pequeños y en fase.

pre-microRNA ó pre-miRNA – Precursor de microRNA.

pri-miRNA ó pri-miRNA – Precursor primario de microRNA.

PS – Pinto Saltillo.

PTGS – por sus siglas en inglés Post Transcriptional Gene Silencing, Silenciamiento génico post-transcripcional.

RISC - por sus siglas en inglés RNA-induced Silencing complex. Complejo de silenciamiento de ARN.

RNA-seq – por sus siglas en inglés RNA sequencing. Secuenciación masiva de ARN.

RT-qPCR – por sus siglas en inglés reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retro-transcripción.

snRNA – por sus siglas en inglés small nuclear RNA. ARN pequeños nucleares.

STTM – por sus siglas en inglés Short Tandem Target Mimicry. Mimetismo de blanco en tándem corto.

tasiARFs – por sus siglas en inglés trans-acting siRNAs Auxin Responsive Factor. ARN interferente *in trans* de Factor de respuesta a auxinas.

INTRODUCCIÓN.

***Phaseolus vulgaris* (FRIJOL).**

Las familia Fabaceae (leguminosas) es la tercera familia más grande perteneciente a las angiospermas y en conjunto con bacterias fijadoras de nitrógeno captan el nitrógeno atmosférico transformándolo en amonio (NH_4), esto último les aporta una ventaja evolutiva/adaptativa frente a las demás plantas (Vlasova *et al.* 2016). Se han descrito 18, 000 especies en la familia de las leguminosas, las cuales abarcan aproximadamente 700 géneros, sin embargo la producción de leguminosas sólo se basa en unas pocas especies (Doyle and Luckow 2003). *Phaseolus vulgaris* (frijol) pertenece a la familia Fabaceae y la mayoría de las especies de frijol son diploides con cromosomas pequeños ($2n=2x=22$), y en México alrededor de un tercio de las especies conocidas habitan de manera natural, extendiéndose en un amplio rango de climas, además se conocen distintos nombres comunes para frijol como: poroto, alubia, caraota, judía y exotl (Biodiversidad. 2015, Gepts *et al.* 2008).

Las plantas de frijol se caracterizan por ser hierbas rastreras y trepadoras, sus hojas son un conjunto de tres foliolos, sus flores tienen forma de riñón con tonalidades del rojo al violeta pasando por el color lila y sus semillas crecen en forma de vaina. En temperaturas subtropicales, sus raíces son fibrosas y en conjunto con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobiaceae* desarrollan nódulos, que son capaces de fijar el nitrógeno de la atmósfera antes de su floración y de producir NH_4 el cual es asimilado por la planta, mientras que la bacteria se beneficia de los compuestos de carbono producto de la fotosíntesis. Esta simbiosis fue crucial para su domesticación, aunque la disponibilidad de nitrógeno en el suelo puede ser obtenida de manera artificial mediante el uso de fertilizantes, sin embargo pueden ser muy tóxicos tanto para la planta como para el medio. Su ciclo de crecimiento desde la germinación hasta la maduración de la semilla es en promedio de 70 a 120 días en temperaturas promedio de 18 a 22 °C con días largos de un fotoperiodo de 12 horas ((CIAT). 2015, Gepts, et al. 2008, Miklas *et al.* 2006, Muñoz Saldaña 2010, Singh 1982).

En México se cultivan cuatro especies de frijol: Frijol común (*P. vulgaris*), frijol comba (*P. lunatus*), frijol ayocote también conocido como patola, patol frijolon, pak y cimarrón (*P. coccineus*) y frijol tépari (*P. acutifolius*), y representan para su población una fuente importante de carbohidratos, un alto contenido de proteínas, fibra, grasa, minerales, vitaminas del complejo B como la niacina, riboflavina, ácido fólico y tiamina (Biodiversidad. 2015, Gálvez and Salinas 2011).

El origen y domesticación de frijol.

El centro de domesticación del frijol ha sido ampliamente debatido resultando en dos regiones: una en Mesoamérica y otra en la región Andina de Sudamérica (Kami *et al.* 1995, Kwak and Gepts 2009). Estas poblaciones se separaron hace alrededor de 100,000 años (Mamidi *et al.* 2011) a causa de la separación geográfica, a su constante domesticación aunado a un efecto de cuello de botella (Bitocchi *et al.* 2013). Con la reciente publicación del genoma de frijol de origen andino (Blair *et al.* 2012, Schmutz *et al.* 2014) y el de la región mesoamericana (Vlasova, *et al.* 2016) se podría entender en un futuro su compleja historia evolutiva pues aún está en debate.

Con la domesticación, el frijol presentó varios cambios morfológicos, cambiando su crecimiento de indeterminado (cuando en la planta no detiene el aumento de altura dado a que presenta en su parte apical un grupo celular conocido como meristemo que le permite seguir dividiéndose y por lo tanto expandirse, es decir, en forma de enredadera) a determinado (cuando en la planta detienen su expansión en altura debido a la presencia de un conglomerado celular conocido como meristemo floral que dará origen a flores, por ejemplo en forma arbustiva), a ser insensible a los fotoperiodos, así como presentar hojas, vainas y semillas más grandes. Además destacamos tres características deseables en cualquier cultivo domesticado y en el que frijol no fue la excepción: distintas formas de su fruto, la pérdida de dispersión y dormancia de sus semillas (Gepts, *et al.* 2008, Miklas, *et al.* 2006).

Importancia económica del frijol.

El frijol es la segunda leguminosa de cultivo humano sólo después de soya, y es la principal fuente de proteínas en la dieta humana en Centroamérica, Sudamérica y África siendo consumida por alrededor de 500 millones de personas, además de ser empleada en la alimentación animal (Broughton *et al.* 2003, Castro-Guerrero *et al.* 2016, Graham and Vance 2003, Miklas, et al. 2006).

La sequía es la principal causa global del decremento en la producción de especies de importancia económica y aunado a ello, la Organización Mundial Meteorológica (WMO, por sus siglas en inglés) ha reportado que entre los años de 2001 a 2010 se produjo un periodo de muy altas temperaturas en comparación con el periodo de la segunda mitad del siglo pasado, además se predice que la temperatura seguirá elevándose en los próximos años y por consiguiente las sequías seguirán aumentando dejando pérdidas en la producción de este grano de hasta un 70% (Ghosh and Xu 2014, Hasanuzzaman *et al.* 2013). Por consiguiente, la sequía genera una disminución de la producción mundial de frijol que anualmente excede los 21 millones de toneladas métricas (tm), representando más de la mitad de la producción de leguminosas (Miklas, et al. 2006) y que en condiciones de sequía está decae en más de un 50% (Mahajan and Tuteja 2005, Rodríguez *et al.* 2005) significando entre seis a ocho millones de dólares (mdd) en pérdidas a nivel mundial (Keyantash and Dracup 2002).

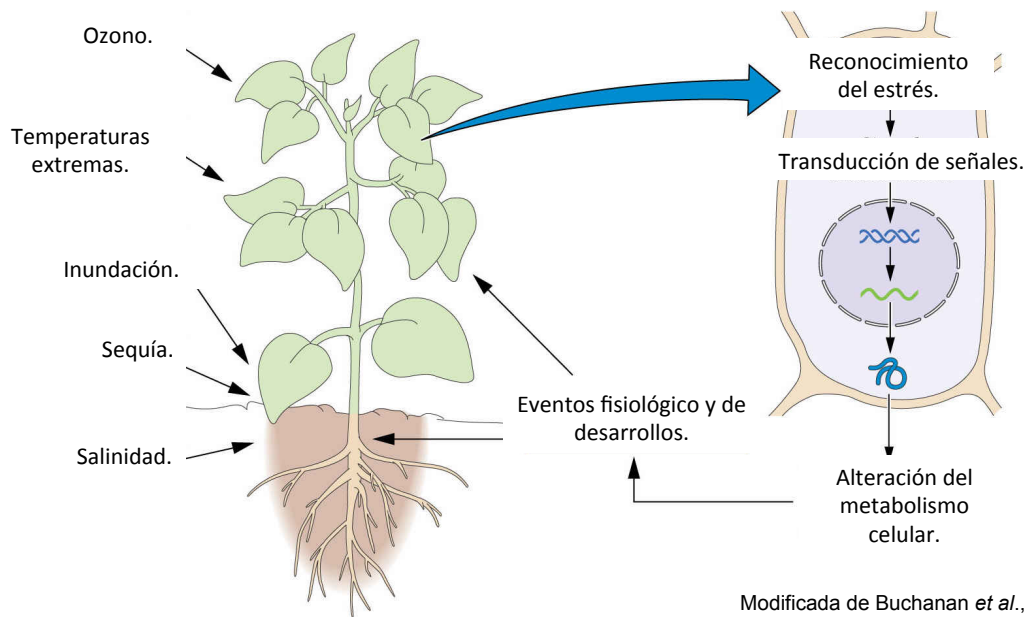
Ante los estragos de la sequía sobre los cultivos, en especial de las leguminosas, es de suma importancia su caracterización fisiológico, celular y molecular en aras de obtener mejores cultivares de interés humano así como de importancia económica (Broughton, et al. 2003, Gallegos and Shibata 1989).

El estrés abiótico en plantas: déficit hídrico.

Las plantas están constantemente sometidas a diversas condiciones de estrés abiótico y biótico que repercuten en su crecimiento, productividad y desarrollo (Buchanan. *et al.* 2015). En el caso del estrés por déficit hídrico, se presenta una disminución en el agua

disponible para ser utilizada por la planta, por lo que éstas han desarrollado diversas estrategias a nivel fisiológico, celular y molecular para contender con esta situación adversa y por consecuencia aumentar su probabilidad de supervivencia. (Bray 1997, Oliver *et al.* 2010). Algunas de las principales repercusiones a la falta de agua es la disminución de su crecimiento y de su superficie (área foliar) de modo que genera un decremento de su tasa fotosintética que repercute en la calidad de sus frutos, la reducción de la producción y peso de las semillas o aborción de éstas, además de un aumento en su sistema radicular (Boyer 2010, Harb *et al.* 2010).

Entre los mecanismos que están involucrados durante el déficit hídrico se encuentran: el cerrado y apertura de estomas, el crecimiento diferencial de la raíz, acumulación de osmolitos, síntesis de proteínas tipo LEA (Late Embryogenesis Abundant, por sus siglas en inglés), modulación en su tasa de fotosíntesis, así como la producción de la fitohormona ABA que tiene un papel importante en la señalización en respuesta a estrés por falta de agua, la participación de canales iónicos (Na^+/K^+) y las acuaporinas durante la tolerancia a la salinidad y al transporte de agua, respectivamente. Todos estos factores participan a distintos niveles y repercuten en la expresión genética del organismo, por lo tanto el estudiar los distintos procesos celulares que las plantas utilizan para contender contra el déficit hídrico es de especial interés, no solo para comprender los procesos de regulación celular, sino para la futura generación de variedades tolerantes y/o resistentes para consumo humano (Bray 1997, Johansson *et al.* 2000, Olvera-Carrillo *et al.* 2010, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007) (Figura 1).



Modificada de Buchanan *et al.*, 2015.

Figura 1. Las respuestas ante el estrés abiótico en las plantas. Las distintas condiciones de estrés abiótico a las que están expuestas las plantas son reconocidas por sus células produciendo una cascada de traducción de señales, resultando en una alteración del metabolismo celular que puede influir en eventos fisiológicos y de desarrollo del organismo. Texto e imagen modificados de Buchanan *et al.*, 2015.

En años recientes, a nivel molecular se descubrió que ARN pequeños no codificantes están involucrados en la modulación génica a nivel post-transcripcional (PTGS), destacando los microRNAs (miRNAs), phased secondary siRNAs (phasiRNAs), los trans-acting siRNAs (tasiRNAs), Short-Interfering RNAs (siRNAs) y siRNAs heterocromáticos (hcsiRNAs), entre otros. En este trabajo nos enfocamos en caracterizar un mecanismo post-transcripcional mediado por un microRNA específico de leguminosas que, durante el transcurso de esta investigación, descubrimos que es generador de phasiRNAs a partir del sitio de corte entre miR1514a y su transcrito blanco. En la siguiente sección nos enfocaremos en la descripción del proceso de PTGS mediado por ARNs pequeños.

Los ARNs pequeños no codificantes en plantas.

Los mecanismos de silenciamiento génico mediado por ARN pequeños fueron considerados un descubrimiento radical en la regulación génica y su gran impacto queda

registrado en los trabajos de Fire, Mello y colaboradores en 1998, Napoli y colaboradores en 1990, así como el de van der Krol en 1990 (Fire *et al.* 1998, Napoli *et al.* 1990, van der Krol *et al.* 1990), quienes fueron pioneros en el descubrimiento de la función de los ARN pequeños antisentido. El descubrimiento de los mecanismos de actividad de los ARN pequeños, de biogénesis así como su importancia en la regulación post-transcripcionales plantas, representan una herramienta de conocimiento invaluable para su potencial aplicación biotecnológica.

Los ARNs pequeños son moléculas de corta longitud (entre los 18 y 24 nt), que actúan por reconocimiento de bases en zonas complementarias de los ARNm blancos, lo que resulta en la disminución en sus niveles y/o eficiencia traduccional. Recientemente, se ha descrito que algunos ARNs pequeños además de degradar su transcrito diana, participan en la producción de ARNs pequeños de cadena sencilla y en procesos de silenciamiento epigenético. La presencia de ARNs pequeños así como sus proteínas efectoras en casi todos los organismos eucariontes señala su importancia funcional en la regulación génica (Shabalina and Koonin 2008). Aunque el mecanismo de acción de los ARN pequeños es el mismo, se clasifican dependiendo de sus longitudes así como en las diferentes proteínas que intervienen en su biogénesis. Estas últimas características se toman en cuenta como reglas precisas y descriptivas que debe cumplir un ARN pequeño para ser considerado y clasificados como tal (Meyers *et al.* 2008).

En organismos eucariontes, los ARNs pequeños desempeñan una función importante en procesos del desarrollo, en la respuesta al estrés así como en la regulación epigenética. Chapman y Carrington en el 2007 señalan cuatro pasos característicos en la biogénesis de ARNs pequeños involucrados en el proceso de silenciamiento de ARNm: 1) provienen de una cadena doble de ARN (en inglés dsRNA), 2) se convierten en cadena sencilla (en inglés ssRNA) de 18 a 24 nt de longitud, 3) son metilados en su extremo 3' una vez procesados en cadena sencilla y 4) el ssRNA metilado es asociado junto con su ARNm blanco en un complejo proteico llamado RISC para inhibir su traducción por complementariedad perfecta o imperfecta de bases (Chapman and Carrington 2007). Se ha propuesto que su origen puede provenir de la replicación de virus, así como de la transcripción de secuencias

repetidas-invertidas presentes en el genoma que generan una estructura tallo-asa (Zhang *et al.* 2007).

En contraste con los animales, las plantas muestran un mayor número y diversidad de ARN pequeños y su clasificación está en función a sus mecanismos de biogénesis y sobre los ARN mensajeros a los que silencia (Axtell *et al.* 2011, Borges and Martienssen 2015, Mallory and Vaucheret 2006, Voinnet 2009).

La síntesis de los ARN pequeños puede ser dada por la acción de diferentes polimerasas, en el caso de los microRNAs está dada por la Pol II, mientras que para los siRNAs son transcritos producidos por la polimerasa IV de ARN (Pol IV) (Wierzbicki *et al.* 2008). Además hay que destacar que la doble cadena de ARN puede generarse por la acción de distintas ARN polimerasas dependientes de ARN (RDR1-6, por sus siglas en inglés), la cual genera una doble cadena a partir de ARN que es fundamental durante la biogénesis de otros ATN pequeños (Zhang, *et al.* 2007).

El procesamiento de la doble cadena de ARN para generar ARN pequeños está dado por la acción de la proteína Dicer-like proteins (DCL, por sus siglas en inglés), cuya acción se caracteriza por generar dos nucleótidos sobresalientes en los extremos 3' (Park *et al.* 2002). En *Arabidopsis thaliana* se han determinado cuatro proteínas DCL y cada una procesa ARN pequeños de cierta longitud y su nomenclatura de estos varía según sea el caso, por ejemplo DCL-1 genera ARNs pequeños de 21 a 22 nt que corresponden a la producción de microRNAs (Park, *et al.* 2002) , DCL-2 produce ARN pequeños de 24 nt que están involucrados en la defensa de virus (Xie *et al.* 2004), DCL-3 genera siRNA heterocromáticos (hcsiRNAs) (Xie, *et al.* 2004) y por último DCL-4 ésta implicada en la producción de trans-acting siRNAs (tasiRNAs) (Dunoyer *et al.* 2005). Posteriormente la enzima Huan Enhancer 1 (HEN-1) adiciona un grupo metilo en el extremo 3' del ARN pequeño de doble cadena independientemente de su origen (Bartel 2004).

En plantas, los ARN pequeños conocidos como hcsiRNAs permanecen en el núcleo pues efectúan su función de silenciamiento a nivel de cromatina, metilación de ADN o modificando las histonas. Mientras que los microRNAs son exportados al citoplasma

donde se realiza el silenciamiento post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés) mediante la proteínas HASTY (HST) la cual es homóloga de la proteína Exportin-5 (XPO-5) en animales (Hamilton *et al.* 2002, Park *et al.* 2005, Zilberman *et al.* 2003). Dichos ARN pequeños abordaremos en secciones mas adelante.

El proceso de silenciamiento general de un ARN pequeño con su transcrito blanco inicia cuando se ensambla el complejo RISC. Este proceso consta de dos fases, la carga de RISC y apertura del dúplex. La carga de RISC incluye la incorporación del ARN pequeño de cadena doble en la proteína Argonaute (AGO), la cual está conformada por el dominio Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ) que se une a un ARN de cadena sencilla, éste reconoce los dos nucleótidos desfasados por el procesamiento de DCL un dominio Middle (MID) comúnmente llamada *binding pocket* y el dominio P Element Induced Wimpy Testis (PIWI), formado por residuos de aminoácidos con actividad catalítica con características similares al dominio de RNAsa H la cual corta la hebra sencilla de los ARN asociados (Vaucheret 2008). En el proceso de carga se necesita un cambio conformacional permitiendo la apertura de AGO, que de otra manera no podrían ser cargados. Una vez que el dúplex de ARN pequeño se ha incorporado sobre AGO, a este se le conoce como complejo pre-RISC. El segundo paso es la apertura del dúplex del ARN pequeño, la cual conlleva la separación de las dos cadenas dentro de la proteína AGO seleccionando frecuentemente aquella que sea termodinámicamente menos estable en su extremo 5', mientras que la otra cadena conocida como cadena estrella o cadena acompañante es generalmente degradada, a este proceso se le llama RISC maduro. Una vez seleccionada la cadena líder, AGO contiene un ARN de cadena sencilla capaz de unirse a su ARN blanco y es lo que se conoce como complejo RISC maduro (Gu *et al.* 2011, Meijer *et al.* 2014, Schwarz *et al.* 2003).

En *A. thaliana* se han descrito 10 proteínas AGO y algunas poseen actividad endonucleolítica dada por el motivo DDH presente en el dominio PIWI (Song *et al.* 2004), estas proteínas podemos clasificarlas en grandes tres clados: 1) AtAGO-1, AtAGO-5 y AtAGO-10 los cuales participan en la vía de microRNAs, 2) AtAGO-2, AtAGO-3 y AtAGO-7 involucradas en el procesamiento de siRNAs de origen viral y tasiRNAs, y por

último 3) AtAGO-4, AtAGO-6, AtAGO-8 y AtAGO-9 relacionado con los hcsiRNAs (Mi *et al.* 2008, Vaucheret *et al.* 2004). Por otro lado en *Oriza sativa* se han descubierto 18 proteínas AGO (Kidner and Martienssen 2004), y además con la reciente publicación del genoma de *P. vulgaris* sabemos que existen 14 proteínas AGO en frijol.

Finalmente, la secuenciación masiva de ARN pequeños asociados a proteínas AGO individuales nos ha permitido clasificar la asociación de determinado ARN pequeño con cada miembro de la familia AGO, por lo que podemos predecir que AGO-1 se asocia preferentemente con ARNs pequeños que comienzan con un Uracilo (U) en el extremo 5' y son de 21 nt, AGO-2 y AGO-4 cargan ARN pequeños que contienen una Adenosina (A) en su extremo 5' y de 24 nt, mientras que AGO5 une ARN pequeños que comienzan con Citosina (C) aunque se unen ARN pequeños de 21, 22 y 24 nt. Una alteración en el proceso de asociación modificaría su función (Qi and Mi 2010, Vaucheret 2008).

En general, el mecanismo de silenciamiento post-transcripcional mediado por ARNs pequeños en plantas es un fenómeno que puede ser de utilidad en cuestiones tan variadas, como por ejemplo en la alimenticia. En la siguiente secciones, describiremos de manera general tres tipos de ARN pequeño endógeno y no codificante, denominado microRNA, phasiRNAs y tasiRNAs, los cuales fueron objeto de estudio en este trabajo doctoral.

Los microRNAs.

Los microRNAs o miRNAs son una clase de ARNs pequeños de un tamaño entre 21 y 24 nt de longitud con importancia en la modulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, esto se realiza mediante el corte o la inhibición del ARNm lo que suprime su expresión, generalmente el mecanismo de corte sucede en plantas mientras que la inhibición frecuentemente ocurre en animales (Borges and Martienssen 2015). El estudio de microRNAs es sumamente relevante en especies con interés comercial y en este capítulo nos enfocaremos exclusivamente a los microRNAs pertenecientes al reino vegetal, aunque mencionaremos algunos puntos de la biogénesis en animales para su mejor comprensión.

En general, los microRNAs en plantas podemos mencionar las siguientes características: 1) son ARN pequeños de 21 y 22 nt, 2) la mayoría son conservados entre las angiospermas y las gimnospermas, 3) la producción de los microRNAs en plantas comienza en el núcleo y el proceso termina en el citoplasma, 4) la longitud de su precursor es más variable que en los animales, además de existir regiones altamente conservadas que originan microRNA conservados, 5) la complementariedad de bases entre el microRNA maduro y el microRNA* (microRNA estrella) es casi perfecta, 6) existe una preferencia de Uracilo (U) en el extremo 5' de los microRNAs, 7) la longitud de los microRNAs en plantas es en promedio de 21 nt, mientras que en animales es de 22-23 nt, 8) los nucleótidos 2 al 13 del extremo 5' son importantes en el reconocimiento de un microRNA con su ARNm blanco, ésta secuencia es conocida como región semilla y 9) generalmente en plantas existe el corte del mensajero lo que contrasta a animales donde la inhibición de la traducción es más frecuente (Bartel 2004, Li *et al.* 2011b, Mallory *et al.* 2004).

En plantas, la biogénesis de miRNAs comprende los siguientes pasos: 1) Generación de un precursor de microRNA (pre-microRNA): La producción de un pre-microRNA comienza con la transcripción de un gen *MIR* por la ARN Polimerasa II (Pol II), generando un transcrito primario (pri-microRNA) que es sustrato de la proteína Dicer like -1 (DCL-1), en una segunda ronda de procesamiento del pri-microRNA mediada por DCL-1 genera un precursor de microRNA (pre-microRNA), por lo que se propone que DCL-1 realiza la función de Drosha y Dicer en plantas.

En este proceso, DCL-1 se acopla con las proteínas Hypnostaic leaves (HYL-1), DAWDLE (DDL) así como SERRATE (SE) procesando al pri-microRNA, lo que genera un pre-microRNA que dará origen a un microRNA maduro de doble cadena o dsRNA (Li, *et al.* 2011b, Voinnet 2009, Yu *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2004). En la mayoría de los precursores de plantas, DCL-1 generan microRNAs de doble cadena en dirección al asa comenzando en la base del tallo (Kim *et al.* 2009, Song *et al.* 2010) aunque en el caso de precursores largos como en el caso de miR159a y miR319a el procesamiento se realiza en dirección contraria (Bologna *et al.* 2009).

2) Transporte del microRNA maduro al citoplasma: antes de salir del núcleo y trasladarse al citoplasma, el microRNA maduro es metilado en sus extremos 3' por una metiltransferasa dependiente de S-Adenosyl Metionina conocida como Hua Enhancer (HEN1), dicha modificación evita que el microRNA maduro no se degrade en el citoplasma por la acción de las exonucleas XRN-2 y la endonucleasa SND-1. La exportación al citoplasma esta dada por HASTY, la cual es una proteína homóloga a XPO-5 que en animales realiza dicha función, aunque en este punto no está del todo claro si el microRNA se traslada en su forma de cadena sencilla o en forma de dúplex (del inglés single strand RNA) ó en dsRNA (del inglés double strand RNA) (Li *et al.* 2005).

3) La integración del microRNA maduro en el complejo RISC-AGO para silenciar su blanco: Como se mencionó, el proceso de silenciamiento de un ARN pequeño a su transcrito blanco se realiza por medio del complejo RISC. Este proceso consta de dos fases, la carga de RISC y apertura del dúplex. La carga de RISC incluye la incorporación del ARN pequeño en un dúplex en la proteína AGO. Una vez que el ARN pequeño se ha incorporado sobre AGO, el segundo paso es la apertura del dúplex, que resulta en dos cadenas, una cadena queda anclada en AGO y es conocida como la cadena líder, mientras que la cadena acompañante o estrella generalmente es descartada. Una vez seleccionada la cadena líder, AGO contiene un ARN de cadena sencillas capaz de unirse a su ARN blanco por complementariedad de bases, en este punto se le conoce con el nombre de RISC maduro pues ahora es capaz de regular a un transcrito blanco. El microRNA se asocia preferencialmente a AGO-1 pues como ya mencionamos, en AGO-1 se cargan preferencialmente ARN pequeños de 21 nt de longitud (Cerutti *et al.* 2000, Ender and Meister 2010, Song *et al.* 2003, Vaucheret 2008) (Figura 2).

Aunado a lo anterior, la identificación de un precursor de microRNA así como su detección experimental/bioinformática de la secuencia complementaria reversa del microRNA son criterios clave para considerarlo como un microRNA verdadero (Meyers, et al. 2008).

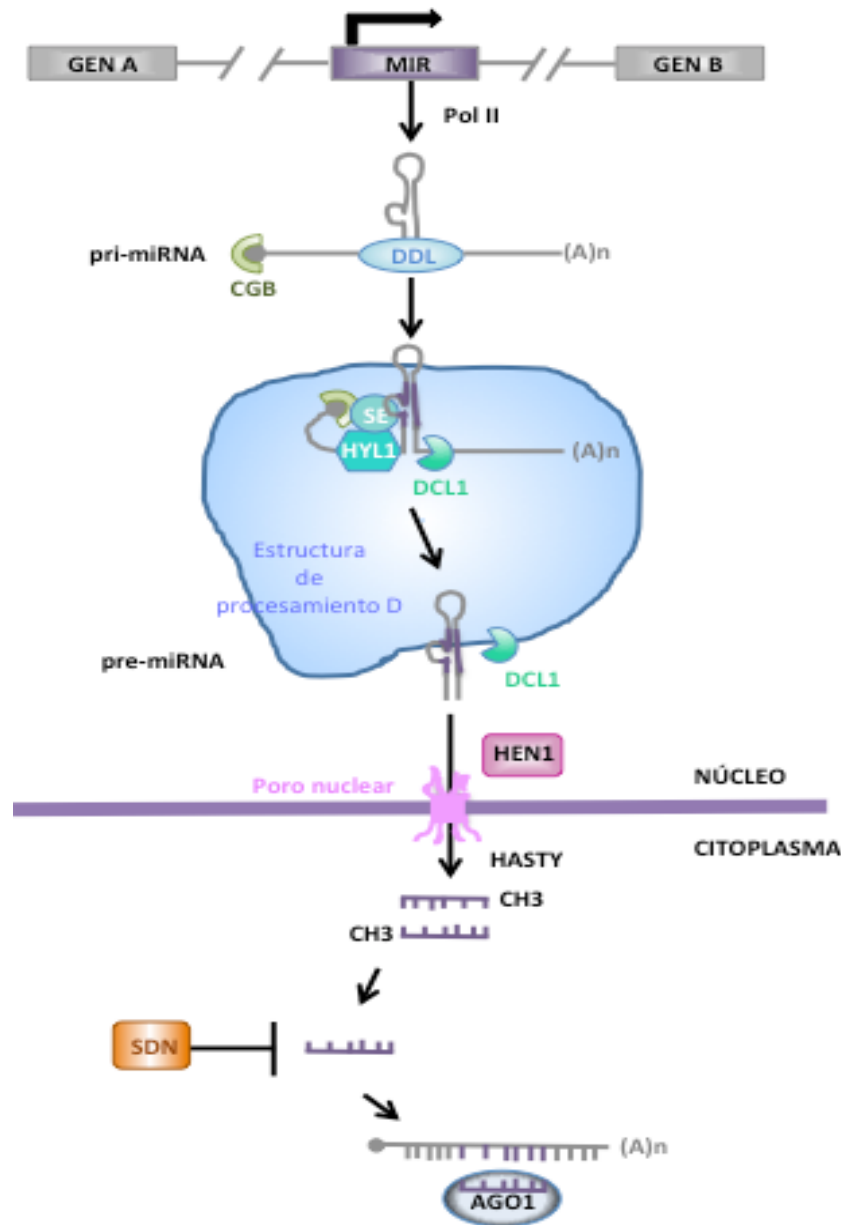


Figura 2. La biogénesis de microRNAs en plantas. Los genes *MIR* provienen de regiones intergénicas, el pri-miRNA es mayoritariamente transcrito por la Pol II, DDL estabiliza al pri-miRNA para su procesamiento en las estructuras de procesamiento D (D-body) convirtiéndolo en pre-miRNAs. En dicha reacción entra en acción la proteína SE, la proteína de unión a doble cadena HYL-1, DCL-1 y el complejo nuclear de capping (del inglés nuclear cap-binding complex-CBC). El pre-miRNA ó el microRNA maduro producido por DCL1 es exportado al citoplasma por HASTY (un ortólogo de XPO-5), inmediatamente es metilado por HEN1 que lo protege de la degradación por la exonucleasa SMALL RNA DEGRADING NUCLEASE (SDN). El microRNA maduro es incorporado en AGO-1 para asociarse con su transcrito blanco por apareamiento de bases. Modificada de (Voinnet 2009).

Datos de secuenciación masiva de ARN pequeños en diferentes especies muestran que los microRNAs se puede dividir en conservados y no conservados y/o específicos, siendo estos últimos considerados de reciente aparición en comparación con los microRNAs conservados (Cuperus *et al.* 2011, Voinnet 2009), por lo que se ha propuesto que los microRNAs no conservados y/o específicos son irrelevantes funcionalmente hablando, en parte debido a sus bajos niveles de expresión y por la dificultad de encontrar sus blancos de regulación (Cuperus, et al. 2011), aunado su diversificación de los microRNAs en distintos grupos de plantas (Covarrubias and Reyes 2010). En contraste a esta ultima idea, al se han reportado un gran número de microRNAs conservados que han sido asociado con condiciones de estrés abiótico en plantas, entre las que mencionamos suelos salinos (Gao *et al.* 2011), déficit nutrimental (Liang *et al.* 2015), radiación por luz UV-B (Casadevall *et al.* 2013), calor (Goswami *et al.* 2014) y por metales pesados (Gupta *et al.* 2014, Yang and Chen 2013), además de participar en diferentes vías de regulación, metabolismo, morfogénesis, desarrollo y respuesta a estrés (Borges and Martienssen 2015), lo que sugiere que los microRNAs poseen un papel primordial durante el proceso PTGS en condiciones de estrés abiótico. En la siguiente tabla tomada de (Shriram *et al.* 2016) se resumen los resultados de la expresión de microRNAs en plantas bajo condiciones de estrés abiótico (Tabla 1).

microRNA	Cultivo	Condición abiótica						Validación/Predicción de su transcrito
		S	Se	AT	F	Cd	As	
miR156	<i>O. sativa</i>					■		SPL TFs
	<i>T. aestivum</i>	■	■	■				SPL
	<i>Saccharum sp.</i>	■						SPL 5
	<i>G. max</i>		■					SPL
miR159	<i>O. sativa</i>	■						MYB family TFs
	<i>T. aestivum</i>			■				MYB domain protein
	<i>Saccharum sp.</i>	■						GA-Myb
miR160	<i>O. sativa</i>	■	■					ARF
	<i>T. aestivum</i>	■	■	■				ARF
	<i>H. vulgare</i>			■				ARF 13, ARF 17
miR162a	<i>O. sativa</i>					■		DCL1
miR164	<i>T. aestivum</i>	■	■	■				NAC domain containing protein
miR166	<i>O. sativa</i>		■			■		START domain containing protein, HD-Zip TFs
	<i>T. aestivum</i>		■	■				HD-Zip protein
	<i>Saccharum sp.</i>	■	■					Class III HD-Zip protein 4
	<i>H. vulgare</i>			■				HD-Zip TFs
miR167	<i>O. sativa</i>		■					ARF
	<i>T. aestivum</i>	■	■	■				ARF
	<i>Saccharum sp.</i>	■						ARF 17
	<i>G. max</i>		■					ARF
	<i>H. vulgare</i>			■				ARF 8
miR168	<i>O. sativa</i>		■			■		AGO
	<i>T. aestivum</i>			■				AGO
	<i>Saccharum sp.</i>	■						AGO 1
	<i>H. vulgare</i>	■						AGO 1
miR169	<i>T. aestivum</i>			■				CBF-B/NF-YA family protein
	<i>Saccharum sp.</i>	■	■					HAP12-CCAAT-box TF complex
	<i>O. sativa</i>					■		NF-YA or HAP2 TFs
miR170	<i>O. sativa</i>		■					Scarecrow-like TF, ACP1
miR171	<i>O. sativa</i>					■		Scarecrow-like TF
	<i>T. aestivum</i>	■	■	■				Scarecrow-like TF
	<i>Saccharum sp.</i>		■					SCL1
	<i>G. max</i>		■					Ubiquitin carrier protein, Fe-SCD 1
	<i>H. vulgare</i>	■	■					Protein FAN
miR172	<i>O. sativa</i>		■			■		APETALA2, bZIP TF family protein
	<i>T. aestivum</i>		■	■				APETALA2-like
	<i>Saccharum sp.</i>		■					APETALA2-like
miR319	<i>O. sativa</i>	■						TCP family TF21
miR390	<i>O. sativa</i>					■		LRR-RLK

microRNA	Cultivo	Condición abiótica						Validación/Predicción de su transcrito
		S	Se	AT	F	Cd	As	
miR393	<i>O. sativa</i>	■	■		■			TIR1, AFB2, AFB3, F-box domain, LRR containing protein/MYB family TF
miR394	<i>O. sativa</i>	■			■			F-box domain containing protein
miR395	<i>T. aestivum</i> <i>G. max</i>		■					ATP sulfurylase ATP sulfurylase, Low affinity sulfate transporter
miR396	<i>O. sativa</i> <i>T. aestivum</i> <i>Saccharum sp.</i> <i>G. max</i>	■	■	■	■	■	■	GRF TFs, rhodanase-like proteins, kinesin-like protein B GRF 3 GRF1 Cytochrome P450 monooxygenase, NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4
miR397	<i>Saccharum sp.</i> <i>O. sativa</i>	■					■	LAC-10 precursor LACs
miR398	<i>Saccharum sp.</i>	■						Selenium binding protein
miR408	<i>O. sativa</i>		■				■	SPX, BCP
miR444	<i>O. sativa</i> <i>H. vulgare</i>	■	■			■		MADS-box TFs MIKC-type MADS-box TFs
miR474	<i>O. sativa</i>		■					PPR, protein kinase, kinesin, leucine-rich repeat
miR482	<i>T. aestivum</i>		■					Transmembrane proton gradient regulation
miR528	<i>O. sativa</i> <i>O. sativa</i> <i>Saccharum sp.</i>	■				■	■	IAR1, CBP/Plastocyanin-like domain containing protein OsDCL1 Putative LAC
miR529	<i>O. sativa</i>		■		■			SBP-box gene family
miR530-3p	<i>O. sativa</i>	■	■		■			Hairpin-induced protein 1 domain containing protein
miR809	<i>O. sativa</i>	■	■		■			Glutaredoxin 2, putative, PPR repeat containing protein
miR827	<i>T. aestivum</i>		■					NLA
miR1318	<i>O. sativa</i>						■	Calcium binding proteins or Calcium ATPases
miR1428	<i>O. sativa</i>		■					Cytochrome c
miR1432	<i>O. sativa</i>						■	Calcium binding proteins or Calcium ATPases
miR1884	<i>O. sativa</i>		■					AAA ATPase
miR2871	<i>O. sativa</i>	■	■		■			GT family protein
miR5049	<i>T. aestivum</i>		■					Wpk4 protein kinase
miR5175	<i>H. vulgare</i>		■					ACC-like oxidase

Tabla 1. Expresión diferencial de microRNAs tanto conservados como no conservados reportados bajo distintas condiciones de estreses abióticos (S- salinidad; Se- sequía, AT- altas temperaturas; F - frío, Cd-Cadmio; As- Arsénico) en diferentes cultivos tomada de (Shriram, et al. 2016). *Oryza sativa* (Barrera-Figueroa *et al.* 2012, Ding *et al.* 2011, Liu and Zhang 2012, Xia *et al.* 2012a, Zhou *et al.* 2010), *Triticum aestivum* (Akdogan *et al.* 2016, Pandey *et al.* 2014, Xin *et al.* 2010), *Saccharum sp.* (Carnavale Bottino *et al.* 2013, Gentile *et al.* 2015), *Glycine max* (Li *et al.* 2011a) y *Hordeum vulgare* (Deng *et al.* 2015, Hackenberg *et al.* 2015, Kruszka *et al.* 2014). Las cajas verdes indican una inducción, mientras que las cajas rojas una represión en su expresión bajo las condiciones probadas.

Como podemos apreciar en la tabla 1, la mayor descripción de los mecanismos y funciones de PTGS en plantas mediados por microRNAs en condiciones de estrés provienen de reportes realizados en *A. thaliana*, así como en un número reducido de otras especies de plantas no modelo (Covarrubias and Reyes 2010, Mallory and Vaucheret 2006, Sosa-Valencia *et al.* 2013, Sunkar 2010, Voinnet 2009), esto dejando a un lado la co-evolución existente entre la adaptación al ambiente y el mecanismo de silenciamiento génico por microRNAs (Borges and Martienssen 2015). Además, el efecto PTGS de los microRNAs puede expandirse entre célula-célula o darse entre órganos (Megraw *et al.* 2016), e inclusive pueden transportarse a través de los ases vasculares de la planta provocando que su rango/área de acción sea más amplio (Buhtz *et al.* 2008, Lin *et al.* 2008, Pant *et al.* 2008).

Además, la tabla 1 señala que los microRNAs en plantas generalmente regulan a factores transcripcionales (FT) (Jones-Rhoades *et al.* 2006) y por consiguiente pueden tener un impacto significativo en redes de regulación génica (Megraw, et al. 2016, Osella *et al.* 2011). Los FT que responden al déficit hídrico pueden ser clasificados en dos grupos: los ABA-dependientes y los ABA independientes: Los TF ABA dependientes son miembros de las familias transcripcionales MYB (Myeloblastosis related proteins, por sus siglas en inglés), bZIP (Basic-region leucine zipper, por sus siglas en inglés), MYC (myelocytomatosis related protein, por sus siglas en inglés) y NAC, en contraste los FT ABA independientes comprenden miembros de las familias AP2/ERF (Apetala2/Ethylene-Responsive Element Bindng Factors, por sus siglas en inglés) , bHLH (basic helix loop helix, por sus siglas en inglés), NAC, DREB (Dehdratation responsive binding, por sus

siglas en inglés) y HD-ZIP (Homeodomain Leucine Zipper, por sus siglas en inglés) (Kuromori *et al.* 2014, Nakashima *et al.* 2014, Seki *et al.* 2003, Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). Estos factores transcripcionales regulan la correcta expresión de distintos genes en respuesta al déficit hídrico.

Además, destaca el hecho que la familia de FT NAC es una de las más grandes en relación a la cantidad de miembros en las plantas, las cuales comparten un dominio conservado de unión a ADN en la región N-terminal de la proteína conformada por los aminoácidos WVLCR (Hao *et al.* 2011, Nakashima *et al.* 2007, Olsen *et al.* 2005, Tran *et al.* 2004). El número de miembros de la familia de FT NAC varían de acuerdo a la especie, conociéndose 117 miembros en *A. thaliana*, en *Oriza spp.* 151 elementos, para *G. max* y *Nicotiana spp.* existen 152 genes NAC para cada especie, 163 miembros en *Populus alba* y finalmente en uva 79 elementos (Hu *et al.* 2010, Le *et al.* 2011, Nakashima, *et al.* 2007, Rushton *et al.* 2008). De esta manera, los FT NAC son una familia altamente extendida y con un gran número de integrantes.

Los factores transcripcionales NAC son afines a procesos de desarrollo y crecimiento (incluido el desarrollo floral), senescencia, morfogénesis y transducción de señales a estrés, formación del meristemo apical (Olsen, *et al.* 2005), además su función está ligada en la señalización de la fitohormona auxina y la formación de raíces laterales (Xie *et al.* 2000). Cabe mencionar que, siete factores de transcripción de tipo NAC en *A. thaliana* están asociados a la falta de agua están estrechamente relacionados con vías de respuestas a la fitohormona ABA, estos son NAC-016, NAC-019, NAP, NAC-053/NTL-4, NAC-055, NAC-072 y NAC-096 (Lee and Park 2012, Tran, *et al.* 2004, Xu *et al.* 2013, Zhang and Gan 2012), de esta forma, los factores NAC son una familia que participa tanto en procesos de desarrollo como de respuesta a distintos estreses.

Finalmente, dado que los microRNAs se encuentran presentes en distintas condiciones de estrés abiótico, nos sugiere una importante contribución a nivel post-transcripcional en la planta, que se ve reflejado en el incremento de microRNAs depositados en la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>), la cual comenzó en el año 2002 con apenas 5 microRNAs provenientes de la planta modelo *A. thaliana* y que actualmente en su versión

21 muestra se reportan más de 7 057 *loci* de genes *MIR*, 28 645 precursores de microRNAs, 35 828 microRNAs maduros derivados de 223 organismos en las que se incluye 73 especies de plantas, lo que remarca la trascendencia de los microRNA en distintas condiciones y especies, por consiguiente se espera que en los próximos años su número siga en aumento.

La descripción de los phased secondary siRNAs (phasiRNAs) y los trans-acting siRNAs (tasiRNAs).

Los phased secondary siRNAs (phasiRNAs) es un tipo de ARN pequeño que se producen a partir del sitio de corte entre un microRNA de 21 ó 22 nt de longitud con su transcrito que regula, si este puede regular a un transcrito distinto a su origen adquiere el nombre de trans-acting siRNA (tasiRNAs) (Chen *et al.* 2010, Cuperus *et al.* 2010, Lanet *et al.* 2009). Lo anterior quedo demostrado pues existen casos particulares de ciertos phasiRNAs que pueden ser incorporados en RISC, provocando una regulación negativa del transcrito blanco al que son complementarios y por lo tanto funcionar *in trans*, por lo que los phasiRNAs amplifican e incrementa la señal PTGS estableciendo gradientes en la planta (Allen and Howell 2010).

La biogénesis de phasiRNAs comienza con el empalme y corte de un microRNA (generalmente de 22 nt. de longitud) con su transcrito diana, por lo que el transcrito remanente es convertido en dsRNA por la RNA Dependent RNA Polymerase 6 (RDR-6) y Suppressor of Gene Silencing 3 (SGS-3), consecuentemente la dsRNA es sustrato de las proteína DCL-2 o DCL-4, las cuales se encargan de cortar la doble cadena cada 21 nt (Fei *et al.* 2013, Jeong *et al.* 2011).

Se ha reportado que demuestran que la Uridyltransferase 1 (URT-1) interactúa con AGO-1 provocando que mono-uridile un microRNA de 21 nt., produciendo un microRNA de 22 nt de longitud ello para iniciar el procesos de phasiRNAs (Tu *et al.* 2015, Wang *et al.* 2015). Aunado a lo anterior, la forma asimétrica de su precursor es factor importante para desarrollar dicho proceso pues la longitud del microRNA no es suficiente para iniciar el

proceso de phasiRNAs (Manavella *et al.* 2012) (Figura 3).

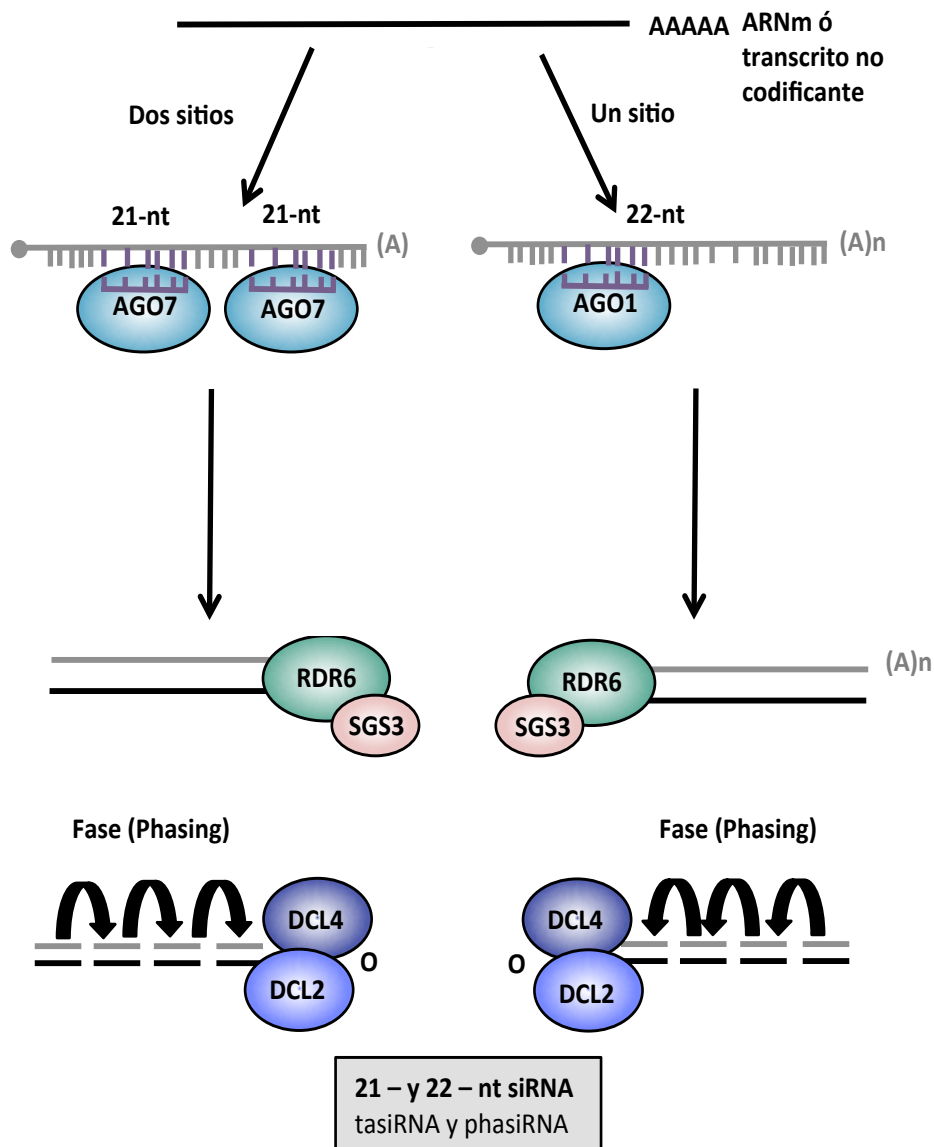


Figura 3. Esquema de la biogénesis de tasiRNA y phasiRNA. El sistema de dos sitios utiliza dos microRNAs de 21 nt y requiere la actividad de AGO-7. La ruta de un sitio de unión involucra un microRNA de 22 nt ó un microRNA de 21 nt mono-uridilado, el cual es asociado con AGO-1 . En ambos casos actúan las proteína SGS-3, DCL-4 y DCL-2 Las flechas negras indican el sentido de procesamiento de DCL-2 ó 4 en el transcrito remanente generado por el corte de un microRNA. Modificada de (Borges and Martienssen 2015).

En *A. thaliana*, se ha identificado cuatro transcritos que son blancos exclusivos de tasiRNAs conocidos como transcritos TAS, los cuales son clasificados dependiendo del número de sitios de unión con su microRNA a su transcrito blanco, por ejemplo en el caso

de TAS-1, TAS-2, TAS-4 requieren un sitio de empalme y mientras que TAS-3 necesita dos lugares de unión, inclusive se ha demostrado que dependiendo de la ubicación de los sitios unión será la orientación del procesamiento dado por DCL-4, como se esquematiza con las flechas negras en la figura 3 (Borges and Martienssen 2015). A continuación se describen brevemente las familias TAS y cómo funcionan en *A. thaliana*:

- 1) El primero de ellos es el transcrito denominado TAS1/2, el cual es reconocido por miR173 desencadenando la producción de tasiRNAs, el motivo de esto radica en que los marcos abiertos de lectura de TAS1/2 son menores a 100 nt provocando que la planta los reconozca como transcritos aberrantes, y por lo tanto sea silenciado. Los tasiRNAs derivados de TAS1/2 regulan post-transcripcionalmente a los ARNm de las proteínas pentatricopéptidos (PPR proteins, por sus siglas en inglés) (Allen *et al.* 2005, Axtell *et al.* 2006).
- 2) Otro transcrito generador de tasiRNAs en *A. thaliana* es el transcrito llamado TAS-4, el cual es regulado post-transcripcionalmente por miR828 produciendo tasiRNAs que regulan post-transcripcionalmente los niveles de acumulación de los transcritos de factores de transcripción tipo MYB (Rajagopalan *et al.* 2006).
- 3) Finalmente, el último transcrito generador de tasiRNAs es conocido con el nombre de TAS-3, donde sus niveles de acumulación son modulados por miR390, éste es un microRNA conservado tanto en angiospermas como en gimnospermas. Una característica que posee TAS-3 es presentar dos sitios de reconocimiento para miR390, aunque solamente un sitio presenta una complementariedad completa, sin embargo, es necesaria la unión de miR390 en ambos sitios para que se realice el mecanismo de tasiRNAs (Axtell, *et al.* 2006). miR390 es reclutado en AGO-7 a diferencia de los otros microRNAs productores de phasiRNAs/tasiRNAs, los cuales se reclutan en AGO-1 (Allen, *et al.* 2005, Montgomery *et al.* 2008). Los tasiRNAs provenientes de TAS-3 modulan los niveles de acumulación de los factores de transcripción de respuesta a auxinas 2, 3 y 4 (en inglés Auxin Response Factors-ARF). Además, se ha reportado que en *A. thaliana* regulan la transición de la fase juvenil a adulta mediante la modulación de los factores transcripcionales ARF3/ETTIN (Fahlgren *et al.* 2006), inclusive son importantes en la definición de la polaridad adaxial/abaxial de la hoja (Nogueira *et al.* 2009), así como en el

crecimiento de raíces laterales (Marin *et al.* 2010). Finalmente, se han encontrado homólogos de TAS3 en arroz, frijol e incluso en el musgo *Physcomitrella patens*, lo que resalta la importancia del mecanismo de generación de tasiRNAs (Rajagopalan, *et al.* 2006, Shi *et al.* 2007, Trejo-Arellano 2011).

Por otro lado, en otras especies existen transcritos productores de phasiRNAs, estos son miembros de las familias génicas *PPR*, *NB-LRR* (del inglés nucleotide binding domain (NB) y leucine rich repeat (LRR) domain(s) y *MYB* (del inglés myeloblastosis) los cuales han sido reportados para *G. max*, *Medicago truncatula*, *Malus domestica* y *Prunus persica* (Fahlgren *et al.* 2007, Jeong, *et al.* 2011, Xia *et al.* 2012b, Zhu *et al.* 2012). Adicionalmente, el número de *loci PHAS* reportados varía entre especies; en lo que respecta a leguminosas se han reportado 114 *loci PHAS* en *M. truncatula* (Zhai *et al.* 2011) y 500 *loci PHAS* en *G. max*, de los que 483 sobrelapan con genes codificantes de proteínas (Arikiti *et al.* 2014), mientras que en el caso específico de *P. vulgaris* se cuenta con un solo reporte de *loci PHAS*, 125 potenciales *loci* de phasiRNA en los que 47 de ellos poseen características de regular un transcrito (Formey *et al.* 2015), por lo que su contribución en condiciones de abióticas es aún desconocida. Desafortunadamente en muchos casos, los phasiRNAs no son confirmados experimentalmente y sólo se predice su funcionalidad (Zhai, *et al.* 2011).

¿Qué se conoce sobre microRNAs, phasiRNAs y tasiRNAs en frijol bajo déficit hídrico?.

En el caso particular de microRNAs, phasiRNAs y tasiRNAs en frijol existen pocos reportes, sin embargo gracias a estudios genómicos donde se ha utilizado la secuenciación masiva, sabemos que en el genoma de frijol están presentes 307 genes que codifican precursores de microRNAs, los cuales generan 185 microRNAs maduros en los que se incluyen 121 microRNAs no publicados y que son clasificados en 98 familias, por otro lado en lo que respecta phasiRNAs se descubrieron 125 potenciales *loci* de phasiRNA en los que 47 de ellos poseen características de regular un transcrito (Formey, *et al.* 2015).

Por otra parte, conocemos muy poco en relación a microRNAs de frijol bajo tratamientos abióticos, aunque en los últimos años se ha realizado un esfuerzo sustancial en su caracterización, donde podemos mencionar trabajos realizados en déficit nutrimental, toxicidad a metales, salinidad, deficiencia de fósforo, homeostasis de cobre y en condiciones de déficit hídrico (Arenas-Huertero *et al.* 2009, Contreras-Cubas *et al.* 2012, Naya *et al.* 2014, Nova-Franco *et al.* 2015, Valdes-Lopez *et al.* 2008, Valdes-Lopez *et al.* 2010).

En este trabajo inicialmente comenzamos a caracterizar dos microRNAs no conservados y/o específicos de leguminosas donde sus niveles de acumulación fueron determinados bajo tratamientos de déficit hídrico (Arenas-Huertero, *et al.* 2009). En el transcurso del proyecto, los resultados generados permitieron enfocarnos en miR1514a. Por lo anterior, incluimos en la sección de Anexos los resultados obtenidos para miR2118, así como otros microRNAs conservados utilizados como referencia en este trabajo.

HIPÓTESIS.

Pvu-miR1514a participa en la respuesta a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris* mediante la regulación de sus mensajero(s) blanco.

OBJETIVO GENERAL.

Entender la participación de Pvu-miR1514a durante déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Determinar la acumulación de pvu-miR1514a durante el déficit hídrico, así como en respuesta a diversos factores abióticos que inducen al déficit hídrico, en plantas adultas y en plántulas de variedades contrastantes a la sequía de frijol.
- 2.- Identificar el transcrito (o los transcritos) que regula Pvu-miR1514.
- 3.- Analizar la función *in vivo* de Pvu-miR1514a y su(s) transcrito(s) blanco.

RESULTADOS.

La determinación de los *loci* de miR1514a en frijol.

En el genoma de soya existen dos *loci* de *MIR1514* denominados *MIR1514a* y *MIR1514b*, los cuales producen dos miRNAs maduros nombrados Gm-miR1514a y Gm-miR1514b respectivamente, y cuya secuencia difiere en una sola base en el extremo 3' (miRBase, versión 21), y además presentan un apareamiento asimétrico entre el microRNA maduro con su microRNA* (Goettel *et al.* 2014, Subramanian *et al.* 2008). Por otro lado, previamente Arenas-Huertero y colaboradores reportaron que miR1514a se acumula en

condiciones de déficit hídrico en plántulas de frijol de la variedad Pinto Villa sin tomar en cuenta la contribución de miR1514b en el proceso (Arenas-Huertero, et al. 2009), una de las contribuciones de este trabajo es la delimitación los *loci* de *MIR1514* en *P. vulgaris*.

Posteriormente, la reciente publicación del genoma de *P. vulgaris* nos permitió identificar los *loci* *MIR1514a* y *MIR1514b* en el genoma de frijol, donde ubicamos que *MIR1514a* se encuentra en el cromosoma 3 (posición 23530620-23530821) y *MIR1514b* en el cromosoma 7 (posición 457103-457228). Estos micro RNA codifican una secuencia idéntica a Gm-miR1514a y presentan una conformación asimétrica, es decir, existe un apareamiento desfasado entre el microRNA maduro con su secuencia estrella como puede apreciarse en la Figura 4 para los dos precursores (Figura 4).

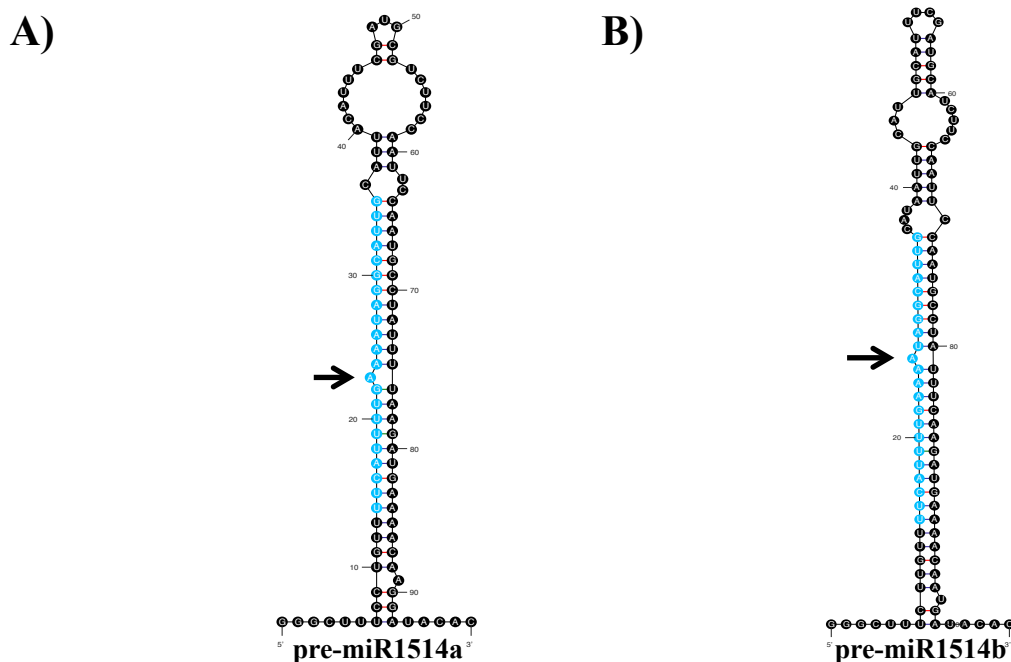


Figura 4. La estructura de pre-miR1514a y pre-miR1514b en frijol. A) pre-miR1514a tiene un $\Delta G = -30.70$ kcal/mol y B) pre-miR1514b presenta un $\Delta G = -39.10$ kcal/mol. La secuencia del microRNA maduro esta resaltada en círculos azules. En ambos casos, las flechas indican el des-apareamiento de empalme entre el microRNA maduro con su microRNA* generando una estructura asimétrica. Estructuras predichas con mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

La expresión de estos *loci* fue confirmada empleando ADN genómico así como ADNc en muestras control y de déficit hídrico de frijol, indicando que ambas isoformas están presentes en el genoma de frijol (Figura 5A). Más aún, ambos *loci* se transcriben en condiciones control y de déficit hídrico (Figura 5B).

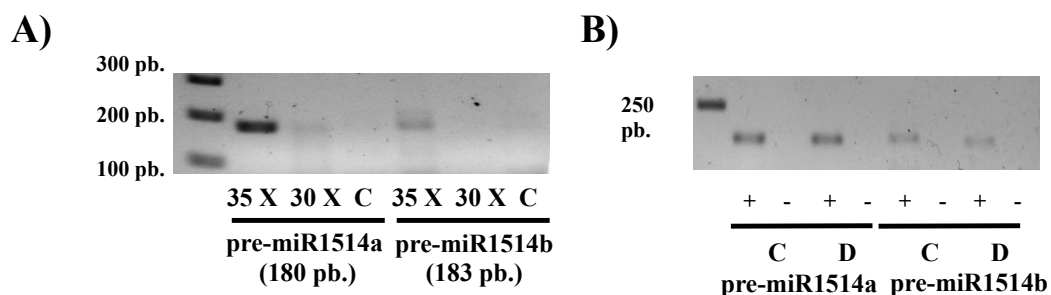


Figura 5. La expresión de los dos *loci* para miR1514a en frijol. A) pre-miR1514a y pre-miR1514b en amplificaciones de ADN genómico en 35 y 30 ciclos respectivamente y B) pre-miR1514a y (C) pre-miR1514b en amplificaciones de ADNc en condiciones de control y (D) déficit hídrico severo. (ver materiales y métodos). Los signos + y – hacen referencia al uso de la enzima transcriptasa reversa en la reacción.

Dado que Pvu-miR1514a y Pvu-miR1514b poseen una secuencia idéntica, por lo tanto no afectaría el reconocimiento del transcrito que regula post-transcripcionalmente, concluimos que la contribución de miR1514a en las cinéticas de déficit hídrico se incluye la participación de mir1514b, de manera que a partir de este momento nos referiremos como miR1514a indistintamente de su origen. En la siguiente sección nos centramos a obtener los patrones de acumulación de miR1514a en dos cultivares de frijol con diferente resistencia a la sequía.

El miR1514a presenta un nivel de acumulación diferencial en raíces de frijol en dos cultivares con tolerancia a la sequía contrastante.

Una vez definidos los *loci* de miR1514a, determinamos los perfiles de acumulación de miR1514a entre dos variedades de frijol con resistencia contrastantes a la sequía. La resistencia en estos cultivares se determinó con base a su capacidad de producir semillas en condiciones de campo bajo irrigación adecuada y sequía, definiendo la variedad de frijol Pinto Saltillo (PS) como una variedad tolerante y Bayo Madero (BM) como una variedad

sensible (Acosta-Gallegos *et al.* 1999, Terán and Singh 2002). En primer lugar, obtuvimos los niveles de acumulación de miR1514a mediante análisis tipo northern blot en diferentes tejidos de plántulas de frijol de 5 días de edad de las variedades PS y de plántulas de BM de 7 días, bajo dos tratamientos déficit hídrico (ver materiales y métodos). Recolectamos el tejido a las 6, 12, 24 y 48 h después de haber iniciado la cinética (Figura 6).

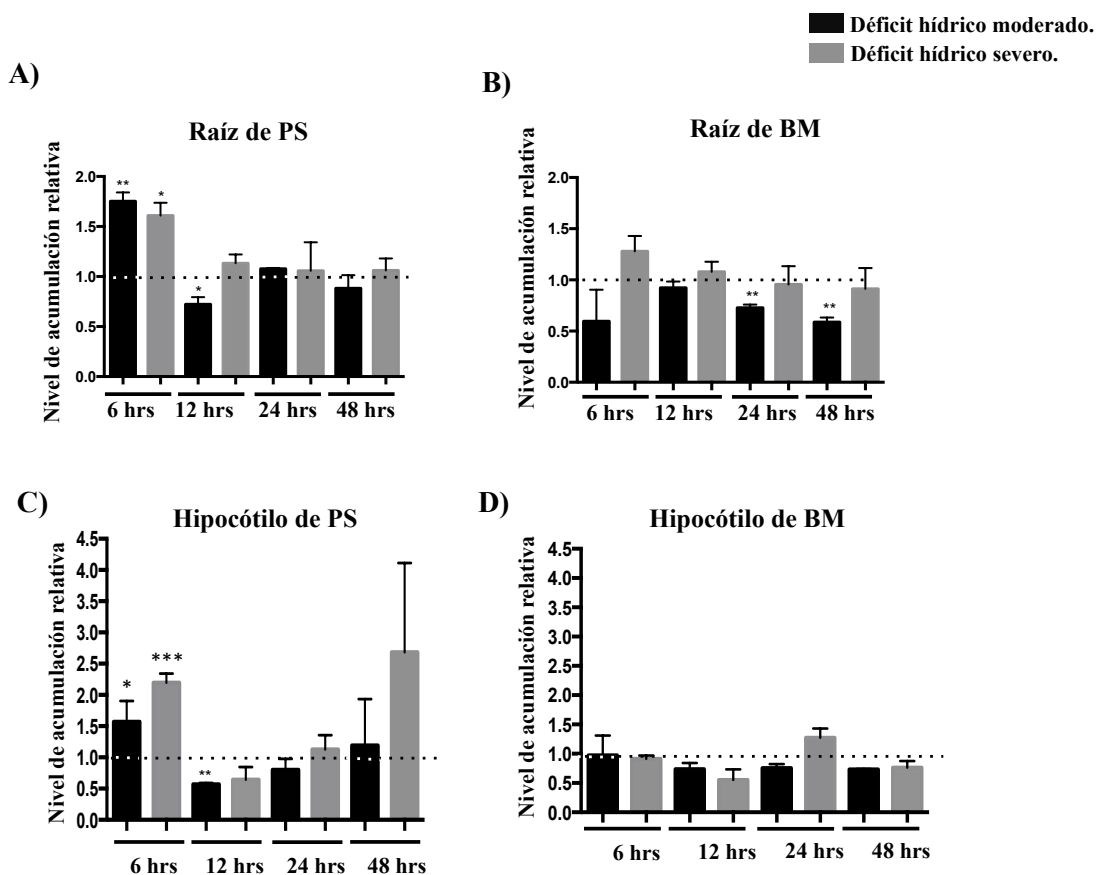


Figura 6. El miR1514a muestra niveles de acumulación diferencial en hipocótilos y raíces de plántulas en dos cultivares con diferente resistencia a la sequía. A) Análisis gráfico del northern blot realizado a partir del ARN total proveniente de raíces de plantas adultas de PS , B) Análisis gráfico del northern blot realizado a partir del ARN total provenientes raíces de plántulas de BM, C) Análisis gráfico del northern blot realizado en hipocótilos de plántulas de PS y D) Análisis gráfico del northern blot realizado en hipocótilos de plántulas de BM. Las líneas punteadas representan los niveles control de miR1514a en cada tiempo de tratamiento. Todos los valores de miR1514a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño nuclear U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control en cada tiempo del tratamiento, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras señalan el error estándar, $n = 3$.

Con estos experimentos, demostramos que miR1514a presenta diferentes niveles de acumulación durante las cinéticas de déficit hídrico realizadas en los diferentes tejidos de plántulas de frijol, permitiéndonos concluir que los niveles de acumulación de miR1514a incrementan en raíces de PS a las 6 h de tratamiento (Figura 6A), en contraste con la variedad BM donde no se observaron cambios (Figura 6B). En hipocótilos, sólo en la variedad PS observamos una acumulación a las 6 h de miR1514a tanto en la condición de déficit hídrico moderado como severa (Figura 6C y 6D).

Por otro lado, obtuvimos los patrones de expresión de miR1514a por ensayos tipo northern blot en hojas y raíces de plantas adultas de PS y BM, bajo dos tratamientos de disminución de agua en el medio nombrados aquí déficit hídrico severo y déficit hídrico moderado. Este material fue obtenido por Rosales y colaboradores en el 2012, quienes colectaron los tejidos a los 13 y 22 días de tratamiento (Rosales *et al.* 2012) (Figura 7).

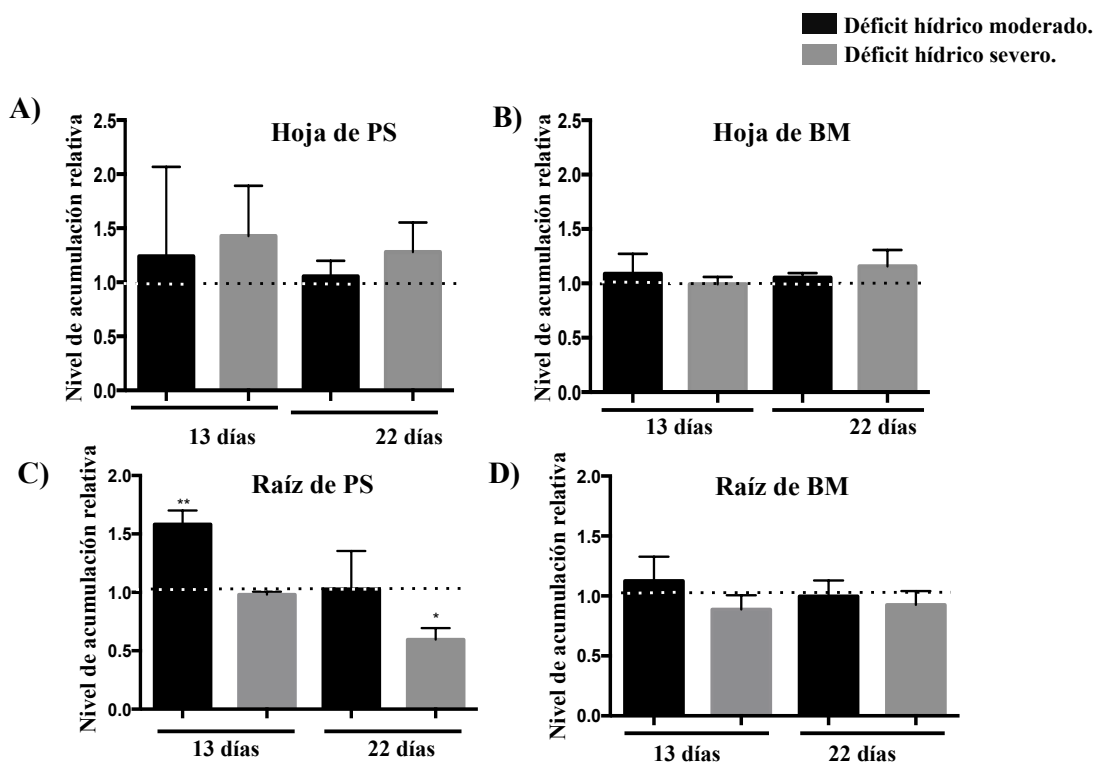


Figura 7. El miR1514a presenta niveles de acumulación diferencial en hojas y raíces de plantas adultas provenientes de dos cultivares con diferente resistencia a la sequía.

A) Análisis gráfico del northern blot realizado en hojas de PS, B) Análisis gráfico del northern blot realizado en hojas de BM. C) Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces de PS y D) Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces de BM. Todos los

valores de miR1514a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño nuclear U6. Las líneas punteadas representan los niveles normalizados de miR1514a en condiciones control en cada tiempo del tratamiento. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras señalan el error estándar, $n = 3$.

En el caso de tejidos adultos encontramos patrones similares a los obtenidos para plántulas, miR1514a, mostrando oscilaciones en sus niveles de acumulación en tejidos adultos en donde presenta un incremento significativo en raíces y no en hojas a los 13 días, en comparación con las condiciones control (Figura 7A y C), mientras que para BM las plantas no presentaron diferencias significativas (Figura 7B y D). Estos resultados son los primeros en reportar que miR1514a modula sus niveles de acumulación en plántulas y en plantas adultas en etapa vegetativa entre dos variedades contrastantes durante condiciones de déficit hídrico.

Además, no descartamos la posibilidad que miR1514a responda a otras condiciones de estrés abiótico que conlleven a la déficit hídrico. Por ello, en un ensayo exploratorio realizado con plántulas de 5 días de crecimiento después de la germinación de la variedad PS determinamos los niveles de acumulación de miR1514a por northern blot en hipocótilos y raíces de plántulas utilizando la adición de la fitohormona ABA al medio, dos diferentes condiciones de NaCl, así como el uso del herbicida comercial Paraquat para inducir estrés oxidativo (Figura 8).

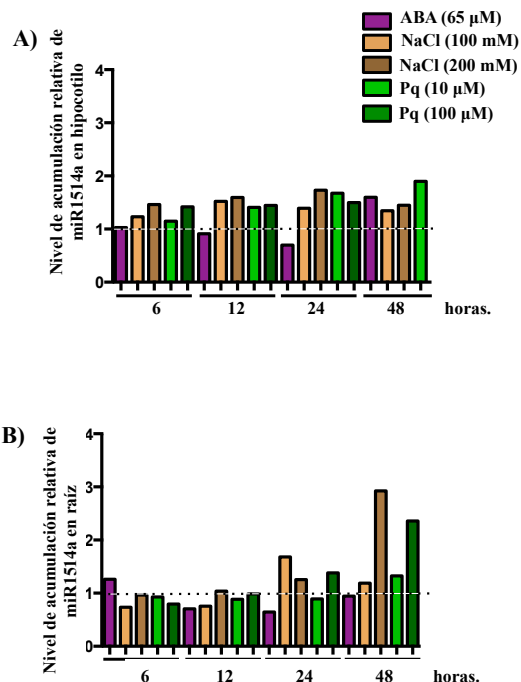


Figura 8. Los niveles de acumulación de miR1514a en hipocótilos y raíces de frijol variedad PS bajo diferentes condiciones abióticas. A) Análisis gráfico del northern blot realizado en hipocótilos provenientes de plántulas de PS, B) Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces provenientes de plántulas de PS. Pq=Paraquat, NaCl=cloruro de sodio, ABA=ácido abscísico. Todos los valores de miR1514a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño nuclear U6. Las líneas punteadas representan los niveles de miR1514a en las condiciones control en cada tiempo de tratamiento.

Los datos anteriores no revelan resultados que muestren una tendencia clara cuando utilizamos otras condiciones de estrés abiótico, por lo que decidimos enfocar nuestro estudio al tejido de la raíz y a la condición de déficit hídrico pues miR1514a presenta una acumulación significativa en la variedad PS a las 6 hr, como se mostró en la figura 6A.

El miR1514a regula a dos factores transcripcionales de la familia NAC en condiciones de déficit hídrico.

Una de las pautas más importantes en el estudio de microRNAs es conocer la función biológica que realizan, en otras palabras conocer que transcrito blanco regulan post-transcripcionalmente. En el 2015, Formey y colaboradores reportaron transcritos que

son regulados por microRNAs conservados y específicos en *P. vulgaris* mediante la generación de un Degradoma también conocido como Análisis en paralelo de extremos finales de ARN (PARE, por sus siglas en inglés) en las plántulas de la variedad Pinto Villa. El Degradoma de ARN es una técnica que combina la secuenciación masiva y la versión modificada del 5'RACE (por sus siglas en inglés 5' Rapid amplification of cDNA ends) proporcionándonos aquellos ARN mensajeros que se encuentran en vías de degradación y que permite la identificación de sitio(s) de corte mediados por microRNAs (Addo-Quaye *et al.* 2008, Thomson *et al.* 2011). Gracias a datos del degradoma en frijol, se ha generado un catálogo de microRNAs y phasiRNAs, así como de sus transcritos diana que pudieran estar participando en la regulación de procesos particulares en frijol como la nodulación y/o defensa por infección de patógenos (Formey, *et al.* 2015).

Con el análisis del Degradoma en frijol junto con la disponibilidad de la secuencia del genoma de frijol (Schmutz, *et al.* 2014, Vlasova, *et al.* 2016), se evaluó que dos transcritos codificantes para factores transcripcionales pertenecientes a la familia NAC son regulados por miR1514a, estos son Phvul.010G121000 y Phvul.010G120700. En este trabajo nos referiremos a ellos como NAC 000 y NAC 700 (Figura 9).

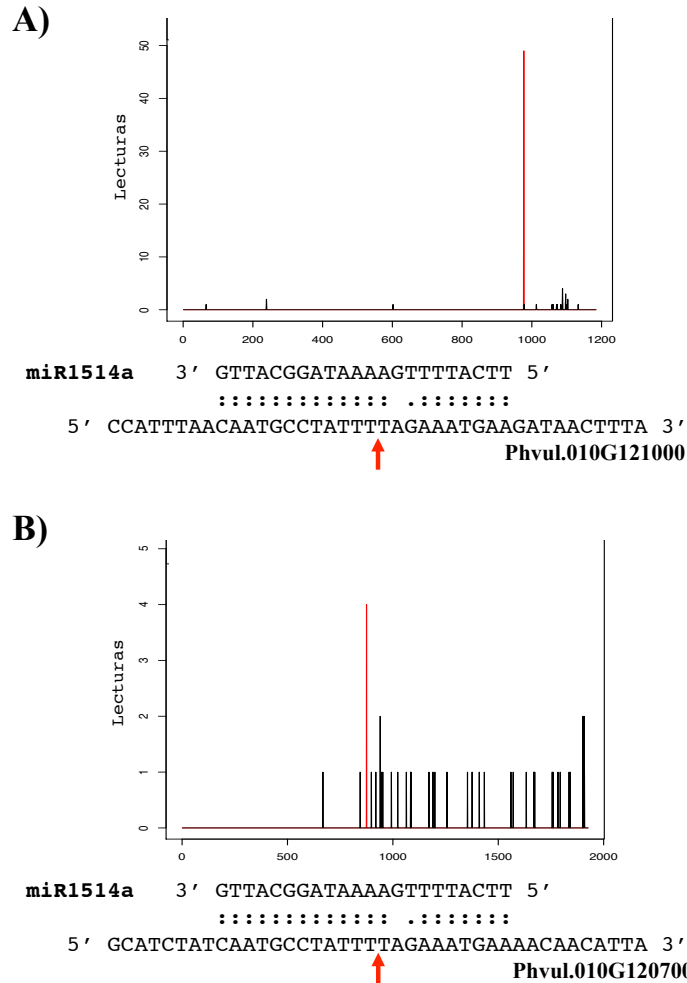


Figura 9. El miR1514a regula post-transcripcionalmente a dos diferentes transcritos NAC. A) Phvul.010G121000 (NAC 000) y B) Phvul.010G120700 (NAC 700) son regulados por miR1514a. El eje de las X se muestra esquematizado al transcrito blanco en pb, finalmente la flecha roja señala la posición de corte en el mensajero en el contexto del apareamiento con miR1514a, mientras en el eje de las Y se representa el número de lecturas que se encontradas (Figuras tomadas de Formey *et al.*, 2015).

Sin embargo, en las muestras utilizadas correspondientes a raíces adultas de frijol de las variedades PS y BM, durante condiciones de déficit hídrico pudimos detectar únicamente la presencia del transcrito de NAC 700 pese a numerosas modificaciones metodológicas. Sin embargo, cuando utilizamos ADN genómico como templado la amplificación fue exitosa, indicando que NAC 000 no se expresa en raíces de plantas adultas (Figura 10). Por ello, en los siguientes experimentos sólo se evaluó la acumulación del ARNm de NAC 700 en las condiciones de déficit hídrico probadas.

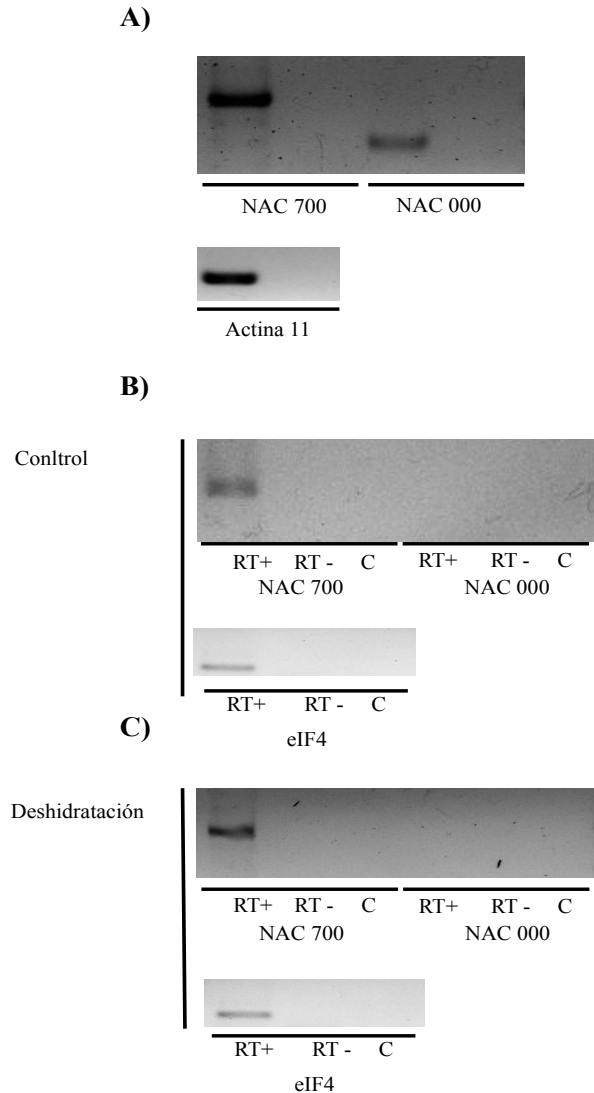


Figura 10. El transcrito de NAC 700 es amplificado en raíces de frijol sometidas a sequía. A) Amplificaciones a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos para NAC 700 y NAC 000, B) Amplificaciones a partir de ADNc provenientes de muestras en control utilizando los oligonucleótidos para NAC 700 y NAC 000 y C) Amplificaciones a partir de ADNc provenientes de muestras en déficit hídrico, utilizando los oligonucleótidos para amplificar los transcritos de NAC 700 y NAC 000. Los signos + y – hacen referencia a la presencia de la enzima transcriptasa reversa en la reacción. C = control negativo. El tamaño amplificado de NAC 700 es de 360 pb, mientras NAC 000 tiene un tamaño de 248 pb. Actina 11 y eIF4 fueron utilizados como controles positivos y de carga en las reacciones.

Por otro lado, determinamos los patrones de acumulación de NAC 700 en el mismo tiempo donde observamos la correlación en los patrones de acumulación de miR1514a en respuesta

al déficit hídrico. Mediante RT-qPCR detectamos que los niveles del transcrito de NAC 700 disminuyen en raíces adultas de PS (Figura 11A), lo que correlaciona con la acumulación de miR1514a en PS (Ver figuras 7C). En contraste, NAC 700 no mostró cambios en las raíces de BM con los niveles de miR1514a observados previamente (comparar Figura 11B y 7D).

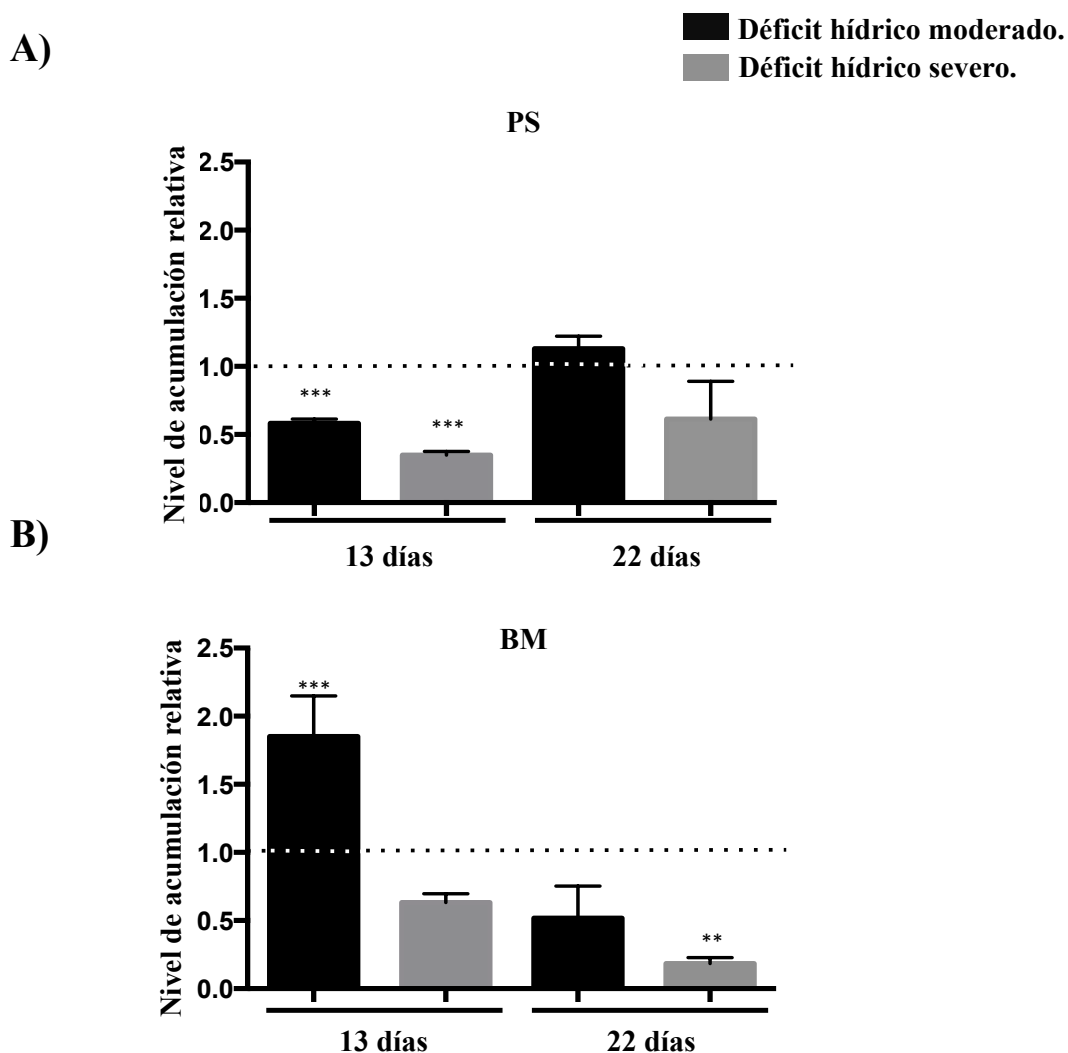


Figura 11. En el cultivar PS NAC 700 muestra una reducción significativa en condiciones de déficit hídrico. A) Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces adultas de PS por RT-qPCR, utilizando los oligonucleótidos para amplificar el transcrito de NAC 700. B) Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces adultas de BM determinados por RT-qPCR, utilizando los oligonucleótidos para amplificar el transcrito de NAC 700. Déficit hídrico moderado representa una irrigación de 1/4 de cc, mientras sequía severa para plántulas de 1/8 de cc (Ver materiales y métodos). Todos los valores de NAC 700 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARNm de SKYP 16. La líneas punteadas representan los niveles de miR1514a en cada tiempo de tratamiento en plantas

bien irrigadas. Los asteriscos indican una diferencia significativa comparada con las condiciones control en cada tiempo del tratamiento, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras señalan el error estándar, $n = 3$.

La disminución del transcrito NAC 700 y el aumento de miR1514a nos muestra que existe una correlación en sus niveles de acumulación sólo en el tejido de la raíz en la variedad PS, sin embargo no descartamos que otros factores puedan estar involucrados en modular los niveles de NAC 700, como por ejemplo la regulación transcripcional del gen NAC 700. Basado en dicho resultado, en los próximos estudios nos referiremos al tejido de raíz de la variedad PS. En la siguiente sección determinamos que miR1514a realiza otra función adicional a regular post-transcripcionalmente al transcrito de NAC 700 en frijol.

El transcrito de NAC 700 es procesado por miR1514a produciendo phasiRNAs.

Dado que miR1514a es un microRNA de 22 nt de longitud y además presenta un des-apareamiento entre su microRNA y su microRNA* en el precursor (ver figura 3), hipotetizamos que el corte de su transcrito blanco podría generar ARNs pequeños en fase conocidos como phasiRNAs. Este fenómeno ha sido documentado para microRNAs con las características mencionadas en varias especies (Axtell, et al. 2006, Fei, et al. 2013).

Ante esto, utilizamos un enfoque bioinformático que evalúa la formación phasiRNAs a partir del sitio de corte de un microRNA en su transcrito utilizando los datos de secuenciación masiva de ARN pequeños disponibles para frijol (Pelaez *et al.* 2012). De esta manera, se asignó un valor de probabilidad (P-value) para los transcritos NAC 700 y NAC 000. Como control positivo del análisis empleamos al transcrito *TAS 3* el cual es un ARNm generador de phasiRNAs y que se ha reportado que es procesado por miR390 en *A. thaliana* y otras plantas; los phasiRNAs resultantes llamados tasi-ARF están implicados en la regulación de factores de respuesta a Auxinas (Axtell, et al. 2006) (Tabla 2).

Probabilidad de generar phasiRNAs	
Transcrito	P - value
Phvul.010G120700.1	5.9 e-6
Phvul.010G1221000.1	N/D
TAS-3	9.16 e - 5

Tabla 2. Probabilidad de generar phasiRNAs a partir de dos transcritos de NAC utilizando el algoritmo reportado por Chen, et al. 2007. N/D = No significativo.

Del análisis anterior demostramos bioinformáticamente que NAC 700 presenta un valor de probabilidad significativo ($p=5.9 \times 10^{-6}$), mientras que NAC 000 no generó un valor alguno que mostrara la posible generación de phasiRNAs. Por su parte, el gen *TAS 3* que sirvió como control positivo, presentó un valor significativo ($p=9.1 \times 10^{-5}$) (Tabla 2) or lo que estos resultados sugieren fuertemente que el transcrito de NAC 700 produce phasiRNAs a partir del sitio de empalme y corte con miR1514a en frijol. De manera independiente y utilizando un algoritmo distinto, se identificó que el transcrito del gen Phvul.010G120700 es formador de phasiRNAs en *P. vulgaris* (Formey, et al. 2015). En la siguiente figura se esquematizan estos resultados para NAC 700.

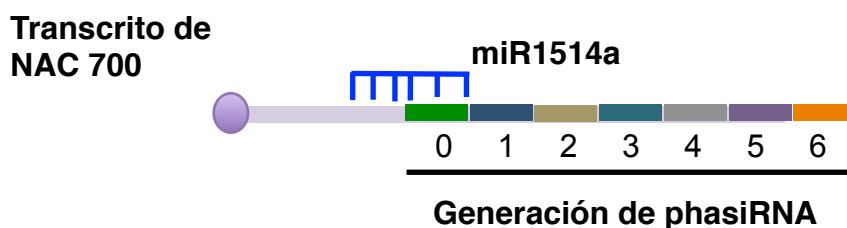


Figura 12. Esquema de la producción de phasiRNAs a partir del corte de miR1514a con NAC 700. Los phasiRNAs inician en el sitio de corte de miR1514a continuando en fases de 21 nts, otorgándole en este trabajo una identidad de acuerdo a su orden de generación.

Adicionalmente, determinamos que los phasiRNAs provenientes de NAC 700 se encuentran presentes en dos secuenciaciones masivas de dicha especie mostrando diferentes número de lecturas (Nakano *et al.* 2006, Pelaez, et al. 2012) (Tabla 3).

Número	Secuencia	Número de lecturas (Pelaéz <i>et al.</i> , 2012)	Número de lecturas (Nakano <i>et al.</i> , 2006)
1	GCAGATTCCATCTGAAACTAC	901	34
2	CCAGATTCCAATCTGAAACTAAG	-	7
3	GCAGATTCCATCTGAAACTATT	91	11
4	TCAGATGGAATCTGAAACCAAG	1610	2
5	CAGATTCCATCTTCTGAAACT	-	-
6	CTATTATCTGAAGCTAAGCAG	1935	13
7	GCAGATTCATCTGAAACTAC	-	-

Tabla 3. Lecturas de phasiRNAs provenientes de NAC 700 en dos independientes secuenciaciones masivas de ARNs pequeños. La nomenclatura de dichos phasiRNAs indica el orden de aparición a partir del sitio de corte con miR1514a (Nakano, et al. 2006, Pelaez, et al. 2012).

Este tabla nos indica que los phasiRNAs provenientes de NAC 700 pueden ser reproducibles al estar presentes en otros estudios, por lo que no descartamos que en frijol pudieran estar actuando con una función desconocida, de manera que evaluamos los niveles de acumulación de estos phasiRNAs derivados de NAC 700 bajo condiciones de déficit hídrico en frijol mediante análisis de RT-qPCR (Figura 13).

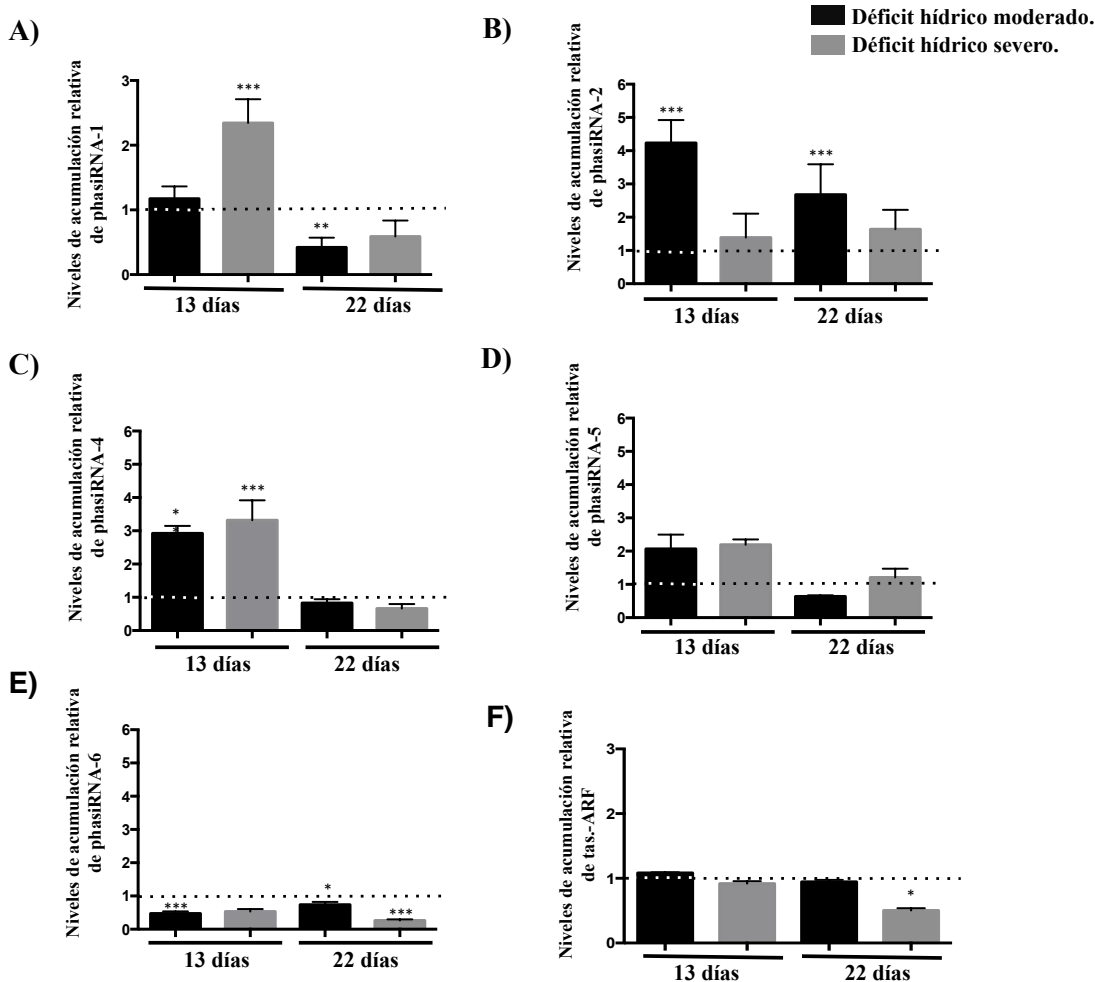


Figura 13. Niveles de acumulación de algunos phasiRNAs procedentes de NAC 700 durante una cinética de déficit hídrico. A) Niveles de acumulación de phasiRNA-1, B) phasiRNA-4, C) phasiRNA-5A, D) phasiRNA-6, así como F) el tasi-ARF, durante la cinética de déficit hídrico (Ver materiales y métodos). Todos los valores de phasiRNAs fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6, así como las líneas punteadas representan los niveles control del phasiRNA problema que fue normalizado a 1. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control en cada tiempo del tratamiento, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras de error señalan el error estándar, $n = 3$.

Estos resultados nos indican que los phasiRNAs presentan una acumulación diferencial en los distintos tiempos del tratamiento y en las condiciones probadas. Sólo los niveles de los phasiRNAs 1, 2, 4 y 5 se incrementaron en raíces durante la cinética (Figura 13A, B, C y D), esto concuerda con un aumento de los niveles de miR1514a y la disminución del transcrito de NAC 700. Como control para este análisis, determinamos los patrones de

expresión del tasiARF más abundante proveniente del transcrito TAS-3 de frijol iniciado por el corte de miR390 (Axtell, et al. 2006), el cual no mostró cambios en su acumulación durante las cinéticas del tratamiento de limitación de agua (Figura 13E).

Consecuentemente, de estos phasiRNAs derivados de NAC 700 realizamos una predicción bioinformática para conocer si tienen el potencial de regular post-transcripcionalmente algún transcrito mediante el servidor en línea psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>, utilizando todos los genes de *P. vulgaris* y utilizando los parámetros predeterminados. En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos (Tabla 4).

Transcritos blancos de los phasiRNAs provenientes de NAC 700.			
Nombre	Gen blanco y su ontología.	Valor de expectación (E)	Manera en como realiza la inhibición
phasiRNA-1	Phvul.003G206700.1 SF56, RRM, splicing factor	2	Corte
	Phvul.002G330600.1 SEL1-like	3	Traducción
phasiRNA-4	Phvul.007G089100.1 No hay una función anotada	3	Corte
phasiRNA-5	Phvul.009G142700.1 Conserved membrane protein (DUF2044)	3	Corte
	Phvul.003G097700.1 Adaptor complexes medium subunit family	3	Corte
phasiRNA-6	Phvul.005G059500.1 Peroxidase	3	Corte
	Phvul.005G059700.1 Peroxidase	3	Corte
	Phvul.006G006200.1 O-metiltransferase	3	Traducción

Tabla 4. Transcritos blanco predichos de los phasiRNAs derivados de NAC 700 mediante el servidor psRNA target: A Plant Small RNA Target Analysis Server <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>. Se muestra el valor de expectación que refleja la probabilidad de que un transcrito sea regulado por un RNA pequeño; los valores cercanos a 0 son altamente probables.

Basados en estas predicciones, realizamos la validación experimental mediante la técnica 5'RACE de varios candidatos, sin embargo no pudimos confirmar las predicciones en las condiciones probadas.

Por otro lado, realizando análisis tipo MEME de los otros miembros de la familia NAC en frijol se predice que el sitio complementario de unión a miR1514a así como phasiRNA-1 están presente para cuatro de ellos (Figura 14A), e inclusive dichas secuencias concenso las encontramos en transcritos homólogos de NAC 700 de *G. max* y *M. truncatula* (Glyma.16G016700 y Medtr8G023860, respectivamente Figura 14B). Recientemente se ha demostrado la existencia de miR1514a en dichas leguminosas, regulando post-transcripcionalmente una versión homóloga de NAC 700 que produce phasiRNAs (Arikiti, et al. 2014, Sosa-Valencia *et al.* 2017a, Sosa-Valencia *et al.* 2017b).

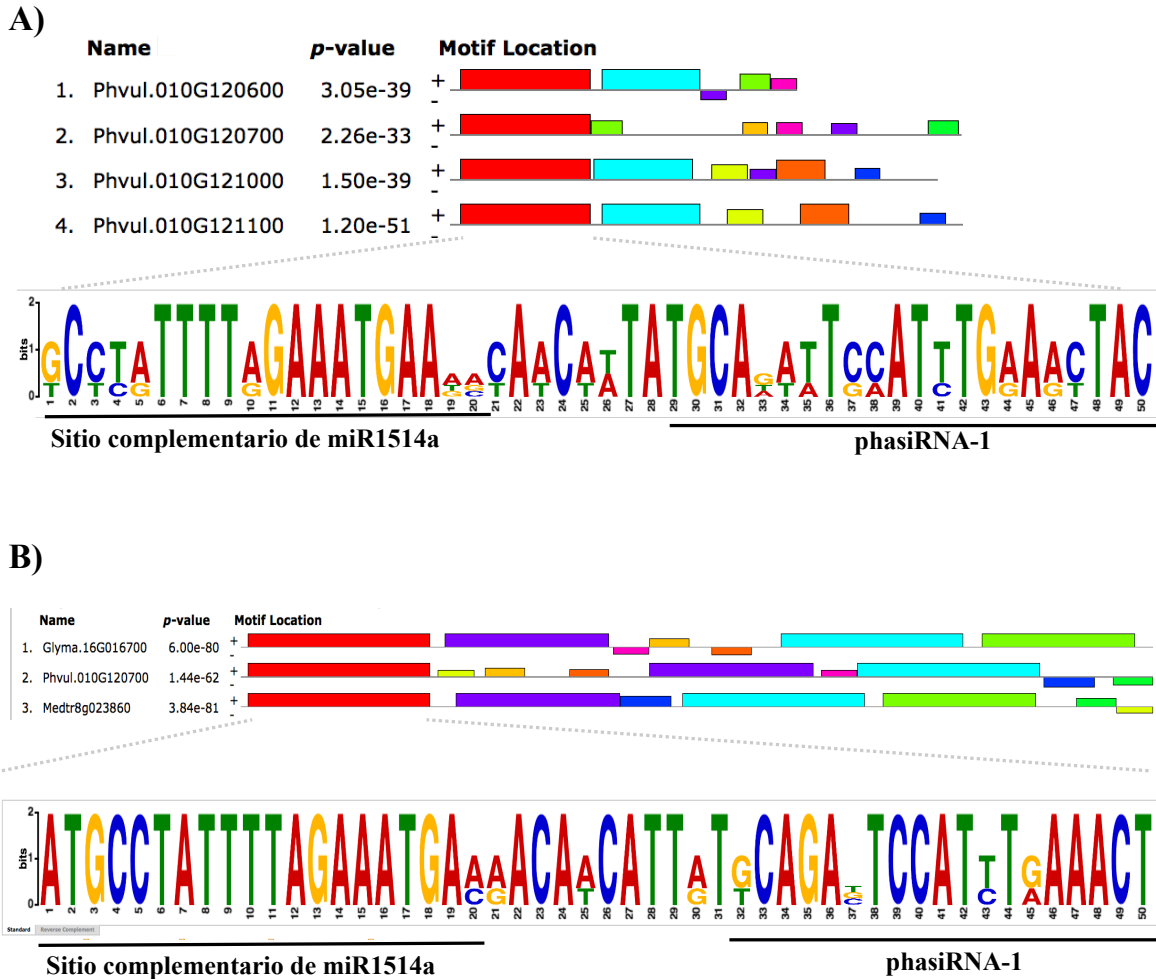


Figura 14. Conservación de phasi-1 en otros transcritos de NAC y en otras leguminosas. A) Cuatro transcritos de NAC en frijol (Phvul010G120600, Phvul010G120700, Phvul010G121000, Phvul010G121100) comparten el sitio de unión de miR1514a y la secuencia de phasiRNA1. B) El sitio de unión de miR1514a así como el phasiRNA1 se encuentran en otros genes NAC de otras leguminosas. Pvu = *Phaseolus vulgaris*, Gma = *Glycine max* and Mtr = *Medicago truncatula*.

De la figura 14 concluimos que phasiRNA-1 está presente en otros transcritos homólogos a NAC 700 e inclusive está conservado en otros miembros de la familia Fabacea (Leguminosas), sin embargo los otros phasiRNAs derivados de NAC 700 no aparecen en el análisis. En el siguiente apartado se continuará explorando si estos phasiRNAs son funcionales aunado a la idea que miR1514a está regulando sus niveles de expresión.

La modulación de los niveles de miR1514a tiene un efecto directo sobre la abundancia del transcrito NAC 700 y de los phasiRNAs derivados de este.

Para evaluar experimentalmente la modulación directa de miR1514a sobre el transcrito de NAC 700, generamos raíces aéreas conocidas como *hairy roots* en frijol mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* (Estrada-Navarrete et al. 2007). Las cepas empleadas de *A. rhizogenes* contienen una construcción que dirige la expresión del precursor de pvu-miR1514a por el promotor viral 35S (pBA-premiR1514a-TdT) o bien una construcción que inhibe la actividad de miR1514a usando la estrategia conocida como repeticiones cortas en tándem que mimetizan al transcrito blanco, en inglés Short Tandem Target Mimicry (STTM-miR1514a), dicha técnica fue reportada por Yan y colaboradores en el 2012, la cual consiste en la producción de un transcrito no codificante con secuencias complementarias al miRNA de interés para secuestrarlo e inhibir su acción sobre los transcritos blanco (Yan *et al.* 2012). Como control utilizamos una construcción sin ninguna secuencia codificante llamado aquí Plásmido vacío (Ver materiales y métodos). Una vez realizada la modulación de miR1514a en las *hairy roots*, en consecuencia, realizamos la detección de los niveles de acumulación de miR1514a, de NAC 700 y de los phasiRNAs derivados de este último (Figura 15).

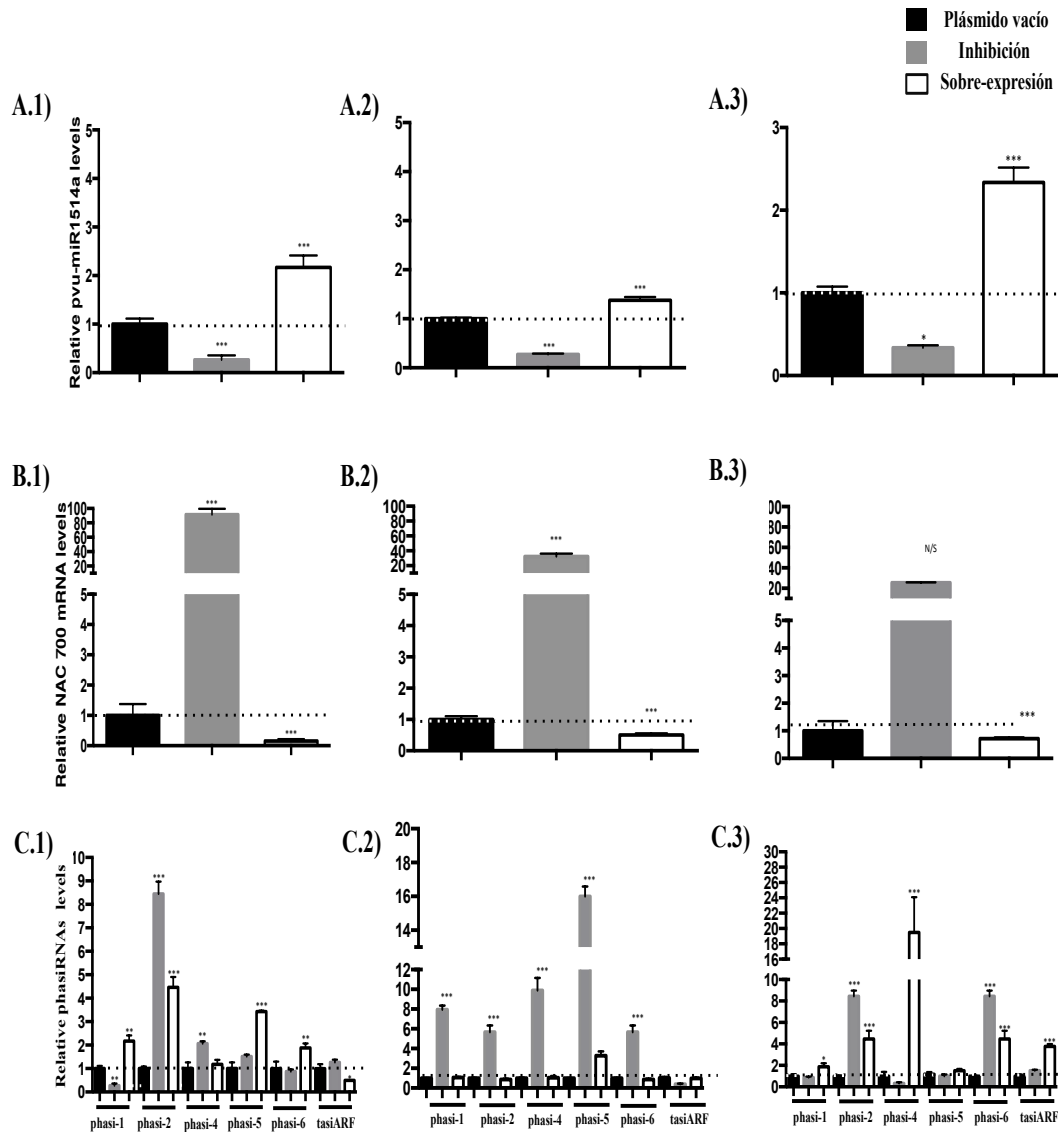


Figura 15. La sobre-expresión e inhibición de miR1514a tiene un efecto sobre los niveles de acumulación de NAC 700 y sobre los phasiRNAs derivados de este.

Mediante RT-qPCR detectamos los niveles de acumulación de miR1514a, NAC 700 ARNm y de los phasiRNAs producidos por NAC 700 en *hairy roots* de tres experimentos independientes con dichas construcciones (A-C respectivamente). A.1, A.2 y A.3) niveles de acumulación relativa de miR1514a, B.1, B.2 y B.3) niveles de NAC 700 ARNm y C.1, C.2 y C.3) niveles de phasiRNAs generados a partir de NAC 700 y el tasi-ARF no relacionado con NAC 700. Las líneas punteadas representan los niveles de miR1514a, NAC 700, y phasiRNAs en las *hairy roots* generadas con el vector vacío. Los niveles de miR1514a y phasiRNAs fueron normalizados con los niveles endógenos del snU6. Los niveles de NAC 700 ARNm fueron normalizados con los niveles de SKYP 16. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control en cada tiempo del tratamiento, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de

comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras de error señalan el error estándar, $n = 3$.

Basados en los resultados ya descritos sobre el comportamiento de miR1514a y NAC 700 durante la cinética de déficit hídrico, obtuvimos una tendencia similar de estos en raíces transgénicas, donde en la sobre-expresión de miR1514a se obtuvo un incremento en los niveles miR1514a maduro (barras blancas en la Figura 15A 1-3), y por consiguiente una disminución del transcrito NAC 700 (barras blancas en la Figura 15B 1-3). Lo anterior contrasta con lo obtenido cuando se redujeron los niveles de miR1514a (barras grises en la figura 15A 1-39), ya que aumenta la acumulación del transcrito de NAC 700 (barras grises en la figura 15B 1-3), aunado a lo anterior obtuvimos la acumulación de algunos phasiRNAs derivados del transcrito de NAC 700 en estas raíces transgénicas, en donde no observamos una tendencia clara para ninguno de ellos. Como control de dicho estudio, obtuvimos los niveles del tasi-ARF más abundante en frijol bajo estas condiciones, los cuales no fueron afectados (Figura 15C 1-3), recordemos que los tasi-ARF es producto de la degradación de transcrito TAS-3 mediado por miR390 (Axtell, et al. 2006).

Este resultado concuerdan con lo obtenido en raíces de la variedad PS, donde miR1514a modula los niveles de NAC 700 que repercute en la generación de phasiRNAs, además los patrones de miR159a no se vieron afectados al modular la acumulación de miR1514a, demostrando que la regulación de miR1514a no afecta la expresión de otros microRNAs. miR159a un microRNA no relacionado cuyos valores tampoco cambiaron significativamente (Mallory and Vaucheret 2006) (Figura 16).

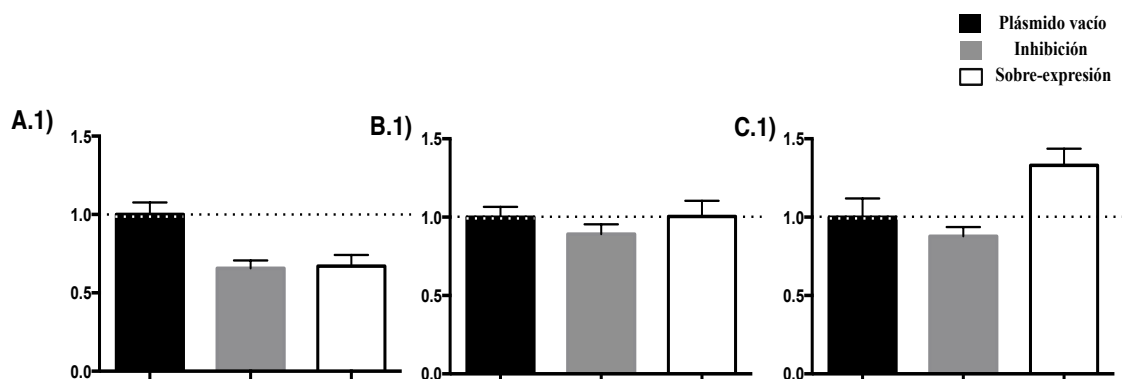


Figura 16. La modificación de los niveles de miR1514a en *Hairy roots* no afecta los niveles miR159a. A-C) Representación gráfica del transcrito de miR159a en tres réplicas biológicas independientes por RT-qPCR. Las líneas punteadas representan los niveles control de miR159a en cada tiempo de tratamiento. Todos los valores de miR159a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control en cada tiempo del tratamiento, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), las barras de error señalan el error estándar, $n = 3$.

De estos resultados concluimos que la modulación de miR1514a es directamente proporcional a los niveles de NAC 700 y que esta influye en la expresión de los phasiRNAs producidos por NAC 700. Para continuar el estudio los phasiRNAs derivados de NAC 700 realizamos la inmunoprecipitación en AGO-1 de frijol, dado que surge la pregunta si estos modulan a un mensajero o no.

La asociación de phasiRNA-1 con AGO-1.

AGO-1 es la principal proteína efectora del complejo RISC e importante en la ruta de silenciamiento post-transcripcional mediada por microRNAs, dado que interactúa con el microRNA y su transcrito diana para la realización del mecanismo PTSG (Covarrubias and Reyes 2010, Vaucheret 2008), de forma que la identificación de microRNAs asociados a AGO-1 puede descubrir un conjunto de microRNAs y de ARNm que generalmente no se han descrito (Wu *et al.* 2009), por lo que la realización de la inmunoprecipitación de la proteína AGO-1 en raíces de frijol puede sugerir si los phasiRNAs generados por NAC 700 sean funcionales. Además, recordemos que predicciones bioinformáticas señalan que los phasiRNAs provenientes del transcrito de NAC 700 pueden regular un transcrito blanco (Tabla 4).

Brevemente, el extracto proteico total obtenido de raíces de plantas adultas de PS sometidas a condiciones de déficit hídrico fue incubado con un anticuerpo policlonal que reconoce un péptido presente en la secuencia de AGO-1 de frijol, de manera que la recuperación de AGO-1 fue verificada por análisis tipo western blot, en la Figura 17.

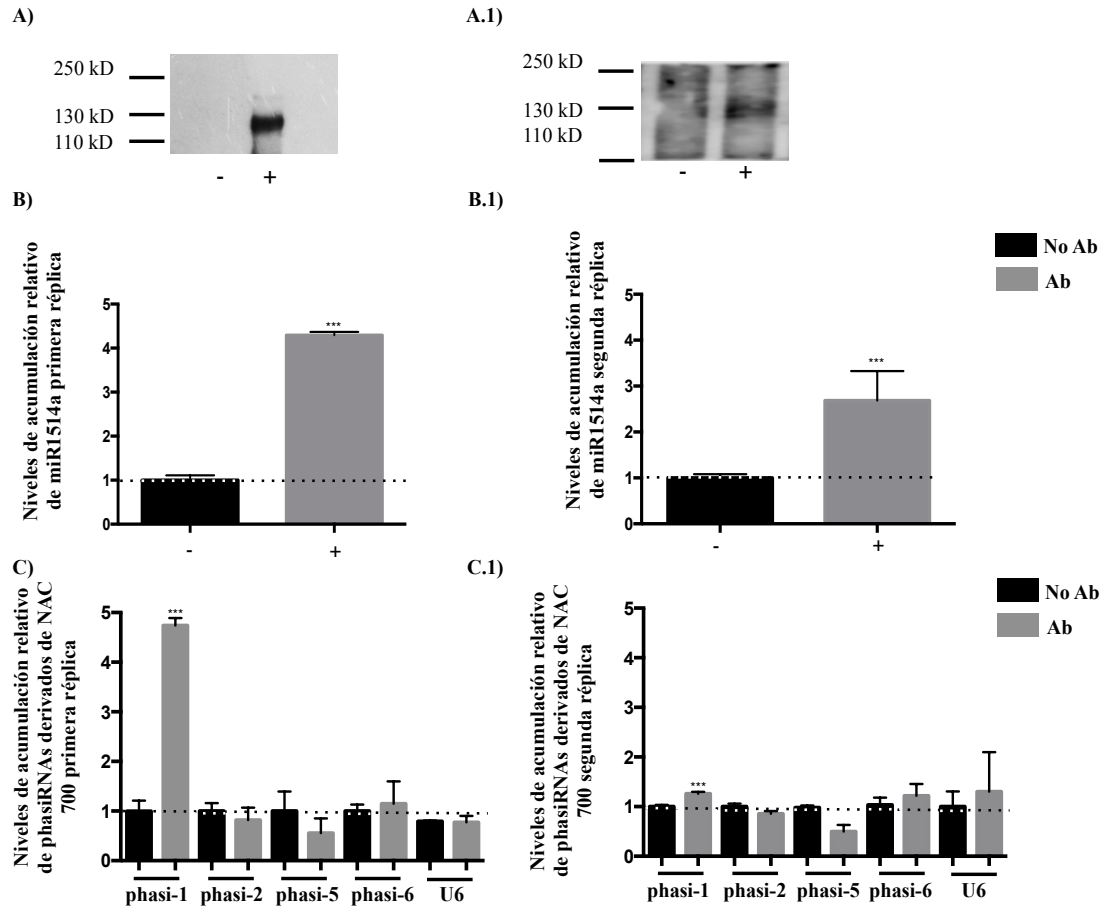


Figura 17. phasiRNA-1 proveniente de NAC 700 se encuentra asociado con AGO-1. Immunoprecipitaciones independientes fueron realizadas con extractos totales de raíces de plantas adultas de PS sometidas a falta de agua, los cuales fueron tratados con un anticuerpo dirigido contra la proteína AGO-1. A y A.1) Western blot de AGO-1 en la muestra inmunoprecipitada. El ARN total obtenido de la fracción inmunoprecipitada fue utilizado en reacciones de RT-qPCR para determinar los niveles de B y B.2) miR1514a, C y C.1) algunos phasiRNAs derivados de w700, así como de U6 snRNA. Los valores fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6 que es representado por la líneas punteadas. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones sin anticuerpo anti AGO-1, la cual fue dada por la prueba estadística t-test de Student's, (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001), las barras de error señalan el error estándar, n = 3.

Como se aprecia en la figura 17, la fracción de AGO-1 mostró el enriquecimiento esperado de miR1514a (Figura 17B 1 y 2), mientras que el control negativo U6 snRNA U6 no fue enriquecido (Figura 17C 1 y 2). De estos resultados observamos que de los phasiRNAs analizados, sólo el phasiRNA 1 fue enriquecido en las inmunoprecipitaciones de AGO-1 lo que sugiere que es funcional (Figura 17C 1 y 2). Por otro lado, no descartamos que la baja

abundancia de los otros phasiRNAs derivados de NAC 700 pueda deberse a su asociación con otra proteína AGO. Recordemos que en *A. thaliana* existen 10 distintas proteínas AGO cumpliendo distintas funciones, clasificadas en tres clados y recordemos que cada una de ellas esta relacionada a asociarse a determinado ARN pequeño, donde AGO-1 se asocia preferentemente con ARNs pequeños que comienzan con un Uracilo (U) en el extremo 5' y son de 21 nt, AGO-2 y AGO-4 cargan ARN pequeños que contienen una Adenosina (A) en su extremo 5' y de 24 nt, mientras que AGO5 une ARN pequeños que comienzan con Citosina (C) aunque se unen ARN pequeños de 21, 22 y 24 nt (Mallory and Vaucheret 2010, Qi and Mi 2010).

En conclusión, basado en los resultados de la inmunoprecipitación de AGO1 postulamos que miR1514a posee una función adicional a sólo cortar el transcrito de NAC 700, pues demostramos que genera phasiRNAs a partir de su sitio de corte con NAC 700, e inclusive uno de estos phasiRNAs -llamado en este estudio phasiRNA-1- puede asociarse con AGO-1, lo que sugiere que es funcional. Sin embargo, no pudimos validar experimentalmente alguno de los transcritos diana de phasiRNA-1 que predecimos bio-informáticamente (Tabla 4), por lo que no descartamos que en otras condiciones abióticas pueda realizarse.

El efecto de la modulación de miR1514a.

De acuerdo a los resultados del Degradoma en frijol (Formey, et al. 2015), miR1514a regula post-transcripcionalmente la expresión de dos miembros de la familia de factores transcripcionales tipo NAC, sin embargo demostramos que sólo NAC 700 (Phvul010G120700) esta presente las muestras de raíces de plantas adultas.(Figura 10B).

Para explorar el efecto regulatorio que conlleva alterar los niveles de inducción de miR1514a, así como determinar los perfiles de frecuencia de los transcritos afectados por NAC 700, realizamos una secuenciación masiva de transcritos (RNA seq) en las raíces donde hemos modulado los niveles de miR1514a, de forma que nos permitiera explorar el efecto que ejerce miR1514a y NAC 700 en frijol a nivel molecular, puesto que no contamos con un fenotipo evidente en frijol en las condiciones estudiadas.

Inicialmente, determinamos los patrones obtenidos para los genes de referencia utilizados previamente en los ensayos de RT-qPCR Phvul.004G075100 (eIF1a) y Phvul.011G053400 (SKP 16), que no mostraron cambios significativos (Figura 18).

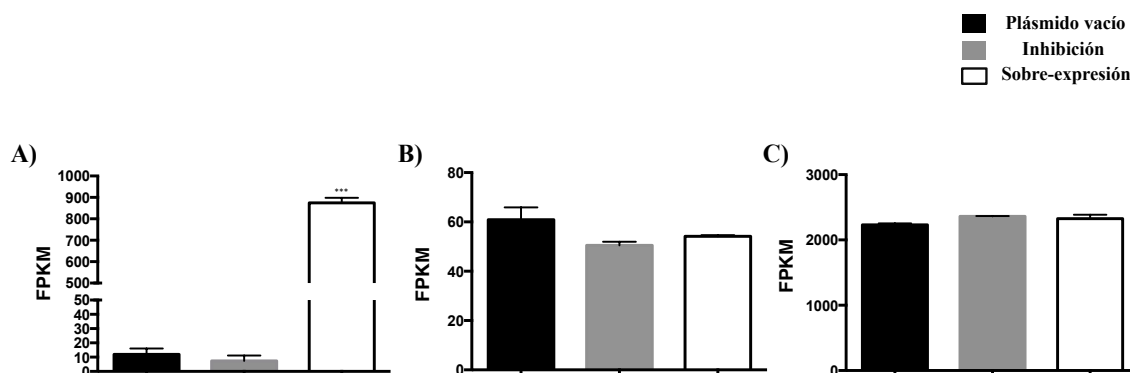


Figura 18. Número de lecturas del pre-miR1514a y de los genes utilizados como control durante la secuenciación masiva de ARN realizada en *hairy roots* en frijol. A) Número de lecturas de pre-miR1514a, B) Número de lecturas del gene Phvul.004G075100 (eIF1a) y gene Phvul.011G053400 (SKP16). Los Asteriscos señalan la diferencia significativa que existe entre las construcciones problema y su control (plásmido vacío). Fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM, por sus siglas en inglés, Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Tukie's de comparación múltiple (*P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001), las barras de error señalan el error estándar, n = 2.**

Por otro lado, obtuvimos el número de lecturas de NAC 700 en las raíces donde modulamos la actividad de miR1514a, así como de otros transcritos similares a NAC 700 (Figura 19A), adicionalmente como control incluimos el número de lecturas de otros miembros de la familia de factores transcripcionales NAC que no tienen similitud con el transcrito NAC 700 y los cuales que no son afectados por los niveles de acumulación de miR1514a (Figura 19B).

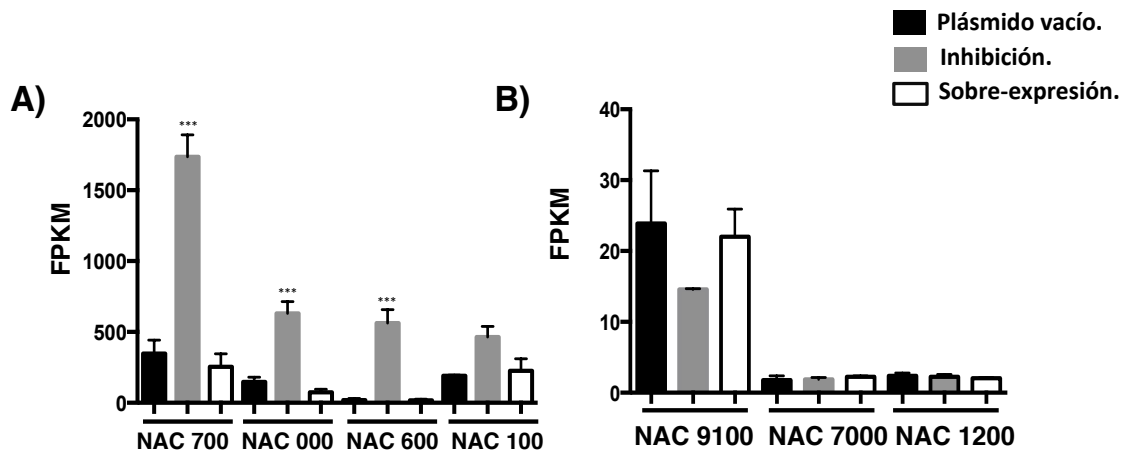


Figura 19. La modulación de miR1514a influyen directamente en lo niveles del transcrito NAC 700, así como en otros transcritos con alto grado de similitud. A) Los niveles de acumulación de transcritos similares a NAC 700 son afectados por la modulación de miR1514a en raíces *hairy roots*, B) en contraste, los niveles de transcritos no similares a NAC 700 no son alterados. Fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM, por sus siglas en inglés, Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped). Los resultados fueron evaluados mediante la prueba de Tuke's de comparación múltiple. (*P < 0.005, **P < 0.01 y ***P < 0.001), las barras de error señalan el error estándar, n=2.

La figura anterior muestra que no sólo el transcrito de NAC 700 es modulado por miR1514a, sino que otros ARNm cercanos a NAC 700 disminuyen su acumulación, pudiendo deberse directamente a la regulación de los niveles de miR1514a (Figura 19A). En contraste, para otros transcritos pertenecientes a la familia NAC, sus niveles de expresión no son alterados por miR1514a (Figura 19B), concluyendo que la regulación de miR1514a es exclusivamente sobre los transcritos que son similares a NAC 700.

Por otro lado, buscamos los transcritos diana de los phasiRNAs generados por NAC 700 (Tabla 4), es decir, buscamos evidencia de su funcionalidad en el transcriptoma de raíces transgénicas de frijol, sin embargo, los resultados de la secuenciación masiva de transcritos no encontramos cambios en relación al números de lecturas sus ARNm blanco con respecto al plásmido vacío poniendo en duda si son funcionales o no, además esto indica que al menos en estas condiciones no parece existir una regulación sobre estos transcritos por parte de los phasiRNAs derivados del transcrito de NAC 700 (Figura 20).

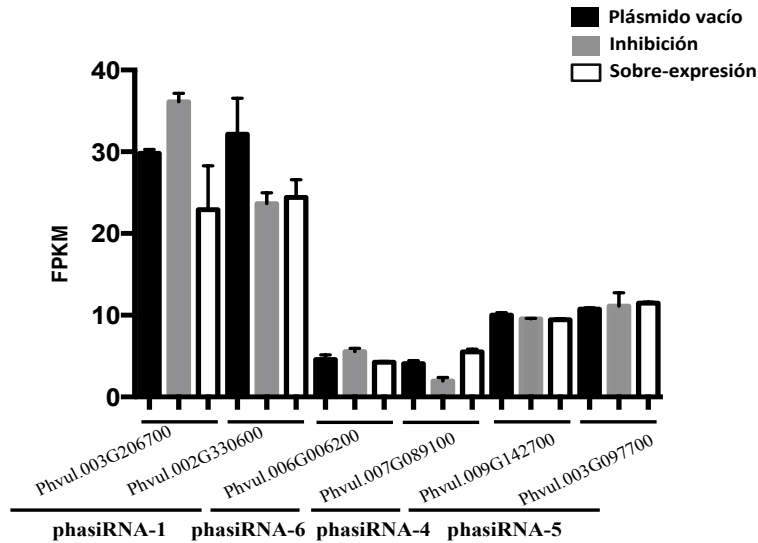


Figura 20. Los blancos predichos de los phasiRNAs provenientes de NAC 700 no están modulados en los datos de transcriptoma de *hairy roots* con actividad alterada de miR1514a. La expresión de sus niveles en la construcción control (plásmido vacío) se muestra en color negro, las barras grises muestran la inhibición de miR1514a y las barras sobre-expresoras se muestran en blanco. Fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM, por sus siglas en inglés, Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped). Los resultados fueron evaluados mediante la prueba de Tuke's de comparación múltiple. (* $P < 0.005$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$), las barras de error señalan el error estándar, $n=2$.

Consecuentemente, clasificamos a los transcritos de las construcciones alteradas en los niveles de miR1514a, donde encontramos que pocos fueron los genes diferencialmente expresados en la construcción sobre-expresora de miR1514a provenientes de las *hairy roots*, teniendo como resultado sólo 10 genes con mayor acumulación y 16 genes los cuales disminuyeron su expresión (P -value= 0.05, Anexo 2), por lo que no logramos otórgales una categoría de Ontología de Genes (GO por sus siglas en inglés), por lo que no se utilizaron en análisis posteriores. En contraste, en el transcriptoma de la inhibición de miR1514a obtuvimos 60 genes sobre-acumulados y 128 genes reprimidos, por lo que permitió clasificarlos en una categoría de GO (P -value = 0.05, (ver anexo 3 y 4) (Figura 21). Por consiguiente, en los siguientes análisis abordaremos solo los genes obtenidos en las raíces inhibitorias de miR1514a.

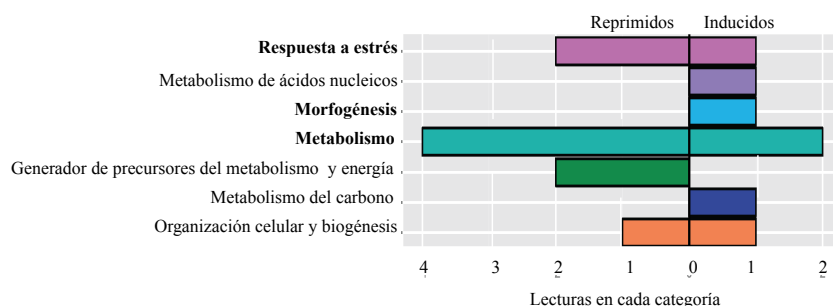


Figura 21. Categorías de ontología de genes (en inglés Gene Ontology- GO) en la inhibición de mir1514a. Los números muestran la cantidad de términos que se encuentran en dicho grupo de la categoría –Procesos biológicos-, se resaltan en negritas las categorías mas representativas.

En primer lugar, en la categoría -Procesos Biológicos- los transcritos de los genes inducidos se distribuyen en general en tres términos: metabolismo, biogénesis y morfogénesis, entre los cuales destacan dos homólogos de HSP-70 y un homólogo de *SHAVEN-3* (SHV-3), este último involucrado en el metabolismo de glicerol e importante para la elongación de la raíz (Hayashi *et al.* 2008). En el caso de los genes reprimidos, resaltan genes relacionados con el metabolismo y respuesta a estrés, en los que se incluyen cuatro diferentes peroxidasas y un homólogo de la familia de receptores de ABA llamado PYR-1 (Kline *et al.* 2010). Por otra parte, en la categoría de -Función molecular-, observamos un incremento de genes relacionados con metabolismo de RNA encontrando dos homólogos de DCL, dos homólogos de RDR y un homólogo de HEN-1.

De acuerdo a este análisis y para un significado biológico, evaluamos por RT-qPCR veinte transcritos seleccionados al azar correspondientes a la inhibición de miR1514a (once inducidos y nueve reprimidos con respecto al control), de los cuales cuatro transcritos probados mostraron un patrón similar al observado en el análisis de secuenciación masiva de transcritos, es decir, dos transcritos que aumentan y dos que disminuyen su expresión con respecto al control respectivamente. Con respecto a los 16 transcritos restantes tuvimos problemas metodológicos al detectarlos por RT-qPCR, por lo que no fueron considerados en estudios posteriores (Figura 22).

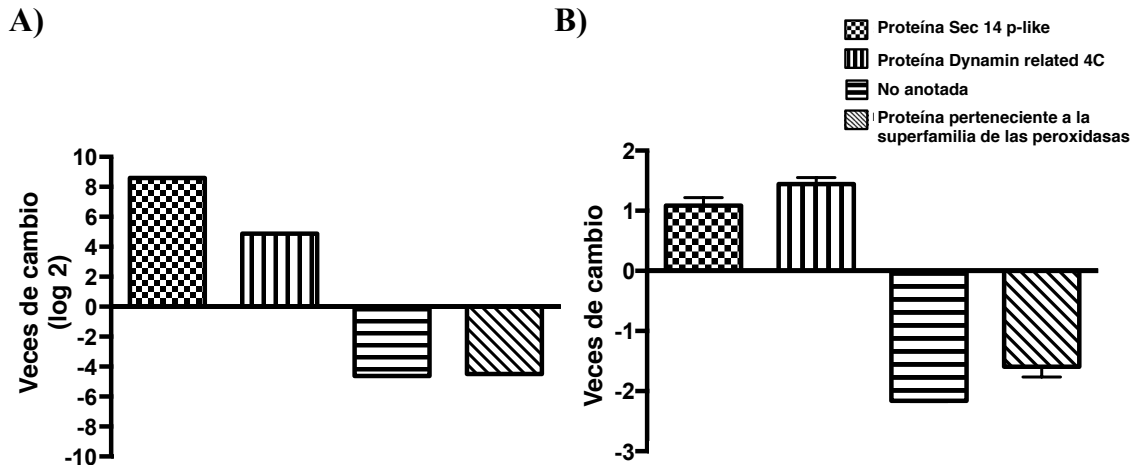


Figura 22. Comparación entre los resultados obtenidos de la secuenciación masiva de ARN y lo obtenido por RT-qPCR de algunos genes con cambio significativo en su expresión. En A) se muestra la gráfica obtenida por las lecturas dadas en la biblioteca de inhibición así como las veces de cambio en logaritmo base dos, B) se grafica las veces de cambio experimentales obtenidas por RT-qPCR.

En otro tema, dado que en condiciones de déficit hídrico donde determinamos que miR1514a se acumula en raíces de frijol (figura 7C), hipotetizamos que las *hairy roots* donde modulamos la expresión de miR1514a podrían reflejar lo que sucede en raíces durante déficit hídrico, por lo que evaluamos la acumulación de los cuatro transcritos obtenidos en *hairy roots* en raíces adultas de PS en condiciones de falta de agua (Figura 23A).

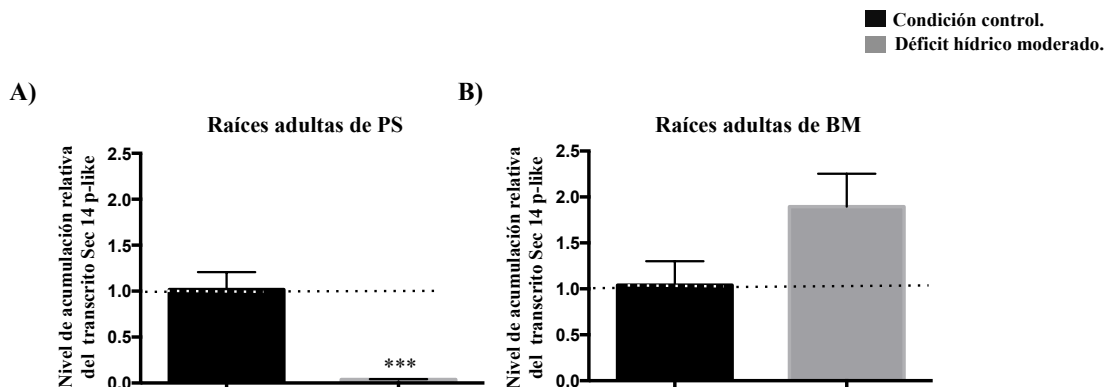


Figura 23. La acumulación del ARNm de Sec 14p-like (Phvul.006G137200) se reduce en raíces de PS pero no de raíces de BM sometidas a déficit hídrico. Las muestras fueron colectadas después del tratamiento de falta de agua severa. La expresión del ARNm

de Sec 14p-like se determinada por RT-qPCR y normalizada con los niveles de ARNm de Skp 16. Las líneas punteadas representan los niveles control de SKP16 en cada tiempo de tratamiento. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Student's t-test (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, las barras de error señalan el error estándar, n = 3.

De los cuatro transcritos analizados en las *hairy roots* sólo el transcrito del gen Sec 14p-like (Phvul.006G137200.1) presentó un comportamiento acorde a los niveles de miR1514. (Figura 23), en contraste, el comportamiento contrario se presenta en BM para el transcrito Sec 14p-like (Figura 23B); este resultado es de suma importancia ya que podría sugerir lo que sucede en variedades contrastantes a la sequía, pues recordemos que PS es una variedad de frijol resistente a la sequía, mientras que BM es considerada susceptible (Acosta-Gallegos, et al. 1999). Lo anterior concuerda con nuestros resultados mostrando que en la variedad PS existe un incremento de miR1514a (Figura 7C), una disminución de NAC 700 (Figura 11A) así como una aumento diferencial de phasiRNAs (Figura 13). Brevemente, las proteínas de la familia Sec 14p-like fueron inicialmente identificadas como parte del sistema de transporte de vesículas en levadura (Bankaitis *et al.* 1990, Bankaitis *et al.* 1989), en soya se ha encontrado que proteínas homólogas a Sec 14 p-like, las cuales se fosforilan ante estrés hiperosmótico (Monks *et al.* 2001).

El resultado anterior sugiere que entre variedades es posible identificar cambios de regulación génica mediados por miR1514a a través de NAC 700, es decir, podríamos identificar aquellos transcritos regulados directamente por NAC 700 en frijol. Por consiguiente, el módulo miR1514a/NAC 700/phasiRNAs es efecto directo de la expresión génica ligada a los cultivares con más y/o menos tolerancia a la sequía, en este caso PS y BM respectivamente. Sin embargo, es necesario analizar un número mayor de transcritos que muestren una expresión diferencial en las *hairy roots* con niveles alterados de miR1514a. Este descubrimiento quedo reportado a principios de este año en Sosa-Valencia y colaboradores (Sosa-Valencia, et al. 2017b).

El análisis de motivos de ADN en la región 1 kb arriba del sitio de inicio de la transcripción en los transcriptomas con expresión alterada de miR1514a.

A partir de los resultados obtenidos en los transcriptomas durante la modulación de miR1514a en *hairy roots* de frijol, identificamos un probable sitio consenso en una longitud de 1 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes con mayor valor de cambio, dicho sitio representaría un modulador de los transcritos presentes cuando regulamos la actividad de miR1514a, por lo que la secuencia encontrada puede corresponder al lugar de unión de NAC 700 o algún otro FT NAC relacionado. Para este análisis empleamos la herramienta MEME, la cual está disponible en línea (Bailey *et al.* 2009) (Figura 24).

En primer lugar, en los 25 genes más sobre-representados en el transcriptoma con la inhibición de miR1514a, obtuvimos un motivo de 14 nt [GA]AG[AT][GT][AG][AG][GAT]GA[GA]A[GA][GA] con un valor de E-value= 2.6e-011 (Figura 24A). En contraste, para los 25 genes que muestran una disminución en dicha construcción, mostraron una secuencia consenso de 15 nt [AG][TA]G[AT][ATG][GA]TG[GA][AT][GA][GA][AG][AG][GA] con una menor significancia que el resultado anterior (E-value= 5.1e-006, 25/25 genes) (Figura 24B). Como control en nuestro análisis, consideramos un tamaño de 1 kb de 25 genes seleccionados al azar en genoma de frijol, encontrando un motivo de 15 nt con baja significancia G[GT]GC[AGT]C[CGT]TG[GTA][TC]C[AT]C[CT] (E-value= 5.0e-002, para 8/25 genes) (Figura 24C).

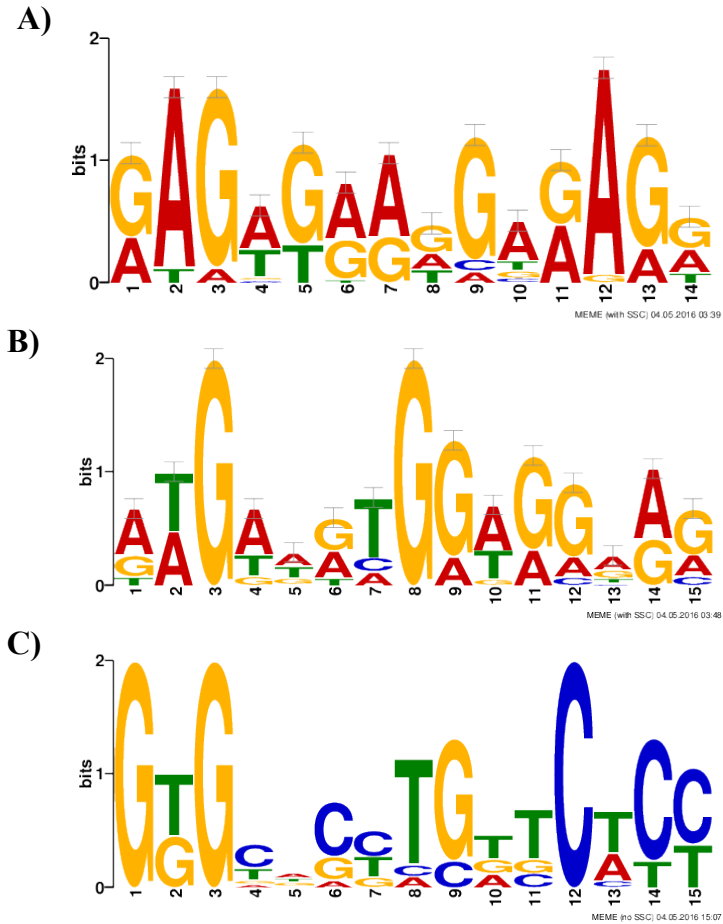


Figura 24. Motivos compartidos en los promotores de los genes con expresión diferencial obtenida por la secuenciación masiva de ARN en *hairy roots*. Utilizando la herramienta MEME se obtuvieron los motivos compartidos con mayor relevancia en: A) Los 25 genes inducidos con mayor tasa de cambio en la construcción de inhibición de miR1514a (STTM-miR1514a) (E-value= 2.6e-011, de 25/25 genes), B) Los 25 genes reprimidos con mayor represión en la construcción de inhibición de miR1514a (STTM-miR1514a) (E-value= 5.1e-006, de 25/25 genes) y C) 25 genes seleccionados al azar en el genoma de frijol.

De estos análisis concluimos que los genes modulados por miR1514a comparten una secuencia consenso en la región 1 Kb río arriba del inicio de la transcripción y que su regulación podría estar dada por un factor común, como sería el caso de NAC 700 o algún otro tipo de factor transcripcional relacionado, por lo que proponemos que NAC 700 actúa sobre estos genes como un regulador de la transcripción mediante la unión secuencias ricas en G/A, sin embargo dada la alta complejidad de la secuencia determinada no fuimos

concluyentes en este punto, por lo que seguir su estudio es relevante ya que representaría una nueva secuencia de unión para la familia de FT NAC en condiciones de déficit hídrico.

DISCUSIÓN.

En comparación con *A. thaliana* y otras leguminosas, poco se conoce acerca de los mecanismos post-transcripcionales mediados por ARN pequeños durante el déficit hídrico en frijol, con especial atención a los microRNAs y phasiRNAs, esto pese a la gran relevancia de especies con valor comercial. En este estudio, nos enfocamos en caracterizar la actividad de miR1514a en frijol en tratamientos de déficit hídrico.

El miR1514a en frijol presenta una expresión diferencial durante el déficit hídrico.

Nuestro conocimiento sobre el silenciamiento post-transcripcional mediado por microRNAs en *P. vulgaris* sobre todo en condiciones de déficit hídrico es muy pobre. En un primer acercamiento, en el 2009 Arenas-Huertero y colaboradores clonaron dieciséis microRNAs conservados y seis microRNAs no conservados en frijol, en este último grupo encontramos a miR1514a mostró una inducción en sus niveles de expresión en plántulas de frijol variedad Pinto villa sometidas a condiciones de baja disponibilidad de agua (Arenas-Huertero, et al. 2009).

A partir de este antecedente analizamos los patrones de acumulación de miR1514a utilizando dos cultivares de frijol con distinta tolerancia a la sequía en condiciones de campo: PS como variedad resistente y BM considerándola sensible a dicha condición (Acosta-Gallegos, et al. 1999). Nuestros resultados mostraron que en los tratamientos de déficit hídrico miR1514a se acumula en raíces de PS, mientras que en BM no (Figura 6A y B, figura 7C y D), en contraste miR1514a no se induce en otros tejidos de la planta como en hojas ó hipocótilos en las dos variedades de frijol (Figura 6C y D, figura A y B7), demostrando que sólo en raíces de PS miR1514a presenta una pauta de modulación que contrasta con los resultados obtenidos para BM.

El patrón de expresión de miR1514a en condiciones de baja disponibilidad de agua en PS concuerda con lo obtenido en plántulas del cultivar resistente a sequía Pinto villa (Arenas-Huertero, et al. 2009); basados en nuestros resultados podemos decir que en raíces adultas miR1514a puede tener una participación importante sólo para el cultivar PS y no para BM,

por lo que enfocamos nuestro estudio a la variedad PS. En un futuro será interesante explorar si la respuesta a déficit hídrico por miR1514a está presente en otras variedades de frijol, de forma que sea considerado un marcador de selección.

El miR1514a modula post-transcripcionalmente a NAC 700.

Una vez que determinamos los patrones de acumulación de miR1514a en *P. vulgaris*, lo siguiente fue conocer al transcrito que regula post-transcripcionalmente miR1514a. En el 2015 se reportó el Degradoma de frijol con el fin de identificar los microRNAs, phasiRNAs y transcrito(s) diana que son modulados por microRNAs, en dicho estudio se demuestra que miR1514a regula a dos factores transcripcionales pertenecientes a la familia NAC, estos son Phvul.010G120700.1 (NAC 700) y Phvul.010G121000.1 (NAC 000) (Formey, et al. 2015).

Basados en datos del Degradoma de frijol centramos nuestros esfuerzos a Phvul.010G120700.1 (NAC 700), dado que sus niveles de acumulación disminuyen en raíces de frijol cuando se presenta una acumulación de miR1514a, en contraste Phvul.010G121000.1 (NAC 000) no se detectó en las condiciones probadas. El módulo de regulación post-transcripcional miR1514a/NAC 700 genera una correlación en sus patrones de inducción/disminución (Figura 7C y 11A), y además este hecho fue observado en las *hairy roots* sobre-expresoras y/o inhibitoras de miR1514a donde se mostró la existencia de una relación inversa entre los niveles de acumulación de miR1514a y de NAC 700. Sin embargo, no descartamos que en otras condiciones de crecimiento y/o desarrollo en frijol NAC 000 ú otro factor transcripcional relacionado a NAC 700 pudiera estar presente y siendo regulado por miR1514a .

Reportes previos han descrito que algunos miembros de la familia de factores transcripcionales NAC están involucrados en el desarrollo y crecimiento de meristemas en diferentes órganos de la planta, además de estar presentes en rutas de respuesta a condiciones abióticas (sequía, frío, calor y altas concentraciones de salinidad) y bióticas (virus y hongos parásitos), así como al efecto de las fitohormonas ABA y JA, lo que nos

habla de la importancia de dicha familia (Hegedus *et al.* 2003, Kim *et al.* 2007, Lee and Park 2012, Olsen, *et al.* 2005, Tran, *et al.* 2004, Xu, *et al.* 2013, Zhang and Gan 2012).

En la especie modelo *A. thaliana*, el transcrito homólogo más cercano a NAC 700 en frijol se induce bajo estrés abiótico generado por calor, frío y sequía (Kim, *et al.* 2007). Por otra parte en lo que respecta a leguminosas, se ha reportado por análisis de tipo PARE que un homólogo de NAC 700 en *G. max* es modulado directamente por miR1514a (Arikiti, *et al.* 2014). Estos datos indican que NAC 700 podría cumplir funciones similares a las ya descritas respecto a la familia NAC y en el caso específico de frijol sus patrones de acumulación son finamente modulados por miR1514a.

En plantas, es común que los microRNAs regulen a factores transcripcionales (Jones-Rhoades, *et al.* 2006), por lo que los microRNAs pueden ejercer gran impacto en las redes de regulación de la planta, aunado a esto se ha descrito que los microRNAs pueden darse una comunicación entre célula y célula (Megraw, *et al.* 2016) o inclusive trasladarse vía floema (Buhtz, *et al.* 2008, Lin, *et al.* 2008, Pant, *et al.* 2008), de forma que puedan ejercer su función en un sitio diferente a su síntesis y por consiguiente expandir su efecto PTGS, por consiguiente una de las maneras de amplificación post-transcripcional es mediante la generación de phasiRNAs generados a partir del sitio de corte entre un microRNA y su transcrito diana.

NAC 700 es generador de phasiRNAs

El mundo biológico es muy complejo y tan diverso que aún lo seguimos entendiendo y un caso particular de regulación post-transcripcional mediada por microRNAs en plantas es la producción de ARNs pequeños producidos en fase de 21 nt a partir del sitio de corte de un microRNA con su transcrito blanco. Estos ARN pequeños en fase pueden funcionar en *trans* tomando el nombre de tasiARNs (Axtell, *et al.* 2006), en contraste aquellos para los cuales no se ha descrito función alguna se les conoce como phasiRNAs (Zhai, *et al.* 2011).

Los tasiRNAs han sido ampliamente estudiados y caracterizados en *A. thaliana*. Se ha descrito que miR173 modula los niveles de *TAS-1a/b/c* y del transcrito de *TAS 2*, mientras que miR390 regula al transcrito de *TAS-3* y miR828 a *TAS-4*, siendo el ejemplo mejor caracterizado el módulo de regulación miR390/TAS3/ARF (Axtell, et al. 2006, Fei, et al. 2013). Actualmente, las técnicas nuevas de secuenciación masiva han permitido la identificación de *loci* tipo *PHAS* en diferentes organismos, permitiendo incrementar el número de phasiRNAs no sólo en *A. thaliana* si no en otras especies como *Physcomitrella patens* y *P. domestica* e inclusive en tejidos de leguminosas (como en *M. truncatula*, *G. max*, *Arachis hypogaea*, *G. Max* y *P. vulgaris*). Aún queda mucho por descubrir pues en el caso de especies comerciales como arroz y maíz pues poco se ha descrito sobre el tema (Arikiti, et al. 2014, Johnson *et al.* 2009, Song *et al.* 2012). TasiRNAs y phasiRNAs representan un mecanismo post-transcripcional de silenciamiento en vías de ser descubierto y reportado en un mayor número de especies, esto de acuerdo a la base de datos Web of science (<http://apps.webofknowledge.com>) donde en el periodo comprendido entre los años del 2012 al 2015 existió un incremento de 55.90% en publicaciones en este campo y se prevé que siga en aumento

En este sentido, en este trabajo demostramos que la baja acumulación de NAC 700 esta correlacionada con los altos niveles de miR1514a tanto en raíces adultas de frijol en condiciones de falta de agua como en las *hairy roots* (Figuras 6, 7 y 15), además comprobamos que NAC 700 produce phasiRNAs a partir del sitio de corte entre miR1514a y NAC 700 (Figura 12 y 13), por lo que descubrimos un nuevo mecanismo de acción post-transcripcional en frijol quedando a discusión la función que cumplen en la planta.

Para seguir el estudio de los phasiRNAs derivados de NAC 700 realizamos pruebas de inmunoprecipitación de AGO-1 con el objetivo de conocer si están asociados a dicha proteína lo que podría indicarnos si son funcionales. Este tipo de ensayos han demostrado en *A. thaliana* que la unión de cierto ARN pequeño esta correlacionado con cada miembro AGO, señalando que AGO-1, AGO-2 y AGO-5 preferencialmente se unen con una alta afinidad a ARN pequeños que poseen una U (Uracilo), A (Adenina) y C (Citosina) en su extremo 5', respectivamente (Mi, et al. 2008).

Determinamos que phasiRNA-1 se asocia a la proteína efectora AGO-1 en condiciones de déficit hídrico en raíces adultas de frijol lo que sugiere que es funcional. PhasiRNA-1 posee una G en el extremo 5', lo que contrasta a la preferencia por AGO-1 de unirse a U en el extremo 5' esto en *A. thaliana*. Sin embargo, dicha particularidad concuerda con lo reportado para miR172 que contiene una G en el extremo 5' y es reclutado por AGO-1 (Ji *et al.* 2011, Mi, *et al.* 2008). Más aún, la incorporación de un microRNA a alguna de las 10 proteínas AGO en *A. thaliana* no sólo está basada en la identidad del nucleótido en el extremo 5', además hay que considerar los niveles de acumulación tejido-específico de las proteínas AGO, pudiendo generarse una competencia entre éstas en el proceso de ensamblaje de RISC (Rogers and Chen 2013).

En contraste al resultado de la inmunoprecipitación, en los datos de la secuenciación masiva de transcritos en las *hairy roots*, hipotetizamos que cuando inhibimos la actividad de miR1514a provocando un aumento de NAC 700 y por lo tanto generando menos phasiRNAs, entonces deberíamos encontrar mayor abundancia de los transcritos predichos como regulados por los phasiRNAs, con la condicional si estos regularan a otros transcritos. Sin embargo, no observamos cambios en sus blancos predichos, sugiriendo que no tienen funcionalidad en modular *en trans* a otros transcritos (Figura 20). No obstante, detectamos un aumento en el número de lecturas de transcritos similares de NAC 700 (NAC 000, NAC 100 y NAC 600), por lo que tal vez sean regulados por miR1514a o por los phasiRNA producidos por NAC 700 (Figura 19A) pues otros miembros de NAC no cambian sus niveles (NAC 1200, NAC 7000 y NAC 9100)(Figura 19B), llevándonos a sugerir que los phasiRNAs derivados de NAC 700 pueden estar involucrados en la regulación de los transcritos de los que son originados.

Con todas las evidencias experimentales mostradas, proponemos que la participación de miR1514a en frijol reduce los niveles del transcrito de NAC 700 generando la producción phasiRNAs para posiblemente amplificar la respuesta post-transcripcional al estrés. En la siguiente figura resumimos: (A) Durante condiciones normales de crecimiento, la planta presenta una acumulación basal de miR1514a, así como una tasa de transcripción normal de

NAC 700 el cual puede estar involucrado en procesos del metabolismo y desarrollo, (B) mientras que en condiciones de estrés por falta de agua, la acumulación de miR1514a aumenta, lo que conlleva a la degradación del transcrito de NAC 700. Adicionalmente, durante este estudio detectamos que no sólo disminuyen los niveles de NAC 700 si no que también se producen phasiRNAs a partir del sitio de empalme entre miR1514a y NAC 700 (Figura 24).

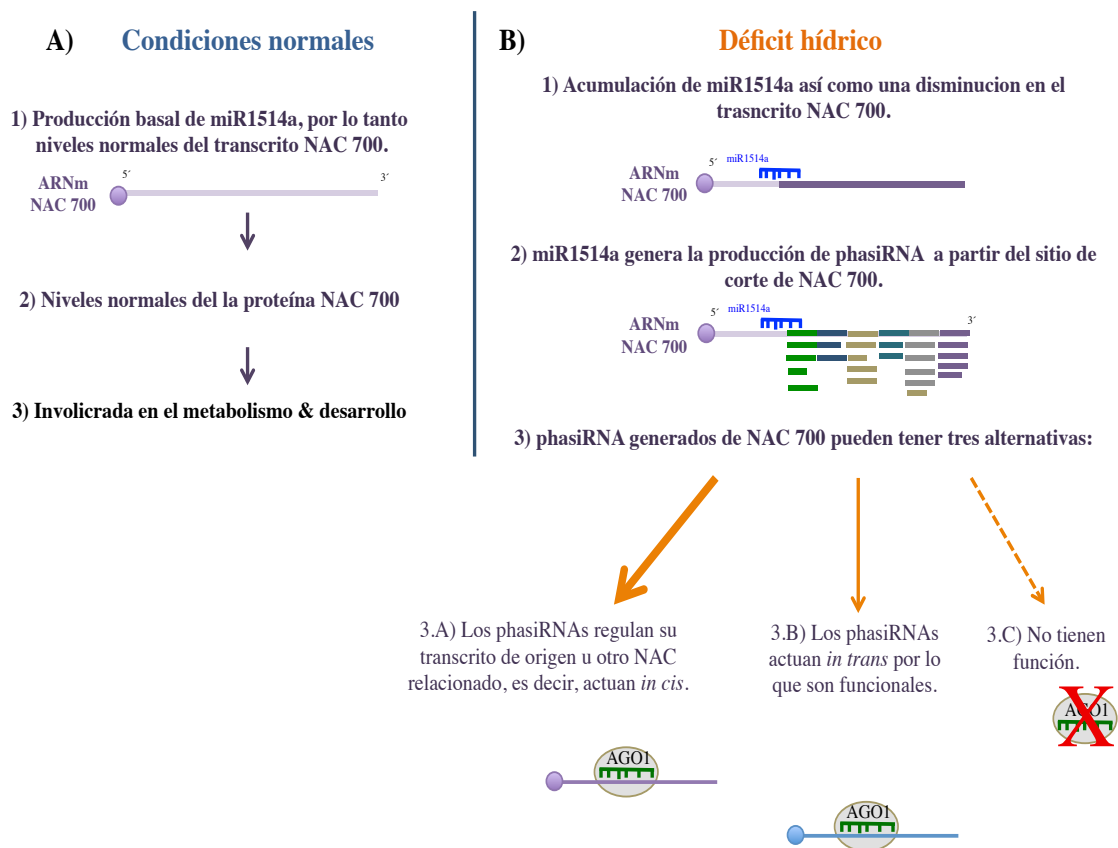


Figura 24. Modo de acción propuesto de miR1514a durante el déficit hídrico en frijol.

En A) se muestra que en condiciones normales existe: 1) una producción basal de miR1514a por lo tanto niveles normales del transcrito NAC 700, 2) lo que genera niveles normales de la proteína NAC 700, 3) que pueden estar involucrados en el metabolismo & desarrollo, mientras que B) durante el déficit hídrico en la variedad PS 1) existe una acumulación de miR1514a así como una disminución en el transcrito NAC 700, 2) provocando que miR1514a genere la producción de phasiRNAs a partir del sitio de corte de NAC 700 3) y además estos phasiRNAs generados de NAC 700 pueden tener tres alternativas: 3.A) Los phasiRNAs regulan su transcrito de origen u otro NAC relacionado, es decir, actúan *in cis*, 3.B) Los phasiRNAs actúan *in trans* sobre otros transcritos y 3.C) los phasiRNAs no tienen función (Sosa-Valencia, et al. 2017a).

Los phasiRNAs producidos a partir del ARNm de NAC 700 por miR1514a podrían tener tres alternativas de participación los cuales describimos en el modelo en la figura 24 incisos 3.A, 3.B y 3.C: 3.A) pueden actuar en *cis*, es decir, los phasiRNAs generados de NAC 700 modulan su propio transcrito ú otro NAC relacionado, 3.B) funcionar en *trans*, en otras palabras que los phasiRNAs generados de NAC 700 modulan un ARNm diferente a su origen, es decir actúan como tasiRNAs ó 3.C) no ser funcionales, y que simplemente sean el resultado de que miR1514a es un microRNA de 22 nt de longitud y lleve a su transcrito blanco por esta vía de degradación.

El mecanismo de acción post-transcripcional de miR1514a que proponemos en frijol es parecido hasta cierto punto con la manera funcional de miR390 en *A. thaliana*, donde este último microRNA modula los niveles de *TAS-3* desencadenando la producción de tasiRNAs, sin embargo sólo dos tasi-ARNs regulan a los transcritos ARF2, ARF3/ETT y ARF4 involucrados en la vía de señalización de la fitohormona Auxina (Axtell, et al. 2006, Fei, et al. 2013). En nuestro estudio, durante condiciones de déficit hídrico miR1514a genera phasiRNAs a partir de su sitio de corte en el ARNm de NAC 700 y aunque no tenemos evidencia directa de su funcionalidad PTGS, sin embargo sabemos que se asocia con la proteína AGO-1 y la secuencia de phasiRNA-1 está presente en otros transcritos NAC de frijol, así como de otras leguminosas.

Resumiendo, ambos mecanismos necesitan ser iniciados por un microRNA el cual genera phasiRNAs, pudiendo funcionar tanto en *cis* (phasiRNAs de miR1514a) como en *trans* (tasiRNAs de miR390 y phasiRNAs de miR1514a), por lo que resulta novedoso para la familia Fabaceae dada la conservación de miR1514a y phasiRNA-1 (Figura 14), sugiriendo la contribución funcional de los phasiRNAs en la familia de las leguminosas, además de sentar las bases para un estudio más amplio de miR1514a en otros miembros de la familia. En este sentido, recientemente demostramos que miR1514a está presente en *M. truncatula* (otro miembro de las leguminosas) y se induce en condiciones de falta de agua, además de predecir generación de phasiRNAs a partir de su sitio de corte con un homólogo de NAC 700 (Sosa-Valencia, et al. 2017b).

Transcritos potencialmente regulados por NAC 700.

Para la evaluación de las consecuencias moleculares de la actividad de miR1514a, diseñamos un análisis transcriptómico donde regulamos la acumulación de miR1514a a partir de *hairy roots* en frijol. En la inhibición de miR1514a obtuvimos 60 genes sobre-accumulados y 128 genes reprimidos (P-value=0.05), obteniendo términos de GO enriquecidos indicándonos la identidad de los genes involucrados en metabolismo, biogénesis, morfogénesis y de respuesta a estrés sugiriendo que miR1514a esta involucrado en regular dichos procesos (Figura 20). Para enriquecer estos resultados proponemos se realice la inhibición de miR1514a en otra leguminosa donde podamos realizar la transformación completa de la planta dada la conservación del módulo miR1514a/NAC 700.

Por otra parte, en los 25 genes más sobre-representados en la inhibición de miR1514a realizamos análisis tipo MEME, tomando en cuenta una longitud de 1 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción con el fin de predecir un sitio de unión de factores transcripcionales, potencialmente NAC 700 (Hernandez-Garcia and Finer 2014) (Figura 24). El motivo encontrado difiere a lo reportado para la familia de factores transcripcionales tipo NAC pues estos son ricos en G/A además de ser de longitud entre 8 a 13 nt (Olsen, et al. 2005), por lo que deben realizarse enfoques experimentales para definir una secuencia consenso entre los genes que modula NAC en frijol dada la baja complejidad del motivo encontrado en nuestros análisis, por ejemplo la utilización del análisis de movilidad electroforética (del inglés Electrophoretic mobility shift assay-EMSA) (Hellman and Fried 2007) ó técnicas de secuenciación masiva como la prueba de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (del inglés systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX-seq) (Badis *et al.* 2009, Jolma *et al.* 2013). Otra alternativa es el uso de un microarreglo de unión de proteína (del inglés protein-binding microarray-PBM), los cuales son utilizados en el análisis de complejos de proteínas con ácidos nucleicos para determinar si en estos genes existe un motivo de unión a NAC (Franco-Zorrilla *et al.* 2009).

Por otra parte, los transcritos obtenidos durante la inhibición y sobre-expresión de miR1514a pueden utilizarse para inferir lo que sucede en raíces adultas sometidas al déficit hídrico, dado que en raíces de las variedades PS y BM detectamos una acumulación diferencial del transcrito del gen Sec 14p-like (Phvul.006G137200) (Figura 24). Por este dato sugerimos que es posible identificar cambios en la regulación génica mediados por aquellos transcritos que son regulados directa o indirectamente por miR1514a mediante NAC 700 en raíces de plantas durante la cinética de déficit hídrico, sin embargo este resultado debe tomarse con cautela y analizar un número mayor de transcritos que muestren una expresión diferencial en las *hairy roots* con niveles alterados de miR1514a, aunado a esto el detectar transcritos modulados por miR1514a/NAC 700/phasRNAs podría ser el efecto directo de la expresión génica ligada a los cultivares con más y/o menos tolerancia a la sequía, en este caso PS y BM. (Sosa-Valencia, et al. 2017b).

Finalmente, con la publicación del genoma de frijol (Schmutz, et al. 2014, Vlasova, et al. 2016), prevemos que los estudios sobre PTGS mediado por microRNAs, phasiRNAs y tasiRNAs en frijol se incrementarán en los próximos años, de forma que nos permita tener un conocimiento más completo al respecto. Debido a la relevancia de los microRNAs y phasiRNAs en *P. vulgaris* como reguladores de la expresión génica, en un futuro podrían ser utilizados como marcadores de estrés abiótico a nivel post-transcripcional.

CONCLUSIONES.

Con respecto a miR1514a:

- o miR1514a se acumula significativamente en raíces de plantas adultas, así como de plántulas sólo en el cultivar PS durante condiciones de déficit hídrico, por lo que es importante en este tejido y en esta variedad.
- o miR1514a no se acumula significativamente en otras condiciones de que inducen al déficit hídrico (NaCl, estrés oxidativo y ABA).
- o miR1514a modula los niveles de Phvul.010G120700 (NAC 700) y Phvul.010G121000.1 (NAC 000) en plántulas de frijol, mientras que en raíces adultas de frijol NAC 700 es el único transcrito presente y por lo tanto regulado post-traduccionamente por miR1514a.
- o En el tejido de raíces adultas sometidas a condiciones de déficit hídrico, miR1514a modula post-transcripcionalmente a NAC 700 y además genera phasiRNAs a partir del sitio de corte en el transcrito de NAC 700.

Con respecto a phasiRNA 1:

- o Determinamos que phasiRNA-1 puede ser funcional debido a su asociación con AGO-1 durante el déficit hídrico, así como su conservación en otras leguminosas, mientras los otros phasiRNAs provenientes de NAC 700 no presentan dichas características.
- o En las condiciones probadas, los phasiRNAs producidos por NAC 700 probablemente actúen en *cis*, dado que existe un aumento en la acumulación de otros transcritos homólogos a NAC 700 y no obtuvimos evidencia para los transcritos blanco predichos de los phasiRNAs.

Con respecto a la función de NAC:

- o La inhibición de miR1514a, y por lo tanto una acumulación de, transcrito NAC 700, presenta cambios significativos en transcritos de genes involucrados en el metabolismo, biogénesis, de morfogénesis y genes de respuesta a estrés.
- o En los promotores de los genes modulados en la inhibición de miR1514 no encontramos un motivo significativo de unión a NAC.

PERSPECTIVAS.

Sobre miR1514a:

- o Dado que se necesitan desarrollar marcadores moleculares para la generación y selección de variedades resistentes al estrés abiótico, es indispensable obtener los patrones de acumulación de miR1514a, phasiRNA-1 y NAC 700 en otras variedades de frijol con resistencia a la sequía, así como en otras condiciones de estrés abiótico para explorar mas a fondo la importancia del módulo miR1514a/NAC 700/phasiRNA-1 en la producción de dichas variedades mejoradas.
- o Considerando que en frijol no contamos con un método de transformación completa en el organismo, se plantea generar y someter raíces *hairy roots* sobre-expresoras y/o inhibitoras de miR1514a a distintos tratamientos que causen déficit hídrico, de forma que nos permita conocer el efecto más directo que tiene miR1514a en la raíz (por ejemplo a la sobrevivencia de la raíz ó un mayor crecimiento, etc).

Sobre phasiRNAs generados por NAC 700:

- o Determinar si phasiRNA-1 posee actividad de corte, además conocer el posible efecto que ejerce phasiRNA-1 en la planta.

Sobre NAC 700:

- o En vista que NAC 700 es regulado por miR1514a e importante durante el déficit hídrico en frijol, podríamos producir una versión modificada de NAC 700 eliminando el sitio de reconocimiento para miR1514a de manera que podamos conocer si es modulado por otros factores, lo que nos ayudaría a conocer sobre su modulación transcripcional.
- o Es necesario validar por q-PCR un mayor número de genes del RNA seq de las construcciones moduladoras de miR1514a.

Sobre el módulo miR1514a/NAC 700/phasiRNA-1:

- o Conocer la localización de miR1514a, de NAC 700, así como de los phasiRNAs derivados de NAC 700 en la raíz de frijol, para sugerir su función en regiones particulares de la raíz y correlacionarlo con un fenotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico y condiciones de crecimiento.

Utilizamos plantas adultas y plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. (Frijol) de dos cultivares mesoamericanos: Pinto Saltillo (PS) y Bayo Madero (BM), susceptible considerada como cultivar resistente y susceptible respectivamente a la sequía esto dado por su producción de semilla en dichas condiciones (Acosta-Gallegos, et al. 1999, Teran and Singh 2002).

Para el análisis de plantas adultas utilizamos el material biológico reportado por (Rosales, et al. 2012). Brevemente, las plantas fueron crecidas en condiciones de invernadero a una temperatura de 24 ± 4 °C, con una humedad relativa de $70 \pm 20\%$ durante ciclos de luz natural. 29 días después de la germinación, 252 plantas fueron separadas en tres grupos, a los cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos de limitación de agua: optima irrigación (capacidad de campo de $2.50 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1}$ sustrato), déficit hídrico moderado ($1.25 \text{ H}_2\text{O mL g}^{-1}$ sustrato) y déficit hídrico severo ($0.625 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1}$ sustrato)(Cuellar-Ortiz *et al.* 2008). Las hojas y las raíces fueron colectados a los 0, 13 y 22 días de tratamiento y guardados a -70 °C hasta su procesamiento.

En el caso de las plántulas, semillas de PS y BM fueron esterilizados utilizando alcohol puro así como una solución de Hipoclorito de sodio comercial y agua en una relación de 1:5. Las semillas se germinaron por 5 días a una temperatura de $26-28$ °C y una humedad relativa (HR) de 60% en la oscuridad. Las plántulas fueron trasplantadas a vermiculita y se regaron con la siguiente solución nutritiva: (CaCl_2 0.78 M, MgSO_4 0.486 M, Citrato férrico 0.02 M, KH_2PO_4 0.74 M pH 7.3, Na_2HPO_4 0.84 M pH 7.3, KCl 50 mM, H_3BO_3 25 mM, MnSO_4 5 mM, CuSO_4 0.5 mM, ZnSO_4 0.2 mM, Na_2MoO_4 1 mM). El tratamiento de déficit hídrico consistió en reducir los niveles de agua por irrigación, para ello utilizamos $0.425 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1}$ sustrato (1/4 cc ó sequía media) y $0.212 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1}$ sustrato (1/8 ó sequía severa). Para condiciones control, consideramos $1.7 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1}$ sustrato. Cosechamos los hipocótilos y las raíces de las plántulas a las 6, 12, 24 y 48 h después de aplicar el tratamiento y almacenados a -70 °C hasta su procesamiento. Estos experimentos fueron

realizados de manera independiente en tres ocasiones. Para los tratamientos con ABA (65 μ M), NaCl (100 y 200 mM) y el herbicida comercial Paraquat (10 y 100 μ M), agregamos estos reactivos en la solución nutritiva y cosechamos el hipocótilos y las raíces a las 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento.

Aislamiento de RNA y análisis tipo Northern blot.

ARN total fue obtenido mediante Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA.) siguiendo las indicaciones del fabricante utilizando 100 mg de tejido congelado. La calidad e integridad del ARN total obtenido fue verificada mediante Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los análisis tipo northern blot se realizaron de acuerdo a lo reportado por (Arenas-Huertero, et al. 2009). Los oligonucleótidos empleados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis, IBT-UNAM que corresponden a la secuencia anti-sentido de miR1514a y U6 snRNA (Anexo 21). Para normalizar los niveles de expresión de miR1514a se utilizó el valor de expresión de U6 snRNA, esto de acuerdo a lo reportado por (Contreras-Cubas, et al. 2012). El resultado de cada hibridación para RNAs pequeños es el promedio de tres réplicas independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba estadística de Tuke's de comparación múltiple (**p=0.001, *p=0.01, *p=0.05).

Análisis tipo Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

En la cuantificación de miR1514a y la acumulación de phasiRNAs por RT-qPCR, el ADNc se sintetizó a partir de 1 μ g de ARN total utilizando el paquete comercial NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) y/o el protocolo tallo-asa (stem-loop, por sus siglas en inglés) previamente reportado (Contreras-Cubas *et al.* 2013, Varkonyi-Gasic *et al.* 2007).

Además se empleó el equipo Step One real-time thermocycler (Applied Biosystems) y el reactivo comercial SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). Utilizamos un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 5 min, seguido de 95°C por 10 seg, 55°C por 20 seg. por 40 ciclos y finalmente un incremento de la temperatura cada 0.2 °C en un rango de 60°C a

95 °C. La expresión relativa de cada muestra fue normalizada empleando el método delta-delta C_t . El valor de C_t (por sus siglas en inglés threshold cycle- ciclo umbral) obtenido fue normalizado con el valor de C_t obtenido en la amplificación de U6 snRNA.

Para cuantificar los niveles de ARNm de los genes seleccionados, sintetizamos ADNc mediante el uso del paquete comercial RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). La calidad y cuantificación para su uso de RT-qPCR fue verificada según lo reportado (Contreras-Cubas et al., 2012). En las reacciones de qRT-PCR empleamos el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s.; 55 °C por 30 s, el paso de extensión fue realizado para cada ARNm a amplificar. El valor de C_t fue normalizado con el valor de C_t del transcrito SKYP 16 (Borges *et al.* 2012). El resultado de cada amplificación tanto para RNAs pequeños como para ARNm de es el resultado de tres réplicas independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba estadística de Tuke's de comparación múltiple (**p=0.001, *p=0.01, *p=0.05).

Immunoprecipitación de AGO-1.

En la inmunoprecipitación de AGO-1 utilizamos el anticuerpo policlonal contra AGO-1 (Genscript, Piscataway, NJ) que reconoce un péptido sintético (CFYMEPETS DSGSMA) de AGO-1 de frijol (Phvul.004G142900). La secuencia del péptido está localizada en el final del dominio PIWI ubicado en el extremo carboxilo terminal de la proteína, el cual no está presente en ninguna otra proteína en el genoma de *A.thaliana* ni de *P. vulgaris*. El anticuerpo reconoce una proteína que tiene un tamaño de 120 kDa en los ensayos de Western blot.

En cada inmunoprecipitación realizada, utilizamos una dilución del anticuerpo en una relación 1:50 en 600 mg de tejido de raíz de plantas adultas e incubada toda la noche a 4 °C con solución amortiguadora compuesta de 50 mM Tris-HCl pH7.5, 1,50 mM NaCl, 0.1% Nonidet 40, 4 mM MgCl₂, 5 mM DTT, inhibidor de proteasas marca Complete (Roche,

Indianapolis, IN) y con perlas de agarosa – A (Roche), esta última previamente lavadas con dicha solución amortiguadora.

Las fracciones de ARN inmunoprecipitadas fueron purificadas mediante fenol. Al mismo tiempo, una fracción de proteína inmunoprecipitada fue analizada por análisis tipo Western blot. El resultado de cada amplificación tanto para miR1514a como para cada phasiRNA es resultado réplicas independientes y para su análisis utilizamos la prueba llamada multiple paired Student's t tests (**p=0.001, *p=0.01, *p=0.05).

Construcción de los plásmidos empleados en este estudio y la generación de *hairy roots* de frijol.

El precursor de miR1514a (202 pb) fue amplificado a partir de DNA total e introducido en el plásmido pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen) utilizando los oligonucleótidos con secuencia sentido CACCTTGCCCTACCTTCTCAC y complementaria GTGAAGGAAGATAAGACTCCC. Para la obtención de construcción sobre-expresora de miR1514a, empleamos el sistema Gateway (Gateway system, Invitrogen) por lo que empleamos una reacción de recombinación mediante la enzima LR clonasa con el plásmido. El plásmido destino cuenta con el promotor 35S CaMV y el gen reportero llamado TdTomato, el cual emite una fluorescencia roja (Naya, et al. 2014).

Con respecto a la construcción de inhibición de miR1514a, usamos la metodología conocida como Short Tandem Target Mimicry strategy (Yan, et al. 2012). De manera breve, el fragmento amplificado fue introducido en el plásmido pENTR-SD vector (Invitrogen), que fue recombinado en el plásmido pBA-DC-TdT (Naya, et al. 2014) para obtener pBA-STTM-miR1514a-TdT. Todas las construcciones fueron confirmadas por secuenciación en la Unidad Síntesis y Secuenciación de ADN, IBT-UNAM. Como control, empleamos la construcción vacía pBA-DC-TdT. Dichas construcciones fueron introducidas en *Agrobacterium rhizogenes* cepa K599 para la generación de *hairy roots* de acuerdo al protocolo ya establecido (Estrada-Navarrete, et al. 2007). Se utilizaron 15 plantas adultas de frijol y 15 días después de la infección cosechamos las raíces que emitían una

florescencia roja obteniendo un promedio de 4.3 raíces rojas por planta, esto en tres experimentos independientes, las cuales fueron cosechadas y guardadas a -70 °C hasta su procesamiento.

Experimentos de secuenciación masiva de ARN y análisis de ontología en raíces *hairy roots* de frijol.

Dos réplicas independientes de raíces *hairy roots* que llevan la construcciones de Plásmido vacío, sobre-expresión y la inhibición de miR1514a (C-, SE-1514a ó STTM-1514a) fueron colectadas y procesadas mediante Trizol (Life Technologies) apegado a las especificaciones del proveedor. La calidad e integridad del ARN total obtenido fue verificada mediante Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se realizaron reacciones de ADNc usando el paquete comercial True-Seq stranded mRNA Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA) a partir de 1 µg ARN total. Este ADNc fue secuenciado mediante NextSeq 500 platform (Illumina) con una configuración de 150 ciclos de 2x75 de secuencias pares terminales, esto se realizó en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA, IBT-UNAM.

Después de remover las lecturas de baja calidad, las bibliotecas generadas contenían alrededor de 32-47 millones de lecturas de las que entre 23 a 33 millones empalmaron con el genoma de frijol, disponible en Phytozome (www.phytozome.net/commonbean.php). Los perfiles de expresión diferencial fueron obtenidos usando las lecturas en formato fastq que empalmaban con el transcriptoma de referencia de *P. vulgaris* (PhytozomeV10_Pvulgaris_218_v1.0.transcript.fa) empleando la herramienta Bowtie aligner (Langmead *et al.* 2009), utilizando los parámetros `-aS-X 600 - offrate 1`. El resultado del alineamiento fue normalizado mediante el programa informático eXpress (Roberts and Pachter 2013) con los parámetros de `-rf-stranded` desde los datos generados usando una cadena específica del método dUTP. La normalización fue utilizada como entrada para el análisis de expresión diferencial utilizando el programa informático Trinity seleccionando el paquete EdgeR (Haas *et al.* 2013). Todos los datos se encuentran

disponibles en la base de datos de la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) con el número de acceso PRJNA342643.

Para predecir la funcionalidad entre diferentes genes expresados encontrados en la secuenciación masiva de ARN, las categorías de gen/ontología fueron obtenida por TopGO (P-value < 0.05) y clasificadas en base a su categoría gen/ontológico, utilizando la herramienta CateGORizer (<http://www.animalgenome.org/tools/catego/>) considerando la opción "*consolidated single occurrences count*". El conteo final de las categorías secundarias correspondiente a la clasificación parental se representó en una gráfica obtenida en el paquete ggplot2 del programa R.

Análisis *in silico* para el descubrimiento de motivos en la región 1 kb río arriba del inicio de la transcripción de los genes presentes en el análisis de secuenciación masiva de ARN y en la comparación entre genes NAC.

Para la identificación de motivos en la región promotora, empleamos la herramienta MEME usando los parámetros pre-establecidos (Bailey, et al. 2009). Analizamos la región correspondiente a 1000 nt río arriba de cada gen seleccionado, obtenida del genoma de frijol disponible en (www.phytozome.net/commonbean.php) (Goodstein *et al.* 2012). Para explorar si existe un motivo (s) presente en el transcrito codificante de NAC de frijol y otras leguminosas, empleamos la herramienta MEME, la secuencia analizada empieza a partir de la secuencia de reconocimiento de miR1514a hasta el codón de paro, también se analizaron genes homólogos de *G. max* (Glyma.16G016700) y *M. truncatula* (Medtr8g023860) estas secuencias están disponibles en (www.phytozome.net) (Goodstein, et al. 2012).

Predicción de mensajeros blanco de los phasiRNAs provenientes de NAC 700.

Para predecir los transcritos blanco de los phasiRNAs provenientes de NAC 700, utilizamos la herramienta disponible psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server con los parámetros ya asignados, (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) (Dai and Zhao 2011), utilizando para la búsqueda todos los modelos génicos disponibles en el

genoma de *P. vulgaris* (Phytozome.net/commonbean) y los phasiRNAs derivados de la secuencia de NAC 700.

REFERENCIAS

- (CIAT), C.I.d.A.T. (2015) Growth Habits and Different Names for Beans in Latin America.
- Acosta-Gallegos, J., Acosta, E., Padilla, S., Goytia, M.A., Rosales, R. and López, E.** (1999) Mejoramiento de la resistencia a la sequía en frijol común en México. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, **10**, 83-90.
- Addo-Quaye, C., Eshoo, T.W., Bartel, D.P. and Axtell, M.J.** (2008) Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Curr Biol*, **18**, 758-762.
- Akdogan, G., Tufekci, E.D., Uranbey, S. and Unver, T.** (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Funct Integr Genomics*, **16**, 221-233.
- Allen, E. and Howell, M.D.** (2010) miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Semin Cell Dev Biol*, **21**, 798-804.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C.** (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **121**, 207-221.
- Arenas-Huertero, C., Perez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol*, **70**, 385-401.
- Arikit, S., Xia, R., Kakrana, A., Huang, K., Zhai, J., Yan, Z., Valdes-Lopez, O., Prince, S., Musket, T.A., Nguyen, H.T., Stacey, G. and Meyers, B.C.** (2014) An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell*, **26**, 4584-4601.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. and Bartel, D.P.** (2006) A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, **127**, 565-577.
- Axtell, M.J., Westholm, J.O. and Lai, E.C.** (2011) Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*, **12**, 221.
- Badis, G., Berger, M.F., Philippakis, A.A., Talukder, S., Gehrke, A.R., Jaeger, S.A., Chan, E.T., Metzler, G., Vedenko, A., Chen, X., Kuznetsov, H., Wang, C.F., Coburn, D., Newburger, D.E., Morris, Q., Hughes, T.R. and Bulyk, M.L.** (2009) Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, **324**, 1720-1723.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. and Noble, W.S.** (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*, **37**, W202-208.
- Bankaitis, V.A., Aitken, J.R., Cleves, A.E. and Dowhan, W.** (1990) An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature*, **347**, 561-562.
- Bankaitis, V.A., Malehorn, D.E., Emr, S.D. and Greene, R.** (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol*, **108**, 1271-1281.
- Barrera-Figueroa, B.E., Gao, L., Wu, Z., Zhou, X., Zhu, J., Jin, H., Liu, R. and Zhu, J.K.** (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *BMC Plant Biol*, **12**, 132.

- Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Biodiversidad., B.M.C.N.p.e.C.y.U.d.I.** (2015) Frijol.
- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti Zeuli, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L. and Papa, R.** (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol*, **197**, 300-313.
- Blair, M.W., Soler, A. and Cortes, A.J.** (2012) Diversification and population structure in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS One*, **7**, e49488.
- Bologna, N.G., Mateos, J.L., Bresso, E.G. and Palatnik, J.F.** (2009) A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J*, **28**, 3646-3656.
- Borges, A., Tsai, S.M. and Caldas, D.G.** (2012) Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep*, **31**, 827-838.
- Borges, F. and Martienssen, R.A.** (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **16**, 727-741.
- Boyer, J.S.** (2010) Drought decision-making. *J Exp Bot*, **61**, 3493-3497.
- Bray, E.A.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, **2**, 48-54.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J.** (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil*, **252**, 55-128.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L.** (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.
- Buhtz, A., Springer, F., Chappell, L., Baulcombe, D.C. and Kehr, J.** (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*, **53**, 739-749.
- Carnavale Bottino, M., Rosario, S., Grativol, C., Thiebaut, F., Rojas, C.A., Farrineli, L., Hemerly, A.S. and Ferreira, P.C.** (2013) High-throughput sequencing of small RNA transcriptome reveals salt stress regulated microRNAs in sugarcane. *PLoS One*, **8**, e59423.
- Casadevall, R., Rodriguez, R.E., Debernardi, J.M., Palatnik, J.F. and Casati, P.** (2013) Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, **25**, 3570-3583.
- Castro-Guerrero, N.A., Isidra-Arellano, M.C., Mendoza-Cozatl, D.G. and Valdes-Lopez, O.** (2016) Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc and phosphate deficiencies. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A.** (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*, **25**, 481-482.
- Chapman, E.J. and Carrington, J.C.** (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*, **8**, 884-896.
- Chen, H.M., Chen, L.T., Patel, K., Li, Y.H., Baulcombe, D.C. and Wu, S.H.** (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15269-15274.

- Contreras-Cubas, C., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2013) Determining Abundance of MicroRNAs and Other Small RNAs in Legumes. *Methods Mol Biol*, **1069**, 81-92.
- Contreras-Cubas, C., Rabanal, F.A., Arenas-Huertero, C., Ortiz, M.A., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2012) The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Mol Biol*, **80**, 103-115.
- Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2010) Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environ*, **33**, 481-489.
- Cuellar-Ortiz, S.M., M, D.L.P.A.-M., Acosta-Gallegos, J. and Covarrubias, A.A.** (2008) Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell Environ*, DOI: [10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01853.x).
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A. and Carrington, J.C.** (2010) Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 997-1003.
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N. and Carrington, J.C.** (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*, **23**, 431-442.
- Dai, X. and Zhao, P.X.** (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res*, **39**, W155-159.
- Deng, P., Wang, L., Cui, L., Feng, K., Liu, F., Du, X., Tong, W., Nie, X., Ji, W. and Weining, S.** (2015) Global Identification of MicroRNAs and Their Targets in Barley under Salinity Stress. *PLoS One*, **10**, e0137990.
- Ding, Y., Chen, Z. and Zhu, C.** (2011) Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot*, **62**, 3563-3573.
- Doyle, J.J. and Luckow, M.A.** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol*, **131**, 900-910.
- Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O.** (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*, **37**, 1356-1360.
- Ender, C. and Meister, G.** (2010) Argonaute proteins at a glance. *J Cell Sci*, **123**, 1819-1823.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Guillen, G., Diaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P.M. and Sanchez, F.** (2007) Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nat Protoc*, **2**, 1819-1824.
- Fahlgren, N., Howell, M.D., Kasschau, K.D., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Cumbie, J.S., Givan, S.A., Law, T.F., Grant, S.R., Dangel, J.L. and Carrington, J.C.** (2007) High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE*, **2**, e219.
- Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L. and Carrington, J.C.** (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol*, **16**, 939-944.
- Fei, Q., Xia, R. and Meyers, B.C.** (2013) Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell*, **25**, 2400-2415.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Formey, D., Iniguez, L.P., Pelaez, P., Li, Y.F., Sunkar, R., Sanchez, F., Reyes, J.L. and Hernandez, G.** (2015) Genome-wide identification of the *Phaseolus vulgaris* sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*, **16**, 423.
- Franco-Zorrilla, J.M., Del Toro, F.J., Godoy, M., Perez-Perez, J., Lopez-Vidriero, I., Oliveros, J.C., Garcia-Casado, G., Llave, C. and Solano, R.** (2009) Genome-wide identification of small RNA targets based on target enrichment and microarray hybridizations. *Plant J*.
- Gallegos, J.A.A. and Shibata, J.K.** (1989) Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Field Crops Research*, **20**, 81-93.
- Gálvez, A. and Salinas, G.** (2011) Monografía del frijol.
- Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., Cai, H., Ji, W., Chen, Q. and Zhu, Y.** (2011) osa-MIR393: a salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. *Mol Biol Rep*, **38**, 237-242.
- Gentile, A., Dias, L.I., Mattos, R.S., Ferreira, T.H. and Menossi, M.** (2015) MicroRNAs and drought responses in sugarcane. *Front Plant Sci*, **6**, 58.
- Gepts, P., Aragão, F.J.L., De Barros, A., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J., Lariguet, P., McClean, P., Melotto, M., Miklas, P.N., Pauls, P., Pedrosa-Harand, A., Porch, T., Sánchez, F., Sparvoli, F. and YuShou less, K.** (2008) *Genomics of Phaseolus Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics in Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*
- Ghosh, D. and Xu, J.** (2014) Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. *Front Plant Sci*, **5**, 6.
- Goettel, W., Liu, Z., Xia, J., Zhang, W., Zhao, P.X. and An, Y.Q.** (2014) Systems and evolutionary characterization of microRNAs and their underlying regulatory networks in soybean cotyledons. *PLoS One*, **9**, e86153.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. and Rokhsar, D.S.** (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*, **40**, D1178-1186.
- Goswami, S., Kumar, R.R. and Rai, R.D.** (2014) Heat-responsive microRNAs regulate the transcription factors and heat shock proteins in modulating thermo-stability of starch biosynthesis enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under the heat stress. *Australian journal of crop science* 697-705.
- Graham, P.H. and Vance, C.P.** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, **131**, 872-877.
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J.J. and Kay, M.A.** (2011) Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 9208-9213.

- Gupta, O.P., Sharma, P., Gupta, R.K. and Sharma, I.** (2014) MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant Mol Biol*, **84**, 1-18.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., Macmanes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N. and Regev, A.** (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*, **8**, 1494-1512.
- Hackenberg, M., Gustafson, P., Langridge, P. and Shi, B.J.** (2015) Differential expression of microRNAs and other small RNAs in barley between water and drought conditions. *Plant Biotechnol J*, **13**, 2-13.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D.** (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, **21**, 4671-4679.
- Hao, Y.J., Wei, W., Song, Q.X., Chen, H.W., Zhang, Y.Q., Wang, F., Zou, H.F., Lei, G., Tian, A.G., Zhang, W.K., Ma, B., Zhang, J.S. and Chen, S.Y.** (2011) Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *Plant J*, **68**, 302-313.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M.M. and Pereira, A.** (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in Arabidopsis reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol*, **154**, 1254-1271.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M.** (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. *Ecophysiology and Responses of Plants Under Salt Stress*. New York, NY: Springer, 25-87.
- Hayashi, S., Ishii, T., Matsunaga, T., Tominaga, R., Kuromori, T., Wada, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T.** (2008) The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant & cell physiology*, **49**, 1522-1535.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S. and Lydiate, D.** (2003) Molecular characterization of Brassica napus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant Mol Biol*, **53**, 383-397.
- Hellman, L.M. and Fried, M.G.** (2007) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, **2**, 1849-1861.
- Hernandez-Garcia, C.M. and Finer, J.J.** (2014) Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci*, **217-218**, 109-119.
- Hu, R., Qi, G., Kong, Y., Kong, D., Gao, Q. and Zhou, G.** (2010) Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in Populus trichocarpa. *BMC Plant Biol*, **10**, 145.
- Jeong, D.H., Park, S., Zhai, J., Gurazada, S.G., De Paoli, E., Meyers, B.C. and Green, P.J.** (2011) Massive Analysis of Rice Small RNAs: Mechanistic Implications of Regulated MicroRNAs and Variants for Differential Target RNA Cleavage. *Plant Cell*, **23**, 4185-4207.
- Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R.E., Kim, Y.J., Dinh, T.T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G. and Chen, X.** (2011) ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 regulate the termination of floral stem cells through two microRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **7**, e1001358.

- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C. and Kjellbom, P.** (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta*, **1465**, 324-342.
- Johnson, C., Kasprzewska, A., Tennessen, K., Fernandes, J., Nan, G.L., Walbot, V., Sundaresan, V., Vance, V. and Bowman, L.H.** (2009) Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res*, **19**, 1429-1440.
- Jolma, A., Yan, J., Whittington, T., Toivonen, J., Nitta, K.R., Rastas, P., Morgunova, E., Enge, M., Taipale, M., Wei, G., Palin, K., Vaquerizas, J.M., Vincentelli, R., Luscombe, N.M., Hughes, T.R., Lemaire, P., Ukkonen, E., Kivioja, T. and Taipale, J.** (2013) DNA-binding specificities of human transcription factors. *Cell*, **152**, 327-339.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B.** (2006) MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu Rev Plant Biol*, **57**, 19-53.
- Kami, J., Velasquez, V.B., Debouck, D.G. and Gepts, P.** (1995) Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1101-1104.
- Keyantash, J. and Dracup, J.A.** (2002) The Quantification of Drought: An Evaluation of Drought Indices. 1167-1180
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A.** (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature*, **428**, 81-84.
- Kim, S.Y., Kim, S.G., Kim, Y.S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.K. and Park, C.M.** (2007) Exploring membrane-associated NAC transcription factors in Arabidopsis: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res*, **35**, 203-213.
- Kim, V.N., Han, J. and Siomi, M.C.** (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 126-139.
- Kline, K.G., Sussman, M.R. and Jones, A.M.** (2010) Abscisic acid receptors. *Plant Physiol*, **154**, 479-482.
- Kruszka, K., Pacak, A., Swida-Barteczka, A., Nuc, P., Alaba, S., Wroblewska, Z., Karlowski, W., Jarmolowski, A. and Szweykowska-Kulinska, Z.** (2014) Transcriptionally and post-transcriptionally regulated microRNAs in heat stress response in barley. *J Exp Bot*, **65**, 6123-6135.
- Kuromori, T., Mizoi, J., Umezawa, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2014) Drought stress signaling network. *Molecular Biology*
- Kwak, M. and Gepts, P.** (2009) Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor Appl Genet*, **118**, 979-992.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crete, P., Voinnet, O. and Robaglia, C.** (2009) Biochemical Evidence for Translational Repression by Arabidopsis MicroRNAs. *Plant Cell*.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L.** (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*, **10**, R25.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L.S.** (2011) Genome-wide survey and expression analysis

- of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res*, **18**, 263-276.
- Lee, S. and Park, C.M.** (2012) Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*, **7**, 599-601.
- Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., Liu, X., Wang, Y., Wu, J. and Li, X.** (2011a) Characterization of the stress associated microRNAs in Glycine max by deep sequencing. *BMC Plant Biol*, **11**, 170.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X.** (2005) Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol*, **15**, 1501-1507.
- Li, Y., Li, C., Ding, G. and Jin, Y.** (2011b) Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways. *BMC Evol Biol*, **11**, 122.
- Liang, G., Ai, Q. and Yu, D.** (2015) Uncovering miRNAs involved in crosstalk between nutrient deficiencies in Arabidopsis. *Sci Rep*, **5**, 11813.
- Lin, S.I., Chiang, S.F., Lin, W.Y., Chen, J.W., Tseng, C.Y., Wu, P.C. and Chiou, T.J.** (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol*, **147**, 732-746.
- Liu, Q. and Zhang, H.** (2012) Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *J Agric Food Chem*, **60**, 6524-6536.
- Mahajan, S. and Tuteja, N.** (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys*, **444**, 139-158.
- Mallory, A. and Vaucheret, H.** (2010) Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *Plant Cell*, **22**, 3879-3889.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K. and Bartel, D.P.** (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *Embo J*, **23**, 3356-3364.
- Mallory, A.C. and Vaucheret, H.** (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat Genet*, **38 Suppl 1**, S31-36.
- Mamidi, S., Rossi, M., Annam, D., Moghaddam, S., Lee, R., Papa, R. and McClean, P.** (2011) Investigation of the domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris*) using multilocus sequence data. *Functional Plant Biology* **38**, 953-967.
- Manavella, P.A., Koenig, D. and Weigel, D.** (2012) Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 2461-2466.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. and Maizel, A.** (2010) miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell*, **22**, 1104-1117.
- Megraw, M., Cumbie, J.S., Ivanchenko, M.G. and Filichkin, S.A.** (2016) Small Genetic Circuits and MicroRNAs: Big Players in Polymerase II Transcriptional Control in Plants. *Plant Cell*, **28**, 286-303.
- Meijer, H.A., Smith, E.M. and Bushell, M.** (2014) Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans*, **42**, 1135-1140.
- Meyers, B.C., Axtell, M.J., Bartel, B., Bartel, D.P., Baulcombe, D., Bowman, J.L., Cao, X., Carrington, J.C., Chen, X., Green, P.J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S.E., Mallory, A.C., Martienssen, R.A., Poethig, R.S., Qi, Y., Vaucheret, H., Voinnet,**

- O., Watanabe, Y., Weigel, D. and Zhu, J.K.** (2008) Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, **20**, 3186-3190.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. and Qi, Y.** (2008) Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, **133**, 116-127.
- Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E. and Blair, M.W.** (2006) Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, **147**, 105-131.
- Monks, D.E., Aghoram, K., Courtney, P.D., DeWald, D.B. and Dewey, R.E.** (2001) Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell*, **13**, 1205-1219.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. and Carrington, J.C.** (2008) Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*, **133**, 128-141.
- Muñoz Saldaña, R.** (2010) Frijol, rica fuente de proteínas. *Biodiversitas. CONABIO.*, 7-11.
- Nakano, M., Nobuta, K., Vemaraju, K., Tej, S.S., Skogen, J.W. and Meyers, B.C.** (2006) Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res*, **34**, D731-735.
- Nakashima, K., Tran, L.S., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J*, **51**, 617-630.
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci*, **5**, 170.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Naya, L., Paul, S., Valdes-Lopez, O., Mendoza-Soto, A.B., Nova-Franco, B., Sosa-Valencia, G., Reyes, J.L. and Hernandez, G.** (2014) Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS One*, **9**, e84416.
- Nogueira, F.T., Chitwood, D.H., Madi, S., Ohtsu, K., Schnable, P.S., Scanlon, M.J. and Timmermans, M.C.** (2009) Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet*, **5**, e1000320.
- Nova-Franco, B., Iniguez, L.P., Valdes-Lopez, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S.I., Ramirez, M., Paul, S., Reyes, J.L., Girard, L. and Hernandez, G.** (2015) The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiol*, **168**, 273-291.
- Oliver, M.J., Cushman, J.C. and Koster, K.L.** (2010) Dehydration tolerance in plants. *Methods Mol Biol*, **639**, 3-24.
- Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L. and Skriver, K.** (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, **10**, 79-87.

- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J.L., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A.A.** (2010) Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **154**, 373-390.
- Osella, M., Bosia, C., Cora, D. and Caselle, M.** (2011) The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Comput Biol*, **7**, e1001101.
- Pandey, R., Joshi, G., Bhardwaj, A.R., Agarwal, M. and Katiyar-Agarwal, S.** (2014) A comprehensive genome-wide study on tissue-specific and abiotic stress-specific miRNAs in *Triticum aestivum*. *PLoS One*, **9**, e95800.
- Pant, B.D., Buhtz, A., Kehr, J. and Scheible, W.R.** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, **53**, 731-738.
- Park, M.Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R.S.** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3691-3696.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X.** (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*, **12**, 1484-1495.
- Pelaez, P., Trejo, M.S., Iniguez, L.P., Estrada-Navarrete, G., Covarrubias, A.A., Reyes, J.L. and Sanchez, F.** (2012) Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, **13**, 83.
- Qi, Y. and Mi, S.** (2010) Purification of Arabidopsis argonaute complexes and associated small RNAs. *Methods Mol Biol*, **592**, 243-254.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J. and Bartel, D.P.** (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev*, **20**, 3407-3425.
- Roberts, A. and Pachter, L.** (2013) Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nature methods*, **10**, 71-73.
- Rodríguez, M., Canales, E. and Borrás-Hidalgo, O.** (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Bioteconología Aplicada.*, **22**, 1-10.
- Rogers, K. and Chen, X.** (2013) Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell*, **25**, 2383-2399.
- Rosales, M.A., Ocampo, E., Rodriguez-Valentin, R., Olvera-Carrillo, Y., Acosta-Gallegos, J. and Covarrubias, A.A.** (2012) Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiol Biochem*, **56**, 24-34.
- Rushton, P.J., Bokowiec, M.T., Han, S., Zhang, H., Brannock, J.F., Chen, X., Laudeman, T.W. and Timko, M.P.** (2008) Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant Physiol*, **147**, 280-295.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S.M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M.A., Chovatia, M., Gepts, P., Goodstein, D.M., Gonzales, M., Hellsten, U., Hyten, D.L., Jia, G., Kelly, J.D., Kudrna, D., Lee, R., Richard, M.M., Miklas, P.N., Osorno, J.M., Rodrigues, J., Thareau, V., Urrea, C.A., Wang, M., Yu, Y.,**

- Zhang, M., Wing, R.A., Cregan, P.B., Rokhsar, D.S. and Jackson, S.A.** (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet*, **46**, 707-713.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D.** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 194-199.
- Shabalina, S.A. and Koonin, E.V.** (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, **23**, 578-587.
- Shi, Z., Wang, J., Wan, X., Shen, G., Wang, X. and Zhang, J.** (2007) Over-expression of rice OsAGO7 gene induces upward curling of the leaf blade that enhanced erect-leaf habit. *Planta*, **226**, 99-108.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*, **58**, 221-227.
- Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R.M., Khare, T.S. and Wani, S.H.** (2016) MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Front Plant Sci*, **7**, 817.
- Singh, S.P.** (1982) A key for identification of different growth habits of frijol *Phaseolus vulgaris* L. *Annual report of the Bean Improvement Cooperative*, **25**, 92-95.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L.** (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, **10**, 1026-1032.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L.** (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Song, L., Axtell, M.J. and Fedoroff, N.V.** (2010) RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in Arabidopsis. *Curr Biol*, **20**, 37-41.
- Song, X., Li, P., Zhai, J., Zhou, M., Ma, L., Liu, B., Jeong, D.H., Nakano, M., Cao, S., Liu, C., Chu, C., Wang, X.J., Green, P.J., Meyers, B.C. and Cao, X.** (2012) Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *Plant J*, **69**, 462-474.
- Sosa-Valencia, G., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2013) *Signaling by MicroRNAs in Response to Abiotic Stress in Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective*. Springer New York.
- Sosa-Valencia, G., Palomar, M., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L.** (2017a) The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *J Exp Bot*, **68**, 2013-2026.
- Sosa-Valencia, G., Romero-Pérez, S., Palomar, M., Covarrubias, A. and Reyes, J.L.** (2017b) Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes. *Plant Signaling & Behavior* **12**.
- Subramanian, S., Fu, Y., Sunkar, R., Barbazuk, W.B., Zhu, J.K. and Yu, O.** (2008) Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics*, **9**, 160.
- Sunkar, R.** (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Semin Cell Dev Biol*.

- Teran, H. and Singh, S.P.** (2002) Comparison of Sources and Lines Selected for Drought Resistance in Common Bean. *Crop Sci*, **42**, 64-70.
- Terán, H. and Singh, S.P.** (2002) Comparison of Sources and Lines Selected for Drought Resistance in Common Bean. *crop science*, **42**, 64-70.
- Thomson, D.W., Bracken, C.P. and Goodall, G.J.** (2011) Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*, **39**, 6845-6853.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell*, **16**, 2481-2498.
- Trejo-Arellano, M.S.** (2011) Análisis de los RNAs pequeños de Phaseolus vulgaris en respuesta a sequíamediante secuenciación masiva. In *Licenciatura en Ciencias Genómicas*: Universidad Nacional Autónoma de México., pp. 86.
- Tu, B., Liu, L., Xu, C., Zhai, J., Li, S., Lopez, M.A., Zhao, Y., Yu, Y., Ramachandran, V., Ren, G., Yu, B., Li, S., Meyers, B.C., Mo, B. and Chen, X.** (2015) Distinct and cooperative activities of HESO1 and URT1 nucleotidyl transferases in microRNA turnover in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **11**, e1005119.
- Valdes-Lopez, O., Arenas-Huertero, C., Ramirez, M., Girard, L., Sanchez, F., Vance, C.P., Luis Reyes, J. and Hernandez, G.** (2008) Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell Environ*, **31**, 1834-1843.
- Valdes-Lopez, O., Yang, S.S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P.H., Reyes, J.L., Vance, C.P. and Hernandez, G.** (2010) MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytol*, **187**, 805-818.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. and Stuitje, A.R.** (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, **4**.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P.** (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, **3**, 12.
- Vaucheret, H.** (2008) Plant ARGONAUTES. *Trends Plant Sci*, **13**, 350-358.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D.P.** (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development*, **18**, 1187-1197.
- Vlasova, A., Capella-Gutierrez, S., Rendon-Anaya, M., Hernandez-Onate, M., Minoche, A.E., Erb, I., Camara, F., Prieto-Barja, P., Corvelo, A., Sanseverino, W., Westergaard, G., Dohm, J.C., Pappas, G.J., Jr., Saburido-Alvarez, S., Kedra, D., Gonzalez, I., Cozzuto, L., Gomez-Garrido, J., Aguilar-Moron, M.A., Andreu, N., Aguilar, O.M., Garcia-Mas, J., Zehnsdorf, M., Vazquez, M.P., Delgado-Salinas, A., Delaye, L., Lowy, E., Mentaberry, A., Vianello-Brondani, R.P., Garcia, J.L., Alioto, T., Sanchez, F., Himmelbauer, H., Santalla, M., Notredame, C., Gabaldon, T., Herrera-Estrella, A. and Guigo, R.** (2016) Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biol*, **17**, 32.

- Voinnet, O.** (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669-687.
- Wang, X., Zhang, S., Dou, Y., Zhang, C., Chen, X., Yu, B. and Ren, G.** (2015) Synergistic and independent actions of multiple terminal nucleotidyl transferases in the 3' tailing of small RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **11**, e1005091.
- Wierzbicki, A.T., Haag, J.R. and Pikaard, C.S.** (2008) Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell*, **135**, 635-648.
- Wu, L., Zhang, Q., Zhou, H., Ni, F., Wu, X. and Qi, Y.** (2009) Rice MicroRNA effector complexes and targets. *Plant Cell*, **21**, 3421-3435.
- Xia, K., Wang, R., Ou, X., Fang, Z., Tian, C., Duan, J., Wang, Y. and Zhang, M.** (2012a) OsTIR1 and OsAFB2 downregulation via OsmiR393 overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS One*, **7**, e30039.
- Xia, R., Zhu, H., An, Y.Q., Beers, E.P. and Liu, Z.** (2012b) Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biol*, **13**, R47.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N.H.** (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev*, **14**, 3024-3036.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C.** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.
- Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Xie, C., Peng, H., Ni, Z. and Sun, Q.** (2010) Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*, **10**, 123.
- Xu, Z.Y., Kim, S.Y., Hyeon do, Y., Kim, D.H., Dong, T., Park, Y., Jin, J.B., Joo, S.H., Kim, S.K., Hong, J.C., Hwang, D. and Hwang, I.** (2013) The Arabidopsis NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell*, **25**, 4708-4724.
- Yan, J., Gu, Y., Jia, X., Kang, W., Pan, S., Tang, X., Chen, X. and Tang, G.** (2012) Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in Arabidopsis. *Plant Cell*, **24**, 415-427.
- Yang, Z.M. and Chen, J.** (2013) A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, **5**, 1184-1190.
- Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J.C. and Chen, X.** (2008) The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10073-10078.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J. and Meyers, B.C.** (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev*, **25**, 2540-2553.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. and Filipowicz, W.** (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, **118**, 57-68.

- Zhang, K. and Gan, S.S.** (2012) An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiol*, **158**, 961-969.
- Zhang, X., Henderson, I.R., Lu, C., Green, P.J. and Jacobsen, S.E.** (2007) Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4536-4541.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M. and Luo, L.** (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *J Exp Bot*, **61**, 4157-4168.
- Zhu, H., Xia, R., Zhao, B., An, Y.Q., Dardick, C.D., Callahan, A.M. and Liu, Z.** (2012) Unique expression, processing regulation, and regulatory network of peach (*Prunus persica*) miRNAs. *BMC Plant Biol*, **12**, 149.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.

ANEXOS.

Anexos de miR1514a:

Anexo 1. Artículo 1 como primer autor.

Anexo 2. Artículo 2 como primer autor.

Anexo 3. Lista de genes con expresión diferencial durante la sobre-expresión de miR1514a.

Anexo 4. Lista de genes con expresión diferencial durante la inhibición de miR1514a. Puede descargarse en la siguiente liga (ver tablas S3-A y S3-B): <https://academic.oup.com/jxb/article/doi/10.1093/jxb/erw380/2627446/The-Legume-miR1514a-modulates-a-NAC-transcription#authorNotesSectionTitle>

Anexo 5. Lista de las categorías de genes (GO) sobre-representados y reprimidos en la inhibición de la actividad de miR1514a. Puede descargarse en la siguiente liga (ver tablas S3-C Up GO y S3-D Down go): <https://academic.oup.com/jxb/article/doi/10.1093/jxb/erw380/2627446/The-Legume-miR1514a-modulates-a-NAC-transcription#authorNotesSectionTitle>

Anexo 6. Niveles de acumulación de miR1514a en raíces de Pinto Villa.

Anexos de miR2118:

Anexo 7. miR2118 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de plántulas e hipocótilos en dos cultivares con diferente resistencia a la sequía.

Anexo 8. miR2118 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de plantas adultas en tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 9. miR2118 no muestra diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 10. Niveles de acumulación de miR2118 en hipocótilos y raíces de frijol bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.

Anexo 11. Sobre-expresión de miR2118 en *Nicotiana benthamiana*

Anexo 12. Predicciones bioinformáticas del transcrito regulados por miR2118, , mediante el servidor <http://plantgrn.noble.org>.

Anexos de otros microRNAs utilizados como referencia en este trabajo:

Anexo 13. Niveles de acumulación de miR2118* en raíces de plántulas de Pinto Saltillo.

Anexo 14. miR398 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces adultas de tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 15. miR398 muestra diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 16. miR159 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 17. miR159 muestra diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia a la sequía.

Anexo 18. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOTAS FINALES.

Por último, durante la realización de este estudio se contribuyó de forma significativa a los siguientes artículos originales publicados en revistas internacionales indexadas/arbitradas y además se escribió una revisión . Estos textos no se adjuntan al documento, aunque sí sus referencias:

- 1.- **Sosa-Valencia, G.**, Romero-Perez, P.S., Palomar, V.M., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L. (2017b) Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes. *Plant Signal Behav*, 4;12(3):e1284724.
- 2.- Covarrubias, A.A., Reyes, J.L., Battaglia, M., Rosales, M.A., Cuellar, S., Contreras, C., Rivera, L., De la Rosa, C., **Sosa, G.**, Rabanal, F., Velarde, A., Campos, F., Ocampo, E. and Solorzano, R.M. (2014). The response to water deficit in *Phaseolus vulgaris* L. in *The journal of the International Legume Society*. In *The journal of the International Legume Society*, pp. 38-41.
- 3.- Naya, L., Paul, S., Valdes-Lopez, O., Mendoza-Soto, A.B., Nova-Franco, B., **Sosa-Valencia, G.**, Reyes, J.L. and Hernandez, G. (2014). Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS One*, 9, e84416.
- 4.- **Sosa-Valencia, G.**, Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L. (2013). *Signaling by MicroRNAs in Response to Abiotic Stress in Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective*. Springer New York.

Anexos de miR1514a:

Anexo 1. Artículo 1 como primer autor.



RESEARCH PAPER

The Legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought

Guadalupe Sosa-Valencia, Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias and José L. Reyes*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca Mor., Mexico

* Correspondence: jlreyes@ibt.unam.mx

Received 29 June 2016; Accepted 28 September 2016

Editor: Christine Foyer, Leeds University

Abstract

Recent studies have identified microRNAs as post-transcriptional regulators involved in stress responses. miR1514a is a legume microRNA that is induced in response to drought stress in *Phaseolus vulgaris* (common bean) and shows differential accumulation levels in roots during water deficit in two cultivars with different drought tolerance phenotypes. A recent degradome analysis revealed that miR1514a targets the transcripts of two NAC transcription factors (TFs), Phvul.010g121000 and Phvul.010g120700. Furthermore, expression studies and small RNA-seq data indicate that only Phvul.010g120700 generates phasiRNAs, which also accumulate under water deficit conditions. To confirm these results, we over-expressed miR1514a in transgenic *hairy roots*, and observed a reduced accumulation of Phvul.010g120700 and an increase in NAC-derived phasiRNAs; inhibition of miR1514a activity resulted in the opposite effect. Moreover, we determined that a NAC-derived phasiRNA associates with ARGONAUTE 1 (AGO1), suggesting that it is functional. In addition, a transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a levels revealed several differentially expressed transcripts, mainly involved in metabolism and stress responses, suggesting they are regulated by the NAC TF and/or by phasiRNAs. This work therefore demonstrates the participation of miR1514 in the regulation of a NAC transcription factor transcript through phasiRNA production during the plant response to water deficit.

Key words: ARGONAUTE 1, drought, microRNAs, phased siRNAs, *Phaseolus vulgaris*, PTGS, transcriptome.

Introduction

Plants are constantly exposed to adverse conditions, such as limited water availability, that affect their growth, productivity, and development (Buchanan *et al.*, 2015). To contend with water deficit, plants have developed diverse strategies at the molecular, cellular, and physiological levels, thus increasing their plasticity and consequently their probability of survival (Bray, 1997; Oliver *et al.*, 2010). The Fabaceae family (Legumes) includes 18 000 described species within

approximately 700 genera, and they represent one-third of the primary crop production in the world; however, legume production necessary for feed and food relies on only a few cultivated species (Doyle and Luckow, 2003). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important legume for human consumption and serves as a primary source of protein in the human diet in Central and South America (Broughton *et al.*, 2003; Graham and Vance, 2003; Miklas

et al., 2006; Castro-Guerrero *et al.*, 2016). However, the lack of proper irrigation systems and the ensuing exposure to significant drought periods impact directly on the yields of common bean in most areas where it is produced, affecting around 60% of its production. For these reasons, many breeding programs have focused on obtaining drought-resistant cultivars (Gallegos and Shibata, 1989; Broughton *et al.*, 2003). The characterization of stress responses at the molecular level among existing germplasm might reveal mechanisms underlying resistance and tolerance to drought stress.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding small RNAs of 21–24 nucleotides (nt) in length with regulatory roles in gene expression at the post-transcriptional level through mRNA cleavage or translation repression. In plants, miRNAs are involved in the control of diverse processes such as phytohormone regulation, morphogenesis, development, and stress responses. Most knowledge of post-transcriptional gene silencing (PTGS) mediated by miRNAs in response to stress has been gained in *Arabidopsis thaliana* and a few other model species (Mallory and Vaucheret, 2006; Voinnet, 2009; Covarrubias and Reyes, 2010; Sunkar, 2010; Sosa-Valencia *et al.*, 2013), despite an apparent close co-evolution between environment adaptation and gene-silencing mechanisms mediated by miRNAs being widespread in plants (Borges and Martienssen, 2015).

In the particular case of common bean, genome-wide studies have reported more than a hundred miRNAs encoded in its genome (Pelaez *et al.*, 2012; Formey *et al.*, 2015). A few studies have described common bean miRNAs responding to different stress factors such as nutrient deficit, metal toxicity, salinity, phosphorous deficiency, and copper homeostasis (Valdes-Lopez *et al.*, 2008, 2010; Naya *et al.*, 2014; Nova-Franco *et al.*, 2015). However, miRNA involvement in drought responses of common bean remains largely unexplored (Arenas-Huertero *et al.*, 2009; Contreras-Cubas *et al.*, 2012).

miRNA activities in plants commonly result in cleavage of the target transcript followed by its degradation. One alternative pathway in miRNA function in plants results from the cleavage and the recruitment of the cleaved RNA fragment by SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) and RNA DEPENDENT RNA POLYMERASE 6 (RDR6) for double-strand RNA (dsRNA) formation and its subsequent cleavage by Dicer-like 4 (DCL4) at consecutive 21-nt intervals. This process results in the production of phased small RNAs, which were initially named *trans*-acting siRNAs (tasiRNAs) because they caused down-regulation of their own target mRNAs *in trans* (Vazquez *et al.*, 2004). Not all phased siRNAs are known to act *in trans* and therefore, more recently, they have been renamed as phased secondary siRNAs (phasiRNAs) (Jeong *et al.*, 2011; Fei *et al.*, 2013).

The phasiRNA mechanism is well described for model plants such as *Arabidopsis thaliana*, which contains a few well-characterized *PHAS* loci (Vazquez *et al.*, 2004; Fahlgren *et al.*, 2007). In contrast, little is known for other plant species commonly possessing a larger number of uncharacterized *PHAS* loci, such as *Vitis vinifera* (grape) or *Populus*

trichocarpa (poplar) (Zheng *et al.*, 2015). In particular, phasiRNAs can be produced by members of the *PPR*, *NB-LRR*, and *MYB* gene families in *Arabidopsis*, *Medicago truncatula*, *Malus domestica*, and *Prunus persica* (Fahlgren *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). More recently, a catalog of *PHAS* loci has been described for *P. vulgaris* (Formey *et al.*, 2015), but their involvement in water deficit responses remains unknown.

The aim of this work was to contribute to the knowledge of post-transcriptional regulation in common bean mediated by the legume-specific miR1514a induced during drought stress (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Our analyses demonstrated that miR1514a targets the transcript encoding Phvul.010g120700 (hereafter named NAC 700), a member of the family known as No Apical Meristem (NAM) or NAC family of transcription factors (Olsen *et al.*, 2005), through cleavage and subsequent generation of secondary phasiRNAs. Here, we show that this process occurs during the exposure of adult plants to drought. Notably, we found that one resulting phasiRNA is recruited to ARGONAUTE 1- (AGO1-) complexes, supporting its role in PTGS. Furthermore, based on an RNA-seq strategy we propose downstream regulatory targets of the transcription factor NAC 700.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

We used *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) adult and seedling roots of two Mesoamerican cultivars (kindly provided by Dr Jorge Acosta of INIFAP): ‘Bayo Madero’ (drought-susceptible) and ‘Pinto Saltillo’ (drought-resistant) as described previously (Acosta-Gallegos *et al.*, 1999; Terán and Singh, 2002). For experiments with adult plants we used the biological material reported in Rosales *et al.* (2012). Plants were grown under greenhouse conditions, at 24 ± 4 °C with a relative humidity of $70 \pm 20\%$, and a natural light/dark cycle. At 29 d after germination (DAG), 252 plants were divided in three groups and subjected to three irrigation treatments: optimal irrigation, where pots were irrigated up to field capacity (fc, 2.5 ml g⁻¹ substrate); moderate drought (1.25 ml g⁻¹ substrate); and severe drought (0.625 ml g⁻¹ substrate) (Cuellar-Ortiz *et al.*, 2008). Leaves and roots were collected at 13 and 22 d of treatment and stored at -70 °C until further use.

To obtain seedlings, common bean seeds of the Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars were surface-sterilized using commercial alcohol and a bleach solution and germinated for 5 d at 26–28 °C and 60% relative humidity (RH) in darkness. They were then transplanted to vermiculite irrigated with a nutrient solution (CaCl₂ 0.78 M, MgSO₄ 0.486 M, ferric citrate 0.02 M, KH₂PO₄ 0.74 M pH 7.3, Na₂HPO₄ 0.84 M pH 7.3, KCl 50 mM, H₃BO₃ 25 mM, MnSO₄ 5 mM, CuSO₄ 0.5 mM, ZnSO₄ 0.2 mM, Na₂MoO₄ 1 mM). For control conditions, seedlings were sown in vermiculite containing nutrient solution to 1.7 ml g⁻¹ substrate. The water deficit treatment consisted of reducing the nutrient solution content to 0.425 ml g⁻¹ (1/4 or mild drought) or 0.212 ml g⁻¹ substrate (1/8 or severe drought), as described previously (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). We harvested seedling hypocotyls or roots at 6, 12, 24 or 48 h after applying the water deficit conditions and they were stored at -70 °C until further use. These treatments were performed in three independent experiments.

For other treatments, ABA (65 μM), NaCl (100 and 200 mM) or Paraquat (10 and 100 μM) were added into the nutrient solution used to irrigate the seedlings sown in vermiculite as described above,

and hypocotyls and seedling roots were harvested at 6, 12, 24 or 48 h after applying each treatment.

RNA isolation and northern blot analysis

Total RNA was isolated from 100–500 mg of frozen tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Northern blot analyses were carried out as described previously (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Synthetic DNA oligonucleotides (Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, IBT-UNAM) with the antisense sequence corresponding to miR1514a and to U6 snRNA were used as probes (see Supplementary Table S5 at JXB online for oligonucleotide sequences; a full list of all primers used in this study is given in Table S5). Normalized miR1514a expression levels were calculated relative to U6 snRNA, as previously reported (Contreras-Cubas *et al.*, 2012; Naya *et al.*, 2014).

Real-time quantitative RT-PCR analysis

For the quantification of miR1514a and phasiRNAs accumulation levels by RT-qPCR, cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using the NCode miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) or, alternatively, using the stem-loop protocol as previously reported (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007) with minor adjustments as indicated by Contreras-Cubas *et al.* (2013). For qPCR we used a Step One real-time thermocycler (Applied Biosystems) and the SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). We performed an initial denaturing step at 95 °C for 5 min, followed by 95 °C for 10 s, 55 °C for 20 s for 40 cycles, and a final step of increasing temperature by 0.2 °C from 60 °C to 95 °C. Relative expression for each sample was calculated with the comparative C_t method. The C_t values obtained were normalized with the C_t value of U6 snRNA amplification.

To quantify mRNA levels of selected genes we generated cDNA using a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). cDNA synthesis and quality verification for RT-qPCR were performed as previously reported (Contreras-Cubas *et al.*, 2012). The resulting cDNA was then diluted and used to perform RT-qPCR assays using SYBR Green PCR Master Mix (Fermentas). Reactions were analyzed in a Step One real-time thermocycler (Applied Biosystems) using the following conditions: one cycle of 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s; 55 °C for 30 s, and extension steps were performed at specific temperatures for specific sequences. For each of three biological replicates, at least three RT-qPCR reactions were performed. Relative expression for each transcript was calculated with the comparative C_t method. The C_t values obtained were normalized with the C_t value of the reference gene *Skip16* (Borges *et al.*, 2012). The sequences of oligonucleotide primers used for RT-qPCR amplification of each RNA are provided in Supplementary Table S5.

Statistical analysis of gene expression (small RNAs and transcripts) was performed using one-way ANOVA and multiple paired Student's *t*-tests.

Immunoprecipitation of AGO1

For immunoprecipitation assays of AGO1, we used a custom-made rabbit polyclonal antibody (Genscript, Piscataway, NJ) raised against a synthetic peptide (CFYMEPETS DSGSMA) derived from AGO1 (Phvul.004G142900). The peptide sequence is located at the end of the PIWI domain at the C-terminus of the protein, and it is shared with *Arabidopsis thaliana* AGO1 and is not present in any other AGO protein encoded in the *P. vulgaris* or *A. thaliana* genomes. The antibody recognizes a single ~120 kDa protein in western blot assays. For each assay, we required 600 mg of root tissue from adult *P. vulgaris* plants ground in liquid nitrogen. A 1:50 antibody dilution was used and protein extracts were incubated in extraction buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5; 1.5 mM NaCl; 0.1% Nonidet 40; 4 mM MgCl₂; 5 mM DTT; Complete protease inhibitor

(Roche, Indianapolis, IN)] with the antibody and protein A-agarose beads (Roche) overnight at 4 °C. The co-immunoprecipitated RNA fraction was purified by phenol extraction. Alternatively, the protein fraction from immunoprecipitated material and total extract was obtained and analyzed by western blot, using the AGO1 antibody at a 1:1000 dilution.

Plasmid constructs and generation of composite transgenic hairy roots

The Pvu-miR1514a precursor (202 bp) was amplified from genomic DNA and cloned into the pENTR/SD/D-TOPO vector (Invitrogen). To obtain a miR1514a over-expression construct, we used the Gateway LR Clonase in a recombination reaction (Gateway system, Invitrogen) between pENTR-premiR1514a and pBA-DC-TdT. This expression plasmid contains the 35S CaMV promoter, and the tdTomato gene (red-fluorescent protein) as a visible reporter gene (Naya *et al.*, 2014). To obtain the miR1514a STTM construct we followed the Short Tandem Target Mimicry strategy (Yan *et al.*, 2012). The resulting DNA fragment (113 bp) was cloned into the pENTR-SD vector (Invitrogen). The insert in this plasmid (pENTR-STTM-1514a) was then recombined into pBA-DC-TdT to obtain pBA-STTM-miR1514a-TdT. All constructs were confirmed by DNA sequencing (Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, IBT-UNAM).

The empty pBA-DC-TdT vector and the resulting pBA-premiR1514a-TdT (OE-1514a) and pBA-STTM-miR1514a-TdT (STTM-1514a) plasmids were introduced into *Agrobacterium rhizogenes* K599 strain, and used for plant transformation as described previously (Estrada-Navarrete *et al.*, 2007) with minor modifications, in three independent experiments with 15 plants each. Plants were maintained for hairy root formation for 2 weeks and we obtained 2–6 independent TdT fluorescence positive roots per plant, which were pooled in each independent experiment and kept at –70 °C until further use.

RNA-seq experiments and gene ontology analysis of common bean transgenic hairy roots

Common bean transgenic hairy roots carrying the appropriate constructs (EV, OE-1514a, or STTM-1514a) from two independent sets of samples were collected and processed to obtain total RNA as described above. Total RNA (1 µg) from each of the six samples was assessed for quality and integrity using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), processed to obtain cDNA libraries using the True-Seq stranded mRNA Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA), and sequenced using a NextSeq 500 platform (Illumina) with a configuration of 150 cycles for 2 × 75 paired-end sequences (Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA, IBT-UNAM). After removing low-quality reads, all libraries contained between 32 and 47 million total reads of which 23 to 33 million reads per library mapped to the *P. vulgaris* ver. 1.0 genome available at Phytozome (www.phytozome.net/commonbean.php). Differential expression analysis was obtained using reads in the fastq format mapped to the *P. vulgaris* reference transcript compilation PhytozomeV10_Pvulgaris_218_v1.0.transcript.fa using the Bowtie aligner (Langmead *et al.*, 2009), applying the parameters -aS -X 600 --offrate 1. The resulting alignment was normalized using the eXpress software (Roberts and Pachter, 2013) with the -rf-stranded parameter since the data were generated using a strand-specific dUTP method. The normalized counts were used as input for the differential expression analysis using the scripts included with the Trinity software selecting the EdgeR package (Haas *et al.*, 2013). RNA-seq data in the form of raw data for six samples (EV, OE-1514a, or STTM-1514a, with replicates) have been deposited in the NCBI database as a Bioproject (accession PRJNA342643).

To predict functional relationships among differentially expressed genes found in the RNA-seq experiments, the enriched gene ontology (GO) categories obtained by topGO (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>; *P*-value <0.05) were

classified based on their parental GO terms using the CateGORizer tool (<http://www.animalgenome.org/tools/categor/>) with the ‘consolidated single occurrences count’ option. The final count of secondary categories for the corresponding parental categories was represented in a graph using the ggplot2 package in R (<http://ggplot2.org/>).

In silico DNA motif discovery analysis

To identify DNA sequence motifs we used the MEME discovery tool with default parameters (Bailey *et al.*, 2009). We retrieved a region of 1000 nt upstream from selected genes using sequence data available for the *P. vulgaris* genome (www.phytozome.net/commonbean.php; Goodstein *et al.*, 2012).

To discover sequence motifs present in NAC transcripts in *P. vulgaris* and other legume species using the MEME discovery tool, a sequence fragment starting from the miRNA recognition sequence and ending at the stop codon was retrieved from different NAC TF sequences from the common bean genome, and homologous genes from *Glycine max* and *Medicago truncatula* were also retrieved using sequence data available from annotated genomes (www.phytozome.net; Goodstein *et al.*, 2012).

Target prediction for NAC-derived phasiRNAs

To predict potential regulatory target mRNAs for the NAC-derived phasiRNAs, we used psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server, (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>; Dai and Zhao, 2011), using the default parameters. Manual addition of the phasiRNAs sequences was used to search targets using the transcriptome dataset for *P. vulgaris* (www.phytozome.net/commonbean.php).

Results

miR1514a shows different accumulation levels in roots during drought in two cultivars with different drought tolerance

We have previously reported that miR1514a levels in common bean (Pvu-miR1514a) increased in seedlings exposed to different abiotic stress conditions, as determined by northern blot assays (Arenas-Huertero *et al.*, 2009), and that its sequence is identical to that of *Glycine max* miR1514a (Subramanian *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011). The soybean genome encodes two *MIR1514* loci (*MIR1514a* and *MIR1514b*), which produce mature miRNAs that are identical in sequence except for a single nucleotide change towards the 3'-end (miRBase, version 21) (Subramanian *et al.*, 2008; Goettel *et al.*, 2014). We identified two loci encoding for *MIR1514a* (Chr. 3) and *MIR1514b* (Chr. 7) in the common bean genome, producing two mature 22-nt long miRNAs identical in sequence to Gma-miR1514a, and originating from asymmetrical precursors (see Supplementary Fig. S1A–C). We confirmed that both loci are expressed under the conditions tested in this study (Supplementary Fig. S1D, E). Because both common bean loci produce a miRNA identical in sequence to Gma-miR1514a, for the purposes of this study we will not distinguish between them and we will address both common bean miRNAs as miR1514a.

To continue characterizing the response to stress of miR1514a, we exposed 5-d-old seedlings to the addition of ABA or to different stress factors, including high NaCl or oxidative stress induced by the herbicide Paraquat, and

determined miR1514a levels by northern blot analysis (see Supplementary Fig. S2). In these initial experiments, we observed that the different treatments did not show changes in miR1514a accumulation. Thus, we focused on drought stress and we compared two common bean cultivars, Pinto Saltillo (PS, drought-tolerant) and Bayo Madero (BM, drought-sensitive), known to have contrasting drought tolerance phenotypes as defined by their grain yield under terminal drought conditions (Acosta-Gallegos *et al.*, 1999; Terán and Singh, 2002). We determined the accumulation levels of miR1514a by northern blot analysis in seedlings subjected to mild or severe drought regimes for 6, 12, 24, or 48 h and we analyzed roots and hypocotyls of each cultivar (Fig. 1 and Supplementary Fig. S3). The results showed that miR1514a levels increased in PS roots and hypocotyls upon 6 h of treatment (Fig. 1A and Supplementary Fig. S3A), whereas in BM roots no changes were detected (Fig. 1B and Supplementary Fig. S3B).

Furthermore, we analyzed leaves and roots of PS and BM adult plants subjected to drought stress, where we found similar accumulation profiles to those observed for seedlings: namely, that miR1514a showed a significant increase in accumulation under drought in PS roots (Fig. 1C) but not in leaves (Supplementary Fig. S4A) when compared to well-irrigated conditions, while BM plants showed no significant difference in roots (Fig. 1D) or leaves (Supplementary Fig. S4B).

miR1514a targets the mRNA of a NAC transcription factor under drought

Recently, we reported the genome-wide identification of miRNA targets in *P. vulgaris* by employing a Degradome or PARE analysis from seedling samples (Formey *et al.*, 2015), where miR1514a was found to target two transcripts encoding transcription factors of the NAC family, named Phvul.010G121000 (or NAC 000) and Phvul.010G120700 (or NAC 700) (Fig. 2A, B). This result was consistent with previous reports in *G. max* describing the mRNA targets of Gma-miR1514a as NAC TF-encoding transcripts (Arikiti *et al.*, 2014). In contrast to the degradome results obtained from seedlings, only NAC 700 transcript was detected in roots from adult plants (Fig. 2C; Formey *et al.*, 2015).

To confirm these data, a time-course experiment was performed in adult plants of PS and BM cultivars that were subjected to mild and severe drought treatments, and RT-qPCR analysis was carried out using RNA from roots to determine NAC 700 transcript accumulation levels. In agreement with the miR1514a accumulation pattern (see Fig. 1), the results showed that NAC 700 transcript abundance decreased in PS roots from stressed plants (Fig. 3A), whereas no significant change was detected for this transcript in BM roots from drought-treated plants, except at 22 d upon severe drought, which might represent an effect unrelated to miR1514a regulation (Fig. 3B).

NAC 700 mRNA is processed into phasiRNAs upon cleavage by miR1514a

Because miR1514a is 22 nt in length, we hypothesized that cleavage of its target mRNA would trigger the formation

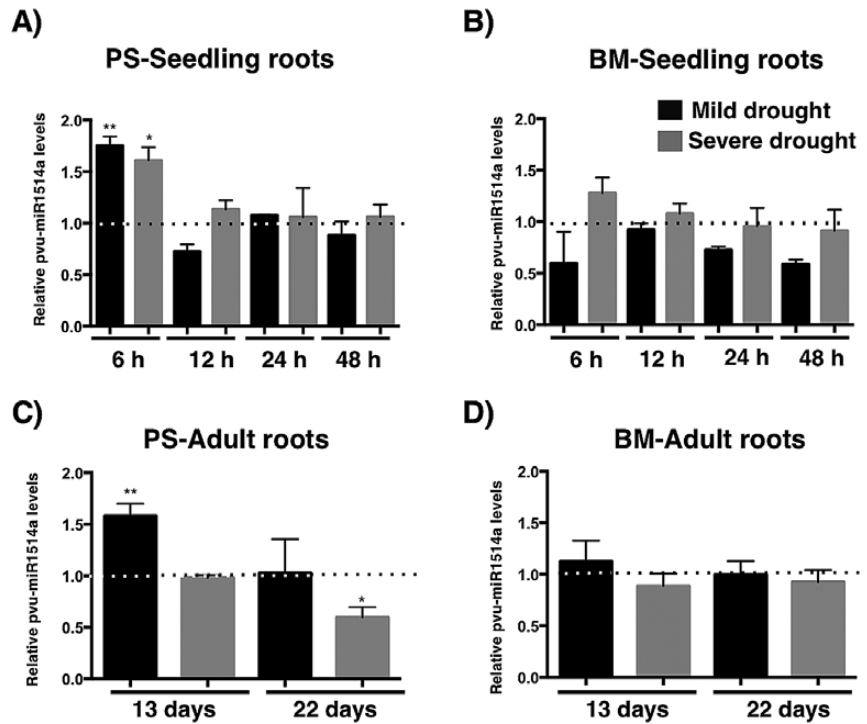


Fig. 1. miR1514a shows differential accumulation levels in roots of two common bean cultivars with different drought tolerance. Northern blot analysis of Pvu-miR1514a accumulation levels in (A) Pinto Saltillo (PS) seedling roots, (B) Bayo Madero (BM) seedling roots, (C) PS adult plant roots, and (D) BM adult plant roots. Seedlings were subjected to mild drought by irrigating with 1/4 of field capacity (fc), while adult plants were irrigated with 1/2 fc. Severe drought was imposed on seedlings by watering with 1/8 fc whereas adult plants were irrigated with 1/4 fc (See Methods for details). Dotted lines represent the Pvu-miR1514a levels for untreated samples at each time point. All Pvu-miR1514a values were normalized to the endogenous levels of U6 snRNA. Asterisks indicate a significant difference compared to the control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$), $n = 3$.

of phased small RNAs, or phasiRNAs (Chen *et al.*, 2007). Thus, considering the proposed miR1514a mRNA targets as candidates for phasiRNA formation, we applied a previously reported algorithm for phasiRNA loci identification (Chen *et al.*, 2007), which employed our previous sRNA-seq dataset (Pelaez *et al.*, 2012) to assign a P -value score. We found that NAC 700, but not NAC 000, showed a significant score ($P = 5.9 \times 10^{-6}$ and 'Not Detected', respectively). As a control for this analysis we also recovered *TAS3* ($P = 9.1 \times 10^{-5}$), a transcript that generates phasiRNAs upon miR390-mediated processing, known as tasiARFs (Axtell *et al.*, 2006) (see Supplementary Table S1). Moreover, we also found the NAC 700-derived phasiRNAs present in an independent sRNA-seq dataset of common bean (Nakano *et al.*, 2006; Pelaez *et al.*, 2012) (Supplementary Table S2). As part of our recent genome-wide analysis in common bean to uncover phasiRNAs-generating loci, we also identified the NAC 700 locus (Formey *et al.*, 2015) using an independent bioinformatical approach (Zhai *et al.*, 2011) (see Fig. 4A for a diagram).

To evaluate the production of NAC 700-derived phasiRNAs in common bean roots under drought conditions, we performed RT-qPCR analysis to determine their accumulation levels during drought time-course experiments where we had previously detected increased miR1514a levels and reduced NAC 700 levels (see Figs 1 and 3). The results indicated the presence of a subset of the phasiRNAs, which showed strikingly distinct accumulation levels (see Supplementary Fig. S5). Only one phasiRNA reproducibly increased during drought in PS roots, corresponding to the 21-mer RNA

immediately following the first phasiRNA defined by miRNA cleavage, denoted hereafter as phasiRNA1 (Fig. 4A, B). In comparison, the accumulation levels of the unrelated tasiARFs derived from the *TAS3* transcript were unaffected under the same stress conditions (Fig. 4C).

Modulation of miR1514a levels affects NAC 700 mRNA abundance

To provide further evidence of the direct role of miR1514a in regulating NAC 700 mRNA, we generated common bean transgenic *hairy roots* over-expressing the miR1514a precursor (OE-1514a) or transgenic *hairy roots* with reduced levels of active miR1514a using a Short Tandem Target Mimicry construct (STTM-1514a) aimed at inhibiting miRNA activity, as previously reported (Yan *et al.*, 2012). As expected, transgenic OE-1514a *hairy roots* showed an increased level of mature miR1514a, while the accumulation of NAC 700 mRNA was decreased. By contrast, we observed an increase in NAC 700 transcript levels when miR1514a was inhibited (Fig. 5A, B). Therefore, these results are consistent with a direct regulation of the NAC 700 transcript by miR1514a.

Next, we determined the accumulation of the NAC-derived phasiRNAs in these transgenic *hairy roots*. This analysis showed that even though not all individual phasiRNAs reached consistent accumulation profiles, both phasiRNA1 and phasiRNA6 showed reduced levels when miR1514a was inhibited, and increased levels when miR1514a was over-expressed (Fig. 5C, and see Fig. 4A for a diagram of phasiRNAs produced),

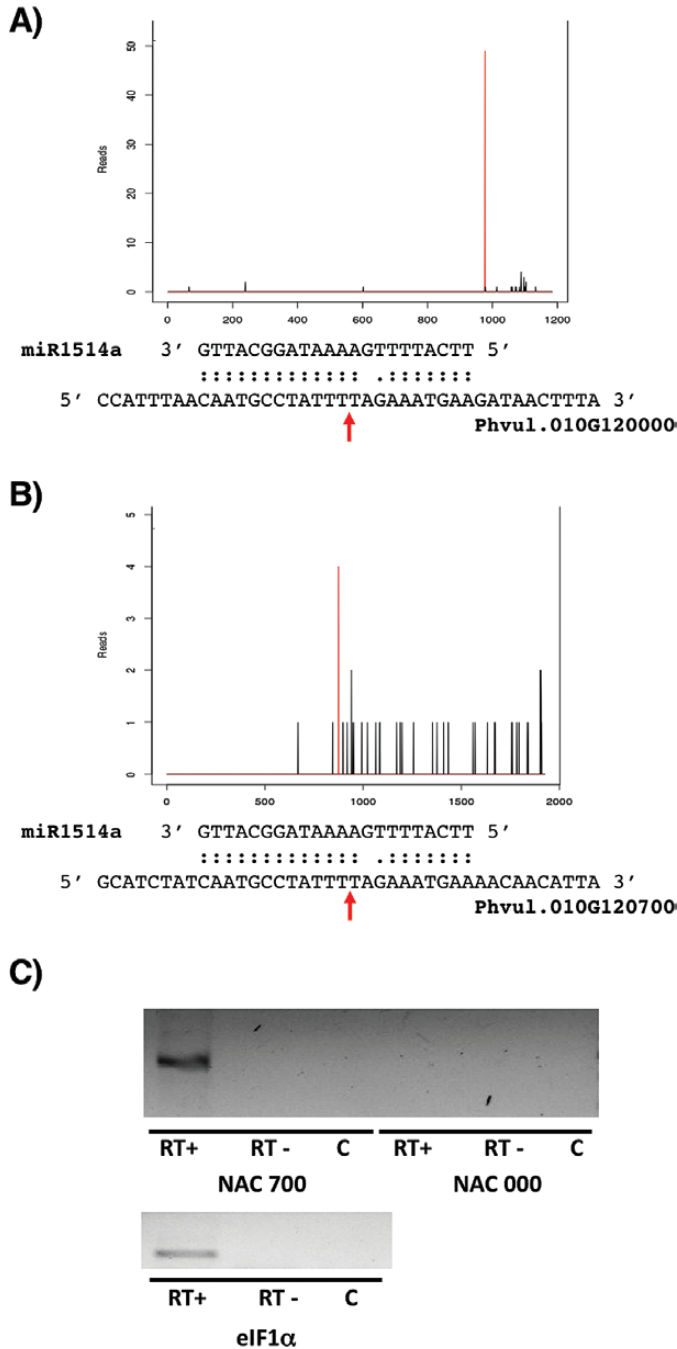


Fig. 2. miR1514a targets the transcripts of two different NAC-TFs. (A) Phvul.010G121000 (NAC 000) and (B) Phvul.010G120700 (NAC 700) are targeted by miR1514a. The peak values show the cleavage site defined by Degradome analysis (Formey *et al.*, 2015). (C) RT-PCR assays showing the presence of NAC 700 and NAC 000 transcripts in roots of adult plants. RT+ and RT- refer to the presence or absence of reverse transcriptase enzymes in the cDNA reaction; C is the PCR negative control. NAC 700 shows an amplicon of 360 bp, and the NAC 000 amplicon has a length of 248 bp. Amplification of the eIF4 transcript was used as positive control in cDNA reactions. (This figure is available in colour at JXB online.)

consistent with their formation upon NAC 700 mRNA processing. In contrast, the levels of the unrelated tasiARFs under these conditions were largely unaffected (Fig. 5C).

The transgenic hairy root system successfully revealed the relationship between miR1514a and phasiRNA production. However, there is an extremely low efficiency in obtaining

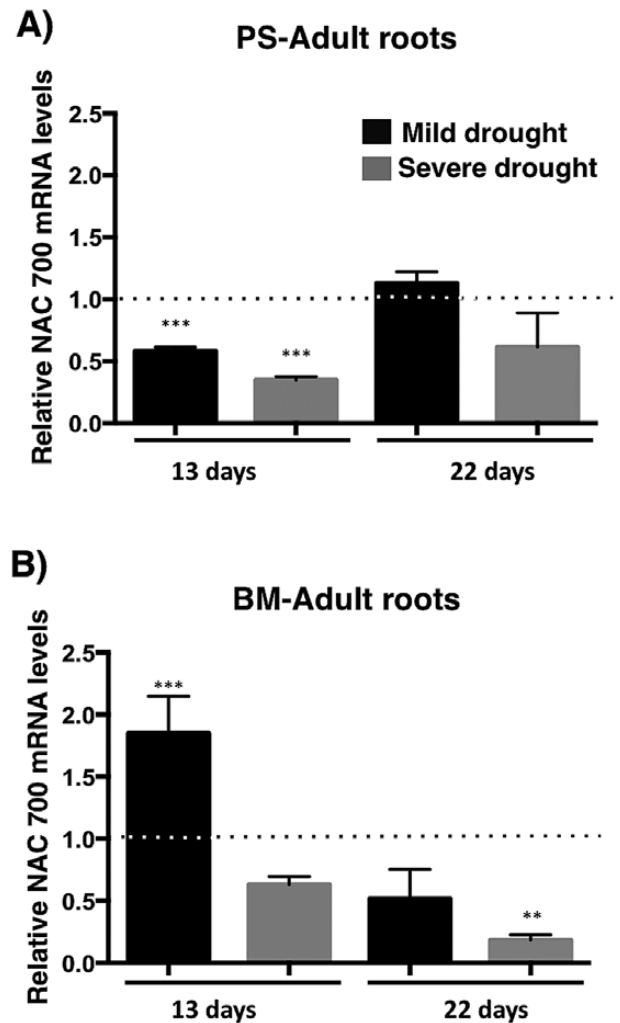


Fig. 3. The drought resistant Pinto Saltillo (PS) cultivar shows reduced NAC 700 levels under drought conditions. (A) Levels of NAC 700 mRNA in roots of PS adult plants determined by RT-qPCR. (B) Levels of NAC 700 mRNA in roots of Bayo Madero (BM) adult plants determined by RT-qPCR. Mild drought represents irrigation to 1/2 field capacity (fc). Severe drought is 1/4 fc. Samples were collected at 13 or 22 d after water deprivation. Expression of NAC 700 was normalized with Skp16 mRNA levels. Asterisks indicate a significant difference compared to control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), $n = 3$.

stable transgenic plants in common bean and this precluded our analysis of phenotypic traits caused by altered levels of miR1514a and/or NAC 700.

NAC 700-derived phasiRNA1 associates with AGO1

To explore the potential functionality of the NAC-derived phasiRNAs we wanted to see whether they could be detected in association with AGO1-containing protein complexes. To that end, we performed immunoprecipitation (IP) experiments using an antibody raised against *P. vulgaris* AGO1 (see Methods). For this, total cell protein extracts were obtained from roots of PS adult plants subjected to drought. We successfully recovered Pv-AGO1 as determined by western blots of the IP fractions, which showed enrichment for miR1514a, while U6 snRNA, an unrelated RNA, was not recovered in

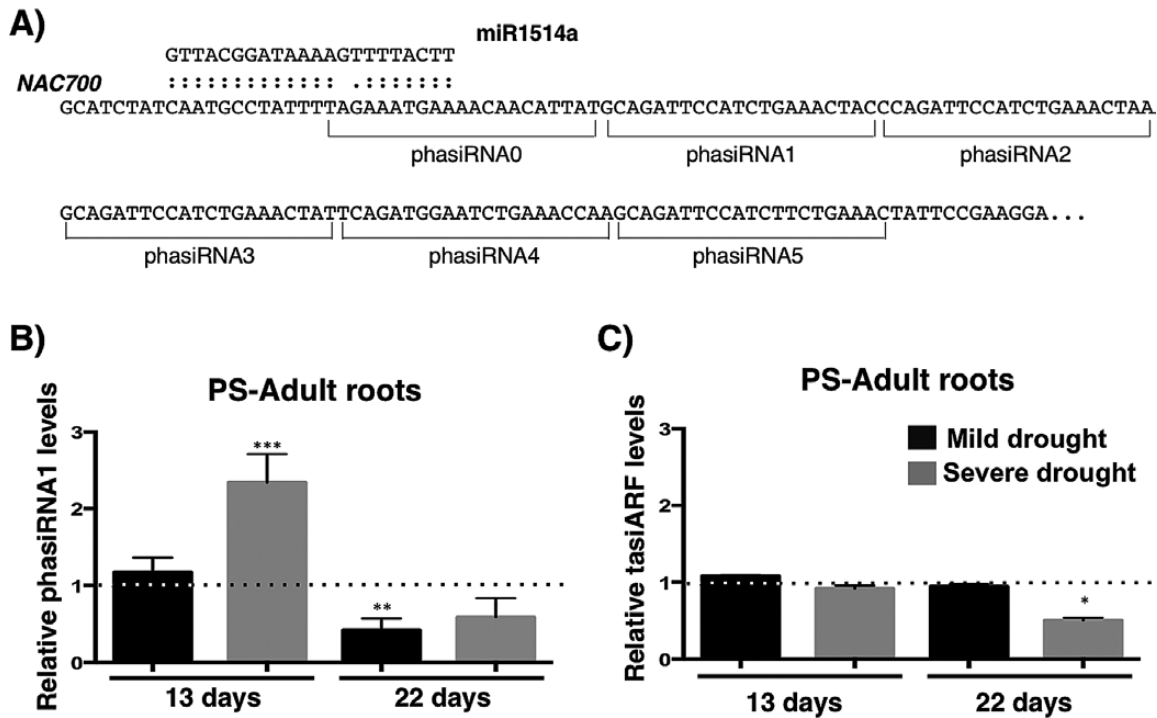


Fig. 4. phasiRNA1 levels are increased during a drought time-course in PS roots. (A) Scheme of miR1514a targeting of NAC 700 and phasiRNAs produced, including the numbering scheme used. Root samples of Pinto Sattillo (PS) adult plants were collected after 13 or 22 d after water deprivation and total RNA was used for RT-qPCR detection of small RNAs. (B) phasiRNA1 accumulation levels, (C) tasiARF accumulation levels. Dotted lines represent the small RNA levels for untreated samples at each time point normalized to 1. Mild drought represents irrigation to 1/2 field capacity (fc) and severe drought is 1/4 fc. Accumulation levels of small RNAs were normalized to those of U6 snRNA. Asterisks indicate a significant difference compared to control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), $n = 3$.

the IP fractions (Fig. 6A–C illustrates one of two independent experiments that showed similar patterns).

We then determined the presence of different NAC-derived phasiRNAs in AGO1 complexes. We observed that only phasiRNA1 was enriched in the IP fraction, while other NAC-derived phasiRNAs were not consistently recovered (Fig. 6C). These results indicate that phasiRNA1 is recruited into AGO1-containing protein complexes and suggest that it is functional in PTGS. However, other NAC-derived phasiRNAs that we did not recover could be associated to other AGO protein complexes, or their low abundance could limit our ability to detect them reliably.

Genome-wide effects of modulating miR1514a activity

To explore the consequences of miR1514a activity in relation to gene expression, we generated composite plants for overexpression or inhibition of miR1514a (OE-1514a or STTM-1514a, respectively), or containing the empty vector (EV, used as a control). Total RNA samples from two independent sets of transgenic hairy roots were subjected to RNA-seq analysis. While we observed an increased accumulation of miR1514a in the OE-1514a roots (see Fig. 5A, and Supplementary Fig. S6), RNA-seq analysis of these samples revealed a very limited number of differentially expressed genes (five up-regulated and seven down-regulated genes, P -value = 0.01, FDR = 0.01, data not shown). Among these genes, we did not observe the expected reduced levels of NAC 700 mRNA; thus

the miR1514a overexpression levels attained in these samples were not sufficient to produce a significant change and therefore these results were not analyzed further. In sharp contrast, we observed a large number of up- and down-regulated genes in roots where the miR1514a activity was inhibited (61 and 129 genes, respectively, P -value = 0.01, FDR = 0.01, Supplementary Table S3). Within this dataset we detected the corresponding up-regulation of NAC 700 mRNA but not of other unrelated NAC TFs (Fig. 7A and 7B, respectively). Thus, we determined significantly enriched gene ontology (GO) categories for the up- and down-regulated genes (see Supplementary Table S3). Based on Biological Process, in the up-regulated genes these categories included four metabolism terms, biogenesis, and morphogenesis (Fig. 8A), and included two HSP70 homologs and one SHAVEN 3 (SHV3) homolog involved in glycerol metabolism and important for root hair elongation (Hayashi *et al.*, 2008). For down-regulated genes, we again detected metabolism-related terms and responses to stress, including four different peroxidases, and a homolog of the PYR1-like ABA receptors (Kline *et al.*, 2010). We then analyzed the enriched GO terms based on Molecular Function, where we observed an enrichment for nucleic acid binding activity in the up-regulated genes, which contained two DCL homologs, two RDR homologs, and a HEN1 homolog. In the case of down-regulated genes, terms such as protein binding and antioxidant activity were recovered. To evaluate the significance of the results obtained in the RNA-seq experiments using a different approach, we selected

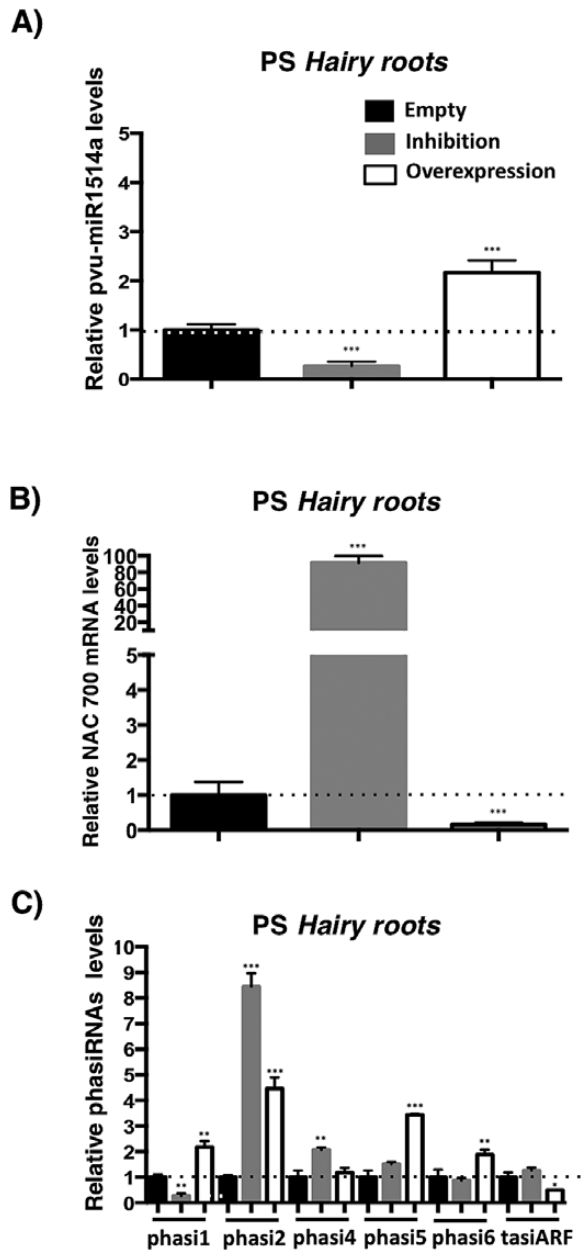


Fig. 5. Inhibition and overexpression of miR1514a has an effect on NAC 700 transcript and phasiRNA1 levels. Transgenic *hairy roots* of Pinto Saltillo (PS) plants carrying the STTM-1514a construct, OE-1514a, or the empty vector were collected and total RNA was used for RT-qPCR assays to detect accumulation levels of (A) miR1514a, (B) NAC 700 transcript, and (C) NAC-derived phasiRNAs and tasiARFs. Accumulation levels of small RNAs were normalized to those of U6 snRNA and NAC 700 was normalized to Skp 16 mRNA. Dotted lines represent the RNA levels for untreated samples at each time point normalized to 1. Asterisks indicate a significant difference compared to control conditions, as determined by Tukey's multiple comparisons test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), $n = 3$.

up- and down-regulated genes (based on their fold-change values) to detect them by RT-qPCR in the RNA samples employed for high-throughput sequencing. Consistently, four of the selected genes showed a similar trend of accumulation to that observed in the transcriptome analysis (Fig. 8B).

Finally, we reasoned that if phasiRNAs act in PTGS, inhibition of miR1514a in transgenic *hairy roots* should result in reduced phasiRNA activity. To explore this idea, we first

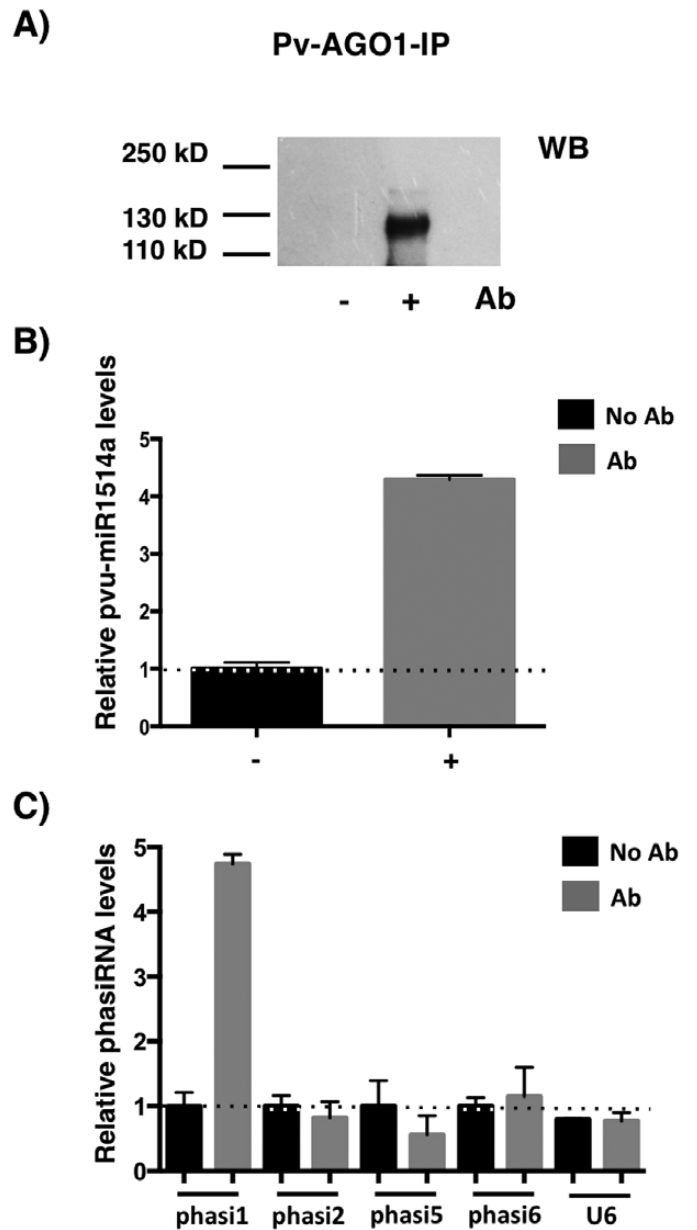


Fig. 6. NAC 700-derived phasiRNAs associate with AGO1. Immunoprecipitation (IP) reactions were carried out using total protein extracts from Pinto Saltillo (PS) roots of plants subjected to drought and an antibody directed to the Pv-AGO1 protein. (A) Western blot showing AGO1 IP reactions with (+) or without (-) the AGO1 antibody. Total RNA from IP reactions was recovered and used to determine small RNAs by RT-qPCR: (B) levels of miR1514a, and (C) NAC-derived phasiRNAs and U6 snRNA in the absence or presence of the AGO1 antibody (Ab). Error bars represent the standard error of three technical replicates. Results from one representative experiment are shown.

predicted regulatory targets of phasiRNAs using the psRNA-Target server (see Supplementary Table S4). However, based on the RNA-seq data we did not find changes in these transcripts upon miR1514a deregulation (Supplementary Fig. S7), suggesting that phasiRNAs do not act *in trans*. Interestingly, other NAC transcripts related to NAC 700 showed a significant increase in their accumulation when miR1514a was inhibited (see Fig. 7A), suggesting they are targeted by miR1514a and/or by NAC-derived phasiRNAs in transgenic *hairy roots*.

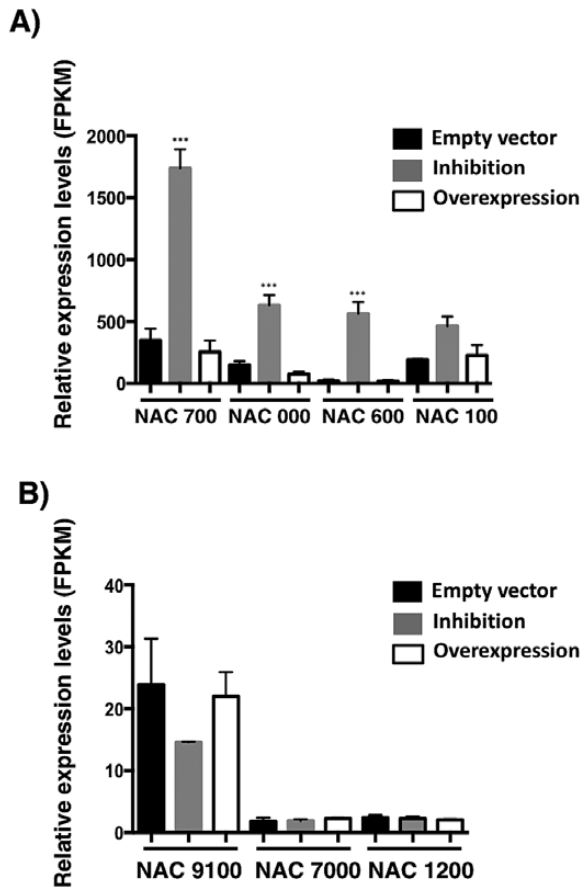


Fig. 7. Transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a levels reveal effects on NAC TF transcripts. Total RNA from two sets of transgenic *hairy roots* carrying the STTM-1514a construct, OE-1514a, or the empty vector, was obtained and analyzed by RNA-seq. (A) NAC 700 and other related NAC transcripts are modulated in roots carrying the miR1514a inhibition construct. (B) miR1514a has no effect on other unrelated NAC TFs lacking the miRNA recognition site. FPKM = fragments per kilobase of exon per million reads mapped. Asterisks indicate a significant difference compared to the empty vector samples, as determined by Tukey's multiple comparisons test (*** $P < 0.001$).

Discussion

In contrast to *Arabidopsis* and other model legume species, little is known about the post-transcriptional regulation in common bean during drought and even less is known about the contribution of miRNAs and other small RNAs, despite the great importance of gaining knowledge about this crop for improvement for food production to face population and climate changes. Therefore, in this study we aimed to characterize the activity of the common bean miR1514a during water deficit conditions.

miR1514a shows differential expression levels in response to drought in common bean

In an attempt to contribute to our knowledge of miRNAs in common bean, in 2009 Arenas-Huertero and co-workers reported cloning of 16 conserved and six non-conserved miRNAs, including miR1514a which showed expression levels modulated by low water availability

conditions (Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Here, we analyzed the miR1514a expression levels using two common bean cultivars with contrasting drought tolerance (Terán and Singh, 2002; Rosales-Serna *et al.*, 2004; Sanchez-Valdez *et al.*, 2004; Padilla-Ramirez *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Our results indicate that the terminal drought-resistant cultivar PS has a specific pattern of miR1514a modulation at two different developmental stages that was not detected in the susceptible BM cultivar, suggesting that it may mediate downstream events leading to stress responses.

miR1514a targets a NAC TF mRNA for degradation in roots

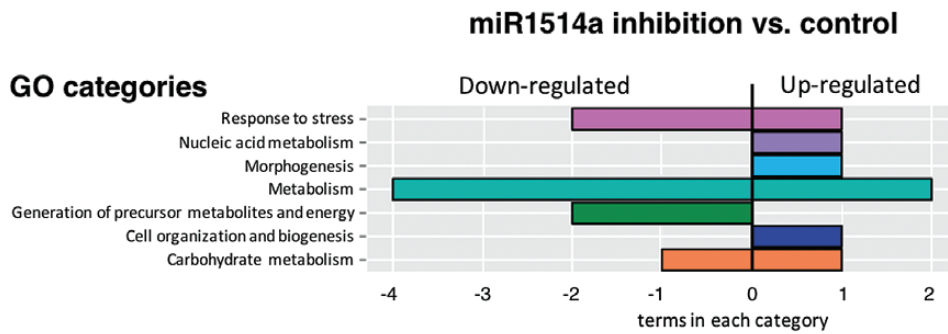
A recent genome-wide analysis to identify miRNA targets showed two NAC transcription factor transcripts for miR1514a, Phvul.010G120700 (NAC 700) and Phvul.010G121000 (NAC 000) (Formey *et al.*, 2015). Similarly, a homologous NAC TF mRNA is targeted by miR1514a in soybean, supporting these findings (Arikiti *et al.*, 2014). Here, we focused our attention on NAC 700 because its mRNA accumulation was decreased when miR1514a was up-regulated in roots of adult plants subjected to water deficit, while NAC 000 was not detected. These observations were consistent with the results obtained from transgenic *hairy roots*, where miR1514a accumulation levels were modulated, and showed an inverse effect on NAC 700 mRNA abundance, hence indicating that miR1514a directly targets NAC 700 mRNA. Nevertheless, we do not discard the possibility that with different growth conditions, different cultivars, and/or at other developmental stages, NAC 000 – or other related NAC TF mRNAs – might be expressed and subjected to miRNA regulation.

In plants, several miRNAs regulate mRNAs encoding transcription factors (Jones-Rhoades *et al.*, 2006), indicating that miRNAs can have an impact in miRNA-TF gene expression regulatory networks (Osella *et al.*, 2011; Megraw *et al.*, 2016). In addition, miRNAs can act in cell-cell or organ-organ communication (Megraw *et al.*, 2016), and they can even work at long distances from where they are produced, being transported through phloem (Buhtz *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008), thus effectively amplifying their regulatory effects. Upon cleavage of an initial transcript, production of secondary small RNAs may represent another way of signal amplification, as could be the case for phasiRNAs.

miR1514a-directed cleavage of NAC 700 mRNA triggers phasiRNA formation

In *A. thaliana*, tasiRNAs have been widely studied, being produced mainly from four *TAS* genes; miR173 regulates *TAS1a/b/c* and *TAS2* transcripts, while miR390 and miR828 target *TAS3* and *TAS4*, respectively (Axtell *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013). With the advent of high-throughput sequencing of small RNAs, phasiRNA identification has been developed and more *PHAS* loci have been annotated, as is the case for *TAS5*, *TAS6* (Arif *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012), and many *TAS*-like (*TASL*) loci (Zhai *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2013).

A)



B)

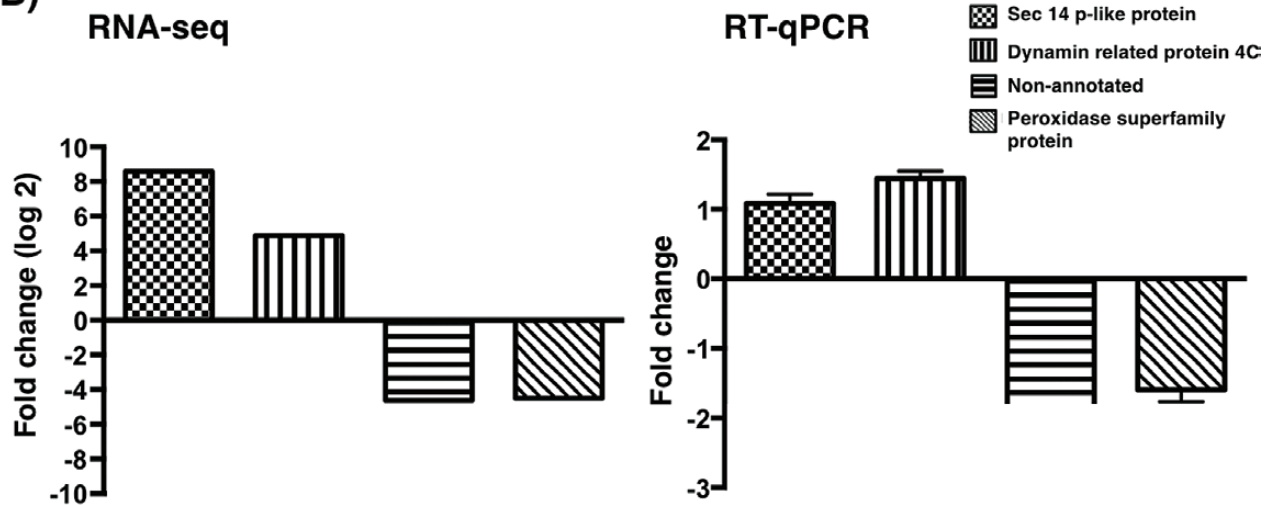


Fig. 8. Genome-wide analysis of genes affected by inhibition of miR1514a. RNA-seq data was obtained from transgenic *hairy roots* carrying the STTM-1514a construct, OE-1514a, or the empty vector. (A) Gene ontology (GO) categories of mRNAs showing differential expression in roots carrying the miR1514a inhibition construct. (B) Comparison between RNA-seq data and RT-qPCR of selected genes with significant changes in miR1514a inhibition in *hairy roots*. (This figure is available in colour at *JXB* online.)

In comparison, phasiRNAs have not been widely studied with the exception of a few crop plants, such as rice, maize, and soybean (Johnson *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2012; Arikrit *et al.*, 2014). In general, identification of phasiRNA loci has employed algorithms in genome-wide analyses (Chen *et al.*, 2007; Howell *et al.*, 2007), including *Phaseolus* (Formey *et al.*, 2015). In *G. max* miR1514a targets a NAC TF mRNA, subsequently triggering production of phasiRNAs (Arikrit *et al.*, 2014). Likewise, in common bean we observed in sRNA-seq datasets that the NAC 700 locus is a source of phasiRNAs, consistent with its processing by miR1514a. Moreover, when the activity of miR1514a was modulated in transgenic *hairy roots* or during water deficit conditions, the accumulation of NAC 700-derived phasiRNAs was also affected, indicating that production of phasiRNAs triggered by the action of the 22-nt-long miR1514a on a NAC TF transcript is conserved in *P. vulgaris*, and possibly other legumes as well.

The role of miR1514a during water deficit responses

The activity of miR1514a on the transcript of NAC 700 has two outcomes. Firstly, it reduces the levels of the NAC 700 transcription factor, thus affecting downstream gene expression; secondly, miR1514a action results in phasiRNA production, in particular phasiRNA1, which could have its own

regulatory roles, including amplification of the response initiated by miR1514a. Either one or both outcomes could be directly involved in stress responses and we will discuss them next (Fig. 9).

NAC-derived phasiRNAs could target other transcripts for cleavage in trans

NAC-derived phasiRNAs may have two alternative outcomes: (1) phasiRNAs may target other transcripts *in trans*, or (2) phasiRNAs may not be functional (shown as 3.a and 3.b, or 4, in Fig. 9). Remarkably, the sequence of NAC 700-derived phasiRNA1 is conserved in different common bean NAC TF transcripts and is present in related NAC TF genes from other legume species (see Supplementary Fig. S8), suggesting that it is functional, although conservation due to other factors, including NAC 700 mRNA amino acid coding capacity, can not be ruled out. Our results can be compared to miR390, which directs the processing of *TAS3* in different plant species to generate phasiRNAs where only a subset of these, known as tasiARFs, are conserved and regulate the transcripts of ARF2, ARF3/ETT, and ARF4 *in trans* (Axtell *et al.*, 2006; Fei *et al.*, 2013), suggesting that phasiRNA1 acts as a tasiRNA. Accordingly, we found that phasiRNA1 is recruited into AGO1 complexes under water deficit conditions in adult plant roots; hence, together with

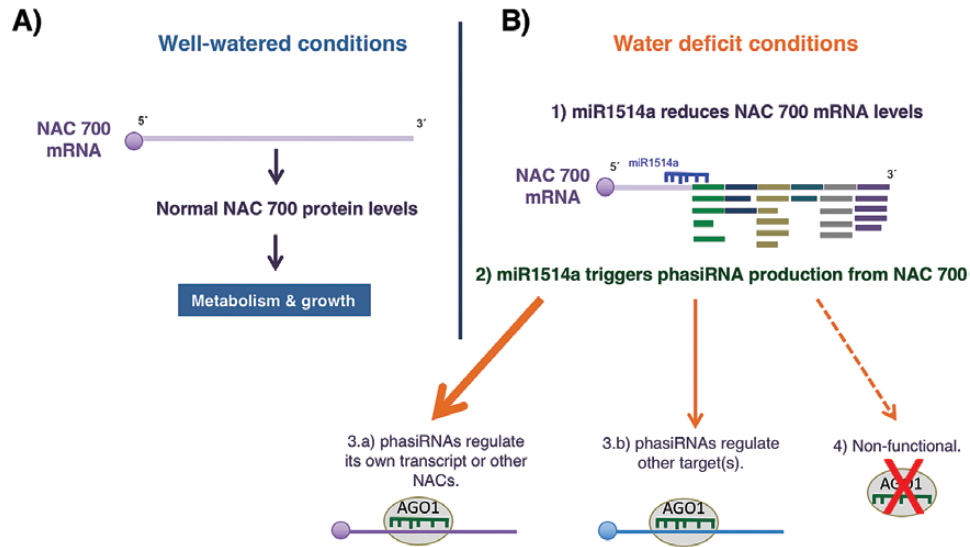


Fig. 9. miR1514a amplifies RNA silencing by phasiRNA production through the cleavage of NAC 700 transcript during drought stress. This model summarizes our results. Under non-stress conditions, NAC 700 TF regulates downstream gene expression to contribute to normal metabolism and growth (A). Upon water limitation (B), miR1514a is induced and targets NAC 700 transcript for cleavage (1) and phasiRNA production (2). Some phasiRNAs may have their own regulatory targets such as NAC 700 and/or other NAC homologous transcripts, as discussed in the text (3.a) or other unrelated mRNAs (3.b). Alternatively, they may be non-functional (4).

its conservation, this result suggests that phasiRNA1 acts *in trans* and might target a mRNA to perform a particular function in the Fabaceae family. The phasiRNA1 contains a G at the 5'-end, which differs from the U preference known for AGO1 (Mi *et al.*, 2008), although other conserved miRNAs such as miR172 also contain a G at the 5'-end, indicating that this is not an absolute prerequisite for association with AGO1. However, in the transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* with reduced miR1514a activity we found no changes in potential transcripts regulated by phasiRNAs. In contrast, the levels of other related NAC TF mRNAs were altered, suggesting that phasiRNAs and/or miR1514a are directly involved in their modulation *in trans* (shown as a thick arrow in 3.a in Fig. 9). The potential activity of NAC-derived phasiRNAs on NAC transcripts could be indicating a new tasiRNA activity on their own transcripts, a hypothesis that remains to be tested.

Potential regulatory targets of the NAC 700 transcription factor

To evaluate the molecular consequences of miR1514a activity, we performed a transcriptome analysis of transgenic *hairy roots* focusing on the transcription factor NAC 700. From the differentially expressed genes we determined enriched GO terms indicating that genes related to metabolism, biogenesis, morphogenesis, and responses to stress were affected when we modulated miR1514a abundance. In *A. thaliana* several NAC TFs have been associated with drought-stress, including NAC016, NAC019, NAP, NAC053/NTL4, NAC055, NAC072, and NAC096 (Tran *et al.*, 2004; Lee and Park, 2012; Zhang and Gan, 2012; Xu *et al.*, 2013), indicating the relevance of this TF family in stress responses. The differentially expressed genes obtained by RNA-seq analyses could be a direct consequence of NAC 700 TF activity. If so, the regulatory regions of these genes might contain common

sequence motifs, potentially representing a NAC 700 binding site. However, we failed to uncover any significant sequence motifs, probably due to the presence of direct and indirect gene expression changes occurring in the transgenic *hairy roots*.

Finally, among the differentially expressed genes defined by the RNA-seq of transgenic *hairy roots* we identified a homolog of Sec14p (Phvul.006G137200, Fig. 8B), a protein initially defined as involved in vesicle trafficking in yeast (Bankaitis *et al.*, 1989). This mRNA was also differentially accumulated in response to water deficit in the roots of drought-resistant PS plants but not in the drought-sensitive BM plant roots (data not shown). This finding suggests that it is possible to identify gene expression changes related to miR1514a regulation that are reflected in gene expression changes caused by water deficit in PS and BM cultivars. It remains to be determined if other genes that were not considered in this analysis could also be affected by NAC 700 accumulation levels and water deficit conditions.

Conclusions

Taken together, the results presented here illustrate the participation of the miR1514a regulatory module during water deficit conditions in *P. vulgaris*. It is possible that common bean and other legumes may have particular strategies for gene regulation based on other miRNAs and phasiRNA products to regulate stress responses. The recent description of the common bean genome (Schmutz *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2016) will provide invaluable knowledge for future PTGS studies. In addition, the different molecular participants in the miR1514a pathway could be used to guide crop improvement programs directed at the generation of new and more resistant cultivars of common bean and other legumes.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online

Figure S1. Pre-miR1514a is present in the common bean variety Pinto Saltillo.

Figure S2. Accumulation levels of miR1514a in hypocotyls and roots of common bean under different abiotic stresses.

Figure S3. miR1514a levels in hypocotyls of the Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars during water deficit.

Figure S4. miR1514a levels in leaves of adult plants of Pinto Saltillo and Bayo Madero cultivars during water deficit.

Figure S5. Some NAC-derived phasiRNAs in roots from adult plants have different levels during a drought time-course experiment.

Figure S6. Expression levels of RNA-seq control genes.

Figure S7. NAC-derived phasiRNA predicted targets are not affected in RNA-seq data.

Figure S8. PhasiRNA1 is conserved in common bean and others legumes.

Table S1. Probability of generating phasiRNAs for NAC genes.

Table S2. phasiRNAs reads derived from NAC 700 in two independent sRNA-seq experiments.

Table S3. Differential gene expression in STTM-1514a transgenic hairy roots.

Table S4. NAC-derived phasiRNA targets predicted by psRNATarget.

Table S5. Primers used in this study.

Acknowledgements

Guadalupe Sosa-Valencia is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a fellowship (239786) from CONACYT. We are grateful to MS David Rendón for his assistance in data analysis, to Biol. David Garcías for help with RT-qPCRs; Dr Cecilia Contreras-Cubas for her contribution to the characterization of the AGO1 antibody and to Lic Rosa María Solórzano for technical support received during this project. We are grateful to MS Luis Delgadillo, Dr Catalina Arenas-Huertero, Dr Oswaldo Valdés-López, and members of our research group for valuable comments and discussions related to this work. Our research was partially supported by grants from DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN-205115, IN-205015) and CONACYT (151571) to JLR.

References

- Acosta-Gallegos J, Acosta E, Padilla S, Goytia MA, Rosales R, López E.** 1999. Mejoramiento de la resistencia a la sequía en frijol común en México. *Agronomía Mesoamericana* **10**, 83–90.
- Arenas-Huertero C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2009. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology* **70**, 385–401.
- Arif MA, Fattash I, Ma Z, Cho SH, Beike AK, Reski R, Axtell MJ, Frank W.** 2012. DICER-LIKE3 activity in *Physcomitrella patens* DICER-LIKE4 mutants causes severe developmental dysfunction and sterility. *Molecular Plant* **5**, 1281–1294.
- Arikit S, Xia R, Kakrana A, et al.** 2014. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell* **26**, 4584–4601.
- Axtell MJ, Jan C, Rajagopalan R, Bartel DP.** 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* **127**, 565–577.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS.** 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* **37**, W202–W208.
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R.** 1989. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *Journal of Cell Biology*, **108**, 1271–1281.
- Borges A, Tsai SM, Caldas DG.** 2012. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **31**, 827–838.
- Borges F, Martienssen RA.** 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 727–741.
- Bray EA.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**, 48–54.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J.** 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55–128.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. eds. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J.** 2008. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant Journal* **53**, 739–749.
- Castro-Guerrero NA, Isidra-Arellano MC, Mendoza-Cozatl DG, Valdes-Lopez O.** 2016. Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc and phosphate deficiencies. *Frontiers in Plant Science* **7**, 600.
- Chen HM, Li YH, Wu SH.** 2007. Bioinformatic prediction and experimental validation of a microRNA-directed tandem trans-acting siRNA cascade in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 3318–3323.
- Contreras-Cubas C, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2013. Determining abundance of microRNAs and other small RNAs in legumes. *Methods in Molecular Biology* **1069**, 81–92.
- Contreras-Cubas C, Rabanal FA, Arenas-Huertero C, Ortiz MA, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2012. The *Phaseolus vulgaris* miR159a precursor encodes a second differentially expressed microRNA. *Plant Molecular Biology* **80**, 103–115.
- Covarrubias AA, Reyes JL.** 2010. Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant Cell Environment* **33**, 481–489.
- Cuellar-Ortiz SM, Arrieta-Montiel MDLP, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA.** 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. *Plant Cell & Environment* **31**, 1399–1409.
- Dai X, Zhao PX.** 2011. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research* **39**, W155–W159.
- Doyle JJ, Luckow MA.** 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**, 900–910.
- Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares JE, Guillen G, Diaz-Camino C, Campos F, Quinto C, Gresshoff PM, Sanchez F.** 2007. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols* **2**, 1819–1824.
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, et al.** 2007. High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* **2**, e219.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC.** 2013. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* **25**, 2400–2415.
- Formey D, Iniguez LP, Pelaez P, Li YF, Sunkar R, Sanchez F, Reyes JL, Hernandez G.** 2015. Genome-wide identification of the *Phaseolus vulgaris* sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics* **16**, 423.
- Gallegos JAA, Shibata JK.** 1989. Effect of water stress on growth and yield of indeterminate dry-bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. *Field Crops Research* **20**, 81–93.
- Goettl W, Liu Z, Xia J, Zhang W, Zhao PX, An YQ.** 2014. Systems and evolutionary characterization of microRNAs and their underlying regulatory networks in soybean cotyledons. *PLoS ONE* **9**, e86153.
- González G, Mendoza FM, Covarrubias J, Morán N, Acosta-Gallegos JA.** 2008. Yield and seed quality of common bean grown in two planting dates at the Bajío region. *Agricultura Técnica México* **34**, 421–430.

- Goodstein DM, Shu S, Howson R, et al.** 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40**, D1178–D1186.
- Graham PH, Vance CP.** 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131**, 872–877.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, et al.** 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**, 1494–1512.
- Hayashi S, Ishii T, Matsunaga T, Tominaga R, Kuromori T, Wada T, Shinozaki K, Hirayama T.** 2008. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization. *Plant & Cell Physiology* **49**, 1522–1535.
- Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, Kasschau KD, Carrington JC.** 2007. Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926–942.
- Jeong DH, Park S, Zhai J, Gurazada SG, De Paoli E, Meyers BC, Green PJ.** 2011. Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *Plant Cell* **23**, 4185–4207.
- Johnson C, Kasprzewska A, Tennesen K, Fernandes J, Nan GL, Walbot V, Sundaresan V, Vance V, Bowman LH.** 2009. Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Research* **19**, 1429–1440.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B.** 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 19–53.
- Kline KG, Sussman MR, Jones AM.** 2010. Abscisic acid receptors. *Plant Physiology* **154**, 479–482.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* **10**, R25.
- Lee S, Park CM.** 2012. Regulation of reactive oxygen species generation under drought conditions in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 599–601.
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W.** 2012. Identification of soybean microRNAs involved in soybean cyst nematode infection by deep sequencing. *PLoS ONE* **7**, e39650.
- Lin SI, Chiang SF, Lin WY, Chen JW, Tseng CY, Wu PC, Chiou TJ.** 2008. Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiology* **147**, 732–746.
- Mallory AC, Vaucheret H.** 2006. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* **38**, S31–S36.
- Megraw M, Cumbie JS, Ivanchenko MG, Filichkin SA.** 2016. Small genetic circuits and microRNAs: big players in polymerase II transcriptional control in plants. *Plant Cell* **28**, 286–303.
- Mi S, Cai T, Hu Y, et al.** 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116–127.
- Miklas PN, Kelly JD, Beebe SE, Blair MW.** 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica* **147**, 105–131.
- Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC.** 2006. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Research* **34**, D731–D735.
- Naya L, Paul S, Valdes-Lopez O, Mendoza-Soto AB, Nova-Franco B, Sosa-Valencia G, Reyes JL, Hernandez G.** 2014. Regulation of copper homeostasis and biotic interactions by microRNA 398b in common bean. *PLoS ONE* **9**, e84416.
- Nova-Franco B, Iniguez LP, Valdes-Lopez O, et al.** 2015. The microRNA172c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean–*Rhizobium etli* nitrogen fixation symbiosis. *Plant Physiology* **168**, 273–291.
- Oliver MJ, Cushman JC, Koster KL.** 2010. Dehydration tolerance in plants. *Methods in Molecular Biology* **639**, 3–24.
- Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K.** 2005. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in Plant Sciences* **10**, 79–87.
- Osella M, Bosia C, Cora D, Caselle M.** 2011. The role of incoherent microRNA-mediated feedforward loops in noise buffering. *PLoS Computational Biology* **7**, e1001101.
- Padilla-Ramirez JS, Osuna-Ceja ES, Acosta-Diaz E, Acosta-Gallegos JA.** 2007. Indicators of dry bean performance under rainfed conditions at the highlands of Mexico. *Bean Improvement Cooperative Annual Report* **50**, 161–162.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible WR.** 2008. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant Journal* **53**, 731–738.
- Pelaez P, Trejo MS, Iniguez LP, Estrada-Navarrete G, Covarrubias AA, Reyes JL, Sanchez F.** 2012. Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics* **13**, 83.
- Roberts A, Pachter L.** 2013. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nature Methods* **10**, 71–73.
- Rosales MA, Ocampo E, Rodriguez-Valentin R, Olvera-Carrillo Y, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA.** 2012. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* **56**, 24–34.
- Rosales-Serna R, Kohashi-Shibata J, Acosta-Gallegos JA, Trejo-López C, Ortiz-Cereceres J, Kelly JD.** 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field Crops Research* **83**, 203–211.
- Sanchez-Valdez I, Acosta-Gallegos JA, Ibarra-Perez FJ, Rosales-Serna R, Singh SP.** 2004. Registration of 'Pinto Saltillo' common bean. *Crop Science* **44**, 1865–1866.
- Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, et al.** 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* **46**, 707–713.
- Song QX, Liu YF, Hu XY, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Zhang JS.** 2011. Identification of miRNAs and their target genes in developing soybean seeds by deep sequencing. *BMC Plant Biology* **11**, 5.
- Song X, Li P, Zhai J, et al.** 2012. Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *Plant Journal* **69**, 462–474.
- Sosa-Valencia G, Covarrubias AA, Reyes JL.** 2013. Signaling by microRNAs in response to abiotic stress. In: Sarwat M, Ahmad A, Abdin MZ, eds. *Stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective*. New York: Springer, 51–67.
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu JK, Yu O.** 2008. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* **9**, 160.
- Sunkar R.** 2010. MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **21**, 805–811.
- Terán H, Singh SP.** 2002. Comparison of sources and lines selected for drought resistance in common bean. *Crop Science* **42**, 64–70.
- Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell* **16**, 2481–2498.
- Valdes-Lopez O, Arenas-Huertero C, Ramirez M, Girard L, Sanchez F, Vance CP, Luis Reyes J, Hernandez G.** 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA: PvmiR399 in phosphorus-deficiency signalling in common bean roots. *Plant Cell & Environment* **31**, 1834–1843.
- Valdes-Lopez O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, Graham PH, Reyes JL, Vance CP, Hernandez G.** 2010. MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist* **187**, 805–818.
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP.** 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **3**, 12.
- Vazquez F, Vaucheret H, Rajagopalan R, Lepers C, Gascioli V, Mallory AC, Hilbert JL, Bartel DP, Crete P.** 2004. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular Cell* **16**, 69–79.
- Vlasova A, Capella-Gutierrez S, Rendon-Anaya M, et al.** 2016. Genome and transcriptome analysis of the Mesoamerican common bean and the role of gene duplications in establishing tissue and temporal specialization of genes. *Genome Biology* **17**, 32.
- Voinnet O.** 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**, 669–687.

Xia R, Meyers BC, Liu Z, Beers EP, Ye S. 2013. MicroRNA superfamilies descended from miR390 and their roles in secondary small interfering RNA biogenesis in eudicots. *Plant Cell* **25**, 1555–1572.

Xia R, Zhu H, An YQ, Beers EP, Liu Z. 2012. Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biology* **13**, R47.

Xu ZY, Kim SY, Hyeon do Y, et al. 2013. The Arabidopsis NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell* **25**, 4708–4724.

Yan J, Gu Y, Jia X, Kang W, Pan S, Tang X, Chen X, Tang G. 2012. Effective small RNA destruction by the expression of a short tandem target mimic in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 415–427.

Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, et al. 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & Development* **25**, 2540–2553.

Zhang K, Gan SS. 2012. An abscisic acid-AtNAP transcription factor-SAG113 protein phosphatase 2C regulatory chain for controlling dehydration in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **158**, 961–969.

Zheng Y, Wang Y, Wu J, Ding B, Fei Z. 2015. A dynamic evolutionary and functional landscape of plant phased small interfering RNAs. *BMC Biology* **13**, 32.

Zhu H, Xia R, Zhao B, An YQ, Dardick CD, Callahan AM, Liu Z. 2012. Unique expression, processing regulation, and regulatory network of peach (*Prunus persica*) miRNAs. *BMC Plant Biology* **12**, 149.

Anexo 2. Artículo 2 como primer autor.



ISSN: (Print) 1559-2324 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kpsb20>

Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes

Guadalupe Sosa-Valencia, Paulette S. Romero-Pérez, V. Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias & José L. Reyes

To cite this article: Guadalupe Sosa-Valencia, Paulette S. Romero-Pérez, V. Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias & José L. Reyes (2017) Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes, *Plant Signaling & Behavior*, 12:3, e1284724, DOI: [10.1080/15592324.2017.1284724](https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1284724)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2017.1284724>



Accepted author version posted online: 02 Feb 2017.
Published online: 02 Feb 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 128




View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

SHORT COMMUNICATION

Insights into the function of the phasiRNA-triggering miR1514 in response to stress in legumes

Guadalupe Sosa-Valencia, Paulette S. Romero-Pérez, V. Miguel Palomar, Alejandra A. Covarrubias, and José L. Reyes 

Departamento de Biología Molecular De Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Col. Chamilpa, Cuernavaca, México

ABSTRACT

We recently described the activity of miR1514a in response to water deficit in *Phaseolus vulgaris*. Pv-miR1514a targets a NAC transcription factor mRNA for cleavage and subsequently triggers NAC-derived phasiRNA formation. Here we show that accumulation and activity of miR1514a are also conserved in the model legume *Medicago truncatula*. Consistently, we identified Mtr-miR1514a and detected its increased accumulation in response to stress conditions, targeting a NAC TF mRNA for cleavage and triggering phasiRNA production. In *P. vulgaris*, miR1514a inhibition in transgenic hairy roots was reported to increase NAC 700 mRNA levels and to affect expression patterns of several genes, including that of a Sec 14 homolog. We report here that in adult plant roots exposed to dehydration conditions, where miR1514a levels increased and NAC 700 mRNA decreased, there was a reduction of Sec 14 homolog mRNA levels, suggesting a direct transcriptional effect. The functions of miR1514a, NAC 700 and derived phasiRNAs have just begun to be elucidated in common bean; future understanding of their activities in this and other legumes species will advance our knowledge of microRNA functions in plants.

ARTICLE HISTORY

Received 15 December 2016
Revised 12 January 2017
Accepted 13 January 2017

KEYWORDS

Dehydration; *Glycine max*;
Medicago truncatula;
microRNAs; phased siRNAs;
Phaseolus vulgaris;
Sec 14-like

MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules of 21–22 nts in length that are known to regulate the expression of target mRNAs by complementary base-pairing, causing transcript degradation or inhibition of translation.¹ In plants miRNAs participate in several cellular processes, including development, hormone signaling and stress responses.^{2,3}

Recently, we described the response of miR1514a when *Phaseolus vulgaris* (common bean) seedling or adult plant roots were exposed to water limiting conditions.⁴ We further showed that this microRNA causes recognition and cleavage of an mRNA (Phvul.010 g120700, hereafter named NAC 700 mRNA) encoding for a member of the NAM-ATAF1,2-CUC2 family of transcription factors. Interestingly, upon cleavage the resulting 3'-end fragment is recruited for subsequent production of phased siRNAs or phasiRNAs.⁵ Furthermore, our work suggested that the resulting small RNAs could have a functional role and we proposed that at least one phasiRNA modulates the abundance of its transcript of origin, NAC 700 mRNA, or other related transcripts with sequence homology in *P. vulgaris*. Potentially, this mechanism could be preserved in other legumes as well (see our working model further ahead).

As of now, the expression of miR1514a has been reported in common bean and in *Glycine max*.^{6,7}; however, previous studies have not identified a homolog of miR1514a in other legumes, such as *Medicago truncatula*. Our own initial screening using northern blot analyses did not reveal miR1514a expression in *M. truncatula*.⁷ Nevertheless, a closer inspection of the *M. truncatula* genome revealed a transcribed region in

chromosome 4 containing a sequence with similarity to soybean and common bean miR1514a (Chr. 4, pos. 48984796–48985620, <http://medicago.jcvi.org> and Fig. 1A). The secondary structure prediction for this sequence showed a hairpin structure, consistent with its identity as a miRNA precursor transcript (Fig. 1B), and available sRNA-seq data revealed the presence of the mature small RNA corresponding to miR1514a in different *M. truncatula* tissues.⁸ Furthermore, when 1-day-old *M. truncatula* seedlings were exposed to 150 mM NaCl, accumulation of Mtr-miR1514a increased after 12 h of treatment, and at later time points its accumulation returned to initial levels, as determined by RT-qPCR of the mature miRNA (Fig. 1C). This result indicates that, similar to what is observed in common bean, miR1514a responds to water deficit conditions in *M. truncatula*. The response observed in the early time points explored in both plant models could indicate that miR1514a activity is necessary early in the water deficit response process to be later replaced by other mechanisms.

Prediction of Mtr-miR1514a targets using the psRNA-Target server and the *M. truncatula* whole genome revealed as best target candidate the gene Medtr8g023860 (51.6% similarity with *P. vulgaris* NAC 700 protein), encoding a NAC transcription factor (base-pairing to miR1514a is shown in Fig. 1A). Previous analyses performed to identify microRNA targets in *M. truncatula* did not address those for miR1514a, as it has not been annotated in *M. truncatula*. However, we determined that Medtr8g023860 transcript is targeted for cleavage and has a significant score to

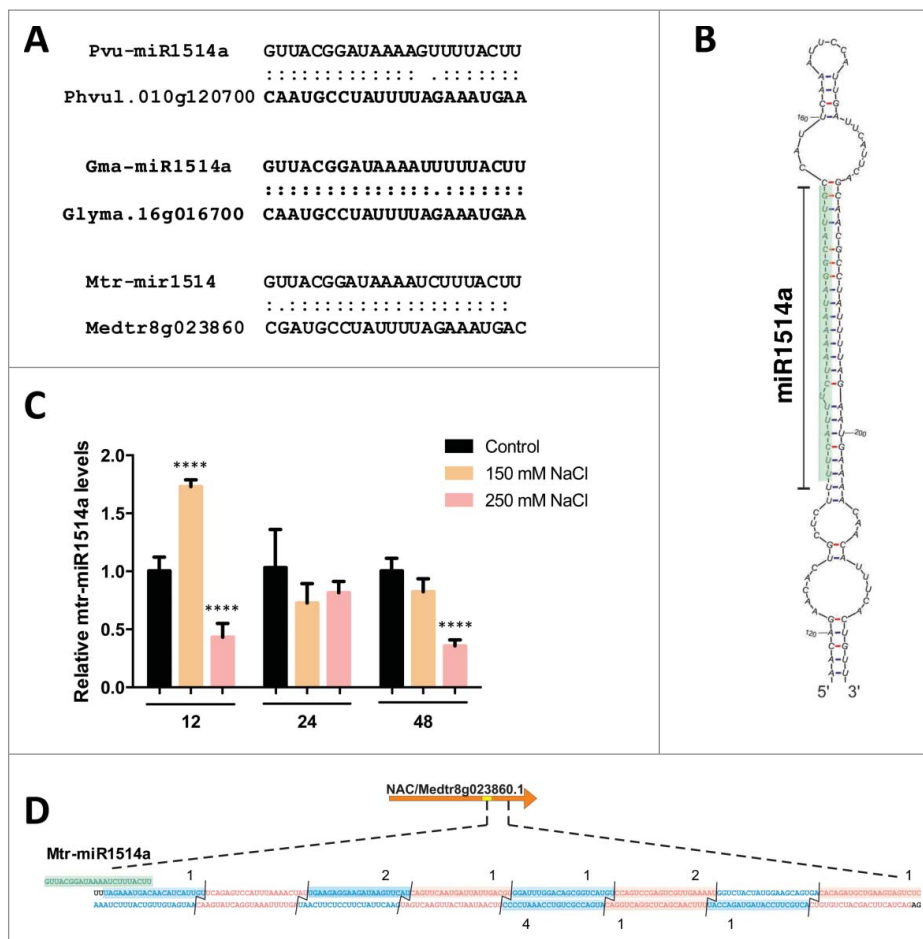


Figure 1. *Medicago truncatula* miR1514a targets a NAC TF mRNA and triggers phasiRNA formation (A) Sequence comparison between Pvu-miR1514a, Gma-miR1514a and Mtr-miR1514a, including base-pairing to target region in corresponding target mRNAs. (B) The secondary structure of Mtr-pre-miR1514a was predicted with mFold,¹³ the position of the mature miRNA is shown in green and indicated with a bracket. (C) One-day old *M. truncatula* seedlings were subjected to two NaCl concentrations (150 or 250 mM) for the indicated times, and the relative accumulation for the mature Mtr-miR1514a in total RNA samples was determined by stem-loop RT-qPCR,¹⁴ using U6 snRNA as reference gene. Three biologic replicates were analyzed with 3 technical replicates for each sample. Asterisks indicate a significant difference when compared with control conditions, as determined by Two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test (**** $P < 0.0001$). (D) Base-pairing between Mtr-miR1514a (green) and its target Medtr.8 g023860 at the site of cleavage as defined by PARE analysis (vertical arrow⁸). PhasiRNAs with evidence of expression are indicated by red and blue highlighted boxes at the relevant sequence in Medtr.8 g023860 downstream of the miRNA cleavage site.⁸ Numbers above the highlighted sequences indicate average reads per million considering different sRNA-seq data sets where reads were present.

produce phasiRNAs upon miR1514a processing (Fig. 1D), based on available sRNA-seq and PARE-analysis data sets.⁸ Together, these results indicate that miR1514a is also expressed in *M. truncatula*, and moreover it is induced by stress in seedlings, targeting a NAC TF mRNA homologous to those present in soybean and common bean, to subsequently produce phasiRNAs.⁹

To explore a possible contribution of the miR1514a:NAC mRNA regulatory module to the tolerance to water deficit in legumes, we compared the accumulation levels of the microRNA, the NAC 700 transcript and one particular phasiRNA in two common bean cultivars with well-characterized contrasting terminal drought resistance. The drought-resistant Pinto Saltillo adult roots (PS) but not Mayo Madero (BM, drought sensitive) showed increased accumulation of miR1514a, and corresponding changes in NAC 700 mRNA and phasiRNAs,⁴ suggesting that miR1514a and NAC 700 activities are related to the different drought resistance phenotypes analyzed. Still, further understanding about their individual contributions is needed to show a cause-effect relationship.

Interested in the role of miR1514a as a regulator of gene expression, we used the *P. vulgaris* transgenic *hairy roots* system generated by *Agrobacterium rhizogenes*. We first inhibited the miR1514a activity in transgenic *hairy roots* and explored the effects on gene expression at the transcriptome level.⁴ Among the transcripts that showed differential accumulation, we identified a Sec 14p-like homolog (Phvu1.006G137200). This mRNA increased when miR1514a activity was inhibited using a short tandem target mimicry strategy with a consequent NAC 700 mRNA increase (see Fig. 8 in ref. 4). Interestingly, accumulation of the Sec 14p-like homolog was also reduced upon dehydration treatment in PS roots (Fig. 2A), when miR1514a accumulation increased and NAC 700 mRNA was reduced (previously shown in Fig. 1C and Fig. 3A in ref. 4). This accumulation pattern contrasted with that found in the drought-sensitive BM cultivar, where the accumulation of Sec 14p-like mRNA in adult roots did not change in response to dehydration (Fig. 2A). Sec 14 proteins were initially identified as part of the machinery necessary for vesicle trafficking in budding yeast,^{10, 11} and a soybean Sec 14 homolog is phosphorylated

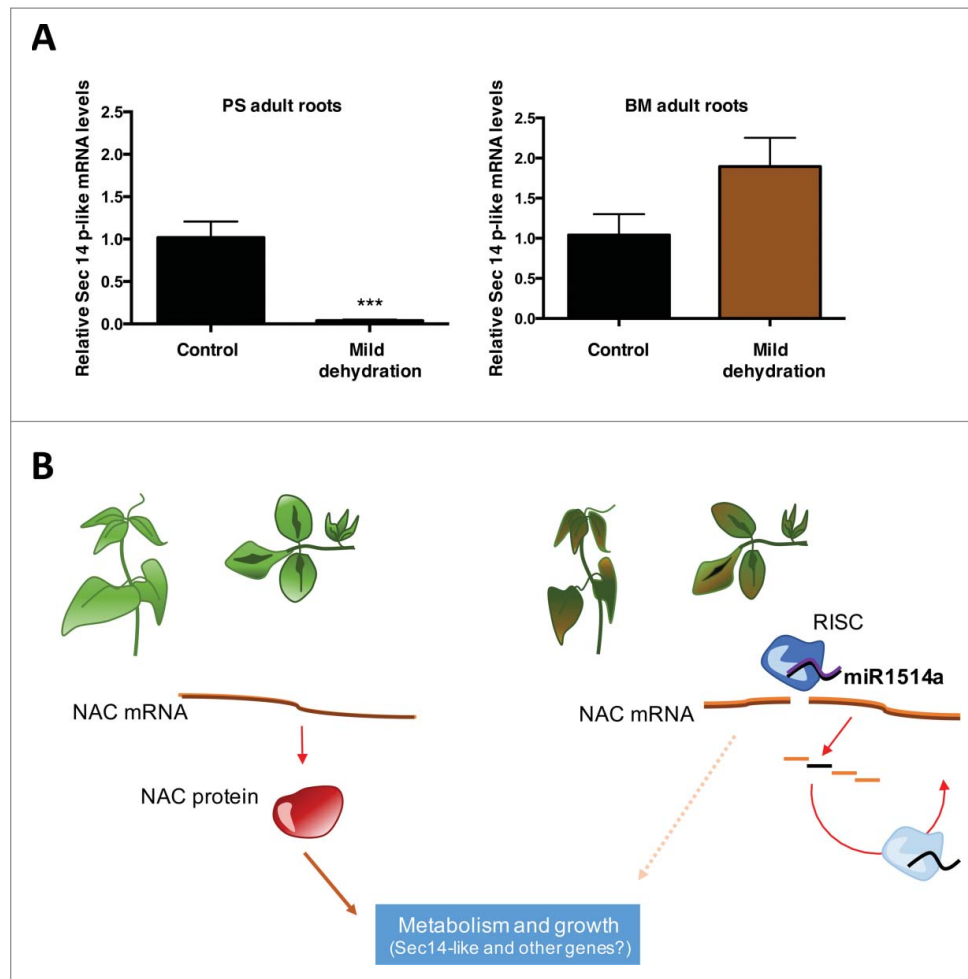


Figure 2. Model for miR1514a functions in legumes. (A) Sec 14p-like (Phvul.006G137200) mRNA levels are reduced in PS but not in BM adult plant roots upon water deficit. Adult plants (29 d) were subjected to normal watering or mild dehydration (irrigation to 1/2 field capacity for 13 d¹⁵). Expression of Sec 14p-like mRNA was normalized to the levels of the reference Skp16 mRNA.¹⁶ Asterisks indicate a significant difference compared with control conditions, as determined by multiple paired Student's t test (***) $P < 0.001$, $n = 3$. (B) Under normal growth conditions, NAC 700 TF regulates processes related to normal growth and metabolism, perhaps including a Sec 14-like homolog. In response to stress conditions, miR1514a down-regulates a NAC TF and triggers phasiRNA formation in legumes.

in response to hyperosmotic stress.¹² It remains to be determined if expression of other genes responding to changes in NAC 700 mRNA accumulation in transgenic *hairy roots* also respond in plants subjected to water deficit. Nonetheless, this finding suggests that it is possible to uncover gene expression changes related to altered miR1514a regulation that are also reflected across cultivars with known water deficit responsiveness. However, to directly address whether the responsiveness of miR1514a to water deficit can be directly related to drought sensitivity in different *P. vulgaris* cultivars it would be necessary to determine its expression levels in a much larger set of common bean genotypes with known drought tolerance.

This work complements our recent findings demonstrating that miR1514a triggers phasiRNA formation contributing in this way to the modulation of *P. vulgaris* water deficit response. The role of miR1514a through regulation of NAC 700 TF mRNA may include downstream genes, such as a Sec 14-like protein, which might be also involved in responses to water deficit in common bean cultivars with different degrees of drought resistance and in a wider number of legume

species. The functions of miR1514a and NAC mRNA-derived phasiRNAs in legumes have only begun to be elucidated (Fig. 2B). Their characterization will broaden our understanding of their activities in plants and furthermore, suggests that individual factors could be used to define molecular markers valuable for selecting stress-resistant varieties of common bean and possibly other legumes as well.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Guadalupe Sosa-Valencia and Miguel Palomar are doctoral students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and received a fellowship from CONACyT. Paulette S. Romero-Pérez is a doctoral student from the Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México and receives a fellowship from CONACyT. We are grateful to RM Solórzano for technical support received during this work.

Funding

Research in our group is partially supported by grants from DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN-205015) and CONACYT (151571) to JLR.

ORCID

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

References

- Borges F, Martienssen RA. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:727-41; PMID:26530390; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4085>
- Rogers K, Chen X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *Plant Cell* 2013; 25:2383-99; PMID:23881412; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.113159>
- Shriram V, Kumar V, Devarumath RM, Khare TS, Wani SH. MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Front Plant Sci* 2016; 7:817; PMID:27379117; <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00817>
- Sosa-Valencia G, Palomar M, Covarrubias AA, Reyes JL. The Legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *J Exp Botany* 2016; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erw380>.
- Fei Q, Xia R, Meyers BC. Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 2013; 25:2400-15; PMID:23881411; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Subramanian S, Fu Y, Sunkar R, Barbazuk WB, Zhu JK, Yu O. Novel and nodulation-regulated microRNAs in soybean roots. *BMC Genomics* 2008; 9:160; PMID:18402695; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-160>
- Arenas-Huerta C, Perez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL. Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol* 2009; 70:385-401; PMID:19353277; <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-009-9480-3>
- Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, Tej SS, Skogen JW, Meyers BC. Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:D731-5; PMID:16381968; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj077>
- Arikiti S, Xia R, Kakrana A, Huang K, Zhai J, Yan Z, Valdés-López O, Prince S, Musket TA, Nguyen HT, et al. An atlas of soybean small RNAs identifies phased siRNAs from hundreds of coding genes. *Plant Cell* 2014; 26:4584-601; PMID:25465409; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.131847>
- Bankaitis VA, Malehorn DE, Emr SD, Greene R. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* 1989; 108:1271-81; PMID:2466847; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.108.4.1271>
- Bankaitis VA, Aitken JR, Cleves AE, Dowhan W. An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* 1990; 347:561-2; PMID:2215682; <http://dx.doi.org/10.1038/347561a0>
- Monks DE, Aghoram K, Courtney PD, DeWald DB, Dewey RE. Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 2001; 13:1205-19; PMID:11340192; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.13.5.1205>
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:3406-15; PMID:12824337; <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg595>
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 2007; 3:12; PMID:17931426; <http://dx.doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Rosales MA, Ocampo E, Rodriguez-Valentin R, Olvera-Carrillo Y, Acosta-Gallegos J, Covarrubias AA. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiol Biochem* 2012; 56:24-34; PMID:22579941; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.007>
- Borges A, Tsai SM, Caldas DG. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep* 2012; 31:827-38; PMID:22193338; <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1204-x>

Anexo 3. Lista de transcritos inducidos y reprimidos que presentan una expresión diferencial durante la sobre-expresión de miR1514a.

Expresion diferencial de transcritos en las hairy roots donde se sobre-expresó el nivel de acumulación de miR1514a (pBA-miR1514aTdT).

Tabla: Transcritos inducidos.

ID	Nombre.	LogFC
Phvul.008G103600	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein	3.65228354
Phvul.010G124000	Protein of unknown function (DUF581)	2.8914392
Phvul.001G005800	NA	4.19441553
Phvul.007G198700	Protein phosphatase 2C family protein	2.17283795
Phvul.007G276400	NA	2.20445295
Phvul.002G239300	Granulin repeat cysteine protease family protein	2.986283
Phvul.006G029100	alanine:glyoxylate aminotransferase	3.45954029
Phvul.007G069800	CAP160 protein	4.69955008
Phvul.006G172500	Ankyrin repeat family protein	6.43725489
Phvul.006G172400	Ankyrin repeat family protein	2.28072426
Phvul.011G133400	NA	6.60328889

Expresion diferencial de transcritos en las hairy roots donde se sobre-expresó el nivel de acumulación de miR1514a (pBA-miR1514aTdT).

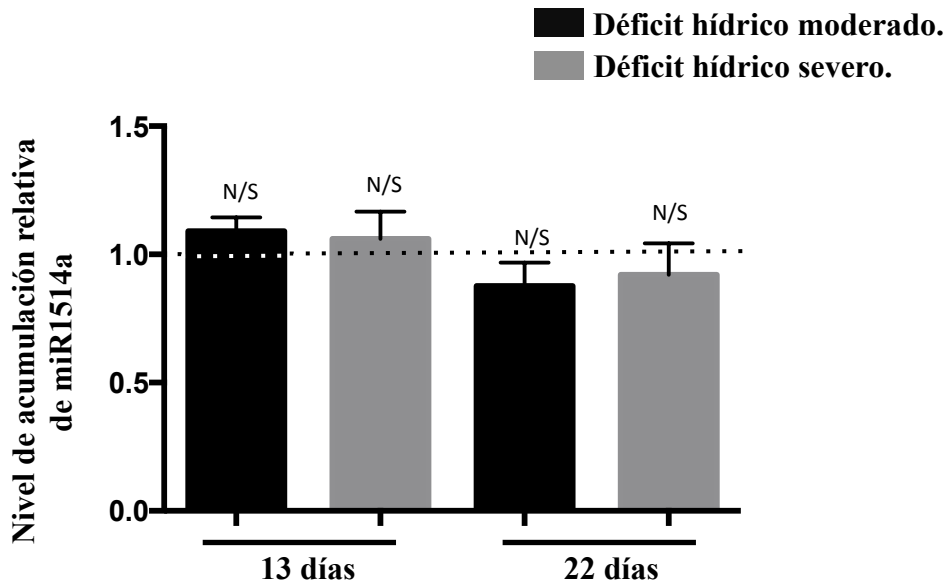
Tabla: Transcritos reprimidos.

ID	Nombre.	LogFC
Phvul.008G062500	RING/U-box superfamily protein	-10.568764
Phvul.009G149500	alcohol dehydrogenase 1	-3.1119916
Phvul.007G026000	cinnamate-4-hydroxylase	-2.4870678
Phvul.011G121000	NA	-2.5178376
Phvul.008G043100	Protein of unknown function (DUF1637)	-2.3891393
Phvul.008G218800	Hypoxia-responsive family protein	-3.6013314
Phvul.003G109500	MLP-like protein 423	-2.0727638
Phvul.009G134700	alcohol dehydrogenase 1	-2.0974617
Phvul.009G088400	NA	-3.1415273
Phvul.008G095400	Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein	-2.1818178
Phvul.004G064700	LOB domain-containing protein 41	-2.1503141
Phvul.010G067200	aspartate aminotransferase 1	-2.9580742
Phvul.002G304200	ACC oxidase 1	-2.3021651
Phvul.007G200700	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein	-2.0897471
Phvul.002G030000	NA	-3.2625696
Phvul.001G233300	ROTUNDIFOLIA like 8	-6.2870787
Phvul.010G162200	NA	-2.6887726

Anexo 4. Lista de transcritos con expresión diferencial durante la inhibición de miR1514a, la cual puede descargarse en la siguiente liga : <https://academic.oup.com/jxb/article/doi/10.1093/jxb/erw380/2627446/The-Legume-miR1514a-modulates-a-NAC-transcription#authorNotesSectionTitle> (ver tablas S3-A y S3-B):

Anexo 5. Lista de las categorías de genes (GO) sobre-representados y reprimidos en la inhibición de la actividad de miR1514a, la cual puede descargarse en la siguiente liga): <https://academic.oup.com/jxb/article/doi/10.1093/jxb/erw380/2627446/The-Legume-miR1514a-modulates-a-NAC-transcription#authorNotesSectionTitle> (ver tablas S3-C Up GO y S3-D Down go

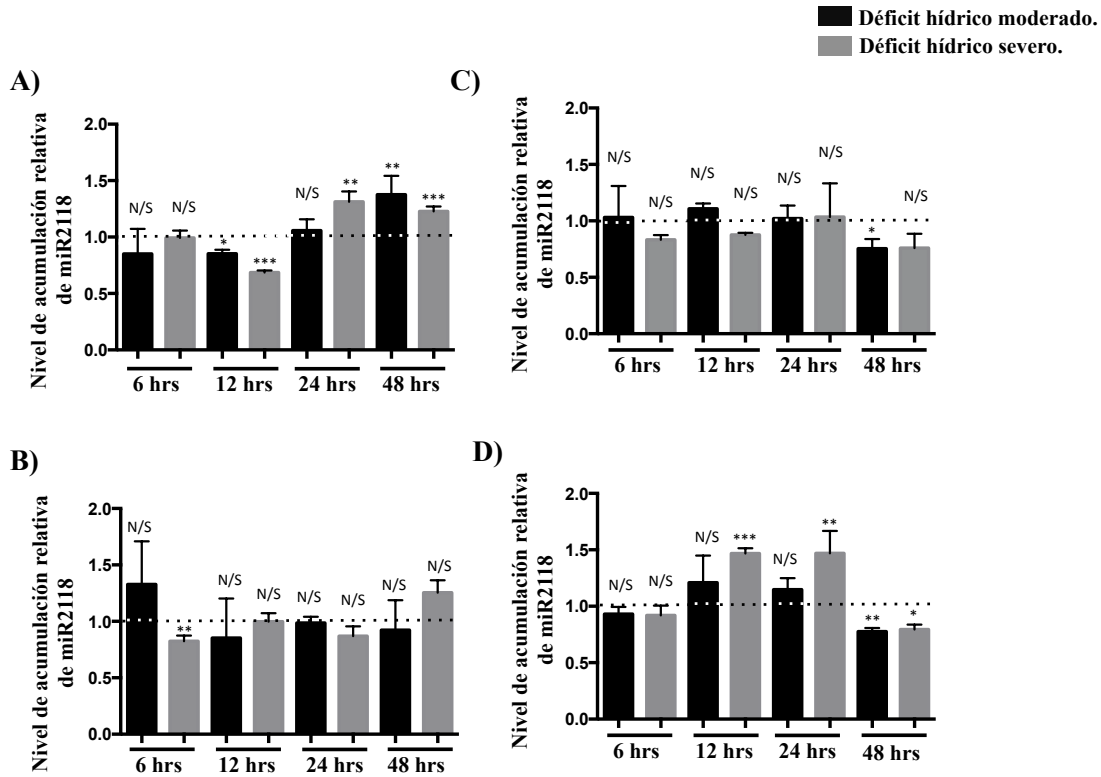
Anexo 6:



Análisis gráfico del northern blot realizado en raíces de Pinto Villa mostrando los niveles de acumulación de miR1514a durante una cinética de déficit hídrico. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR1514a en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR1514a en cada condición, además todos los valores de miR1514a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexos de miR2118:

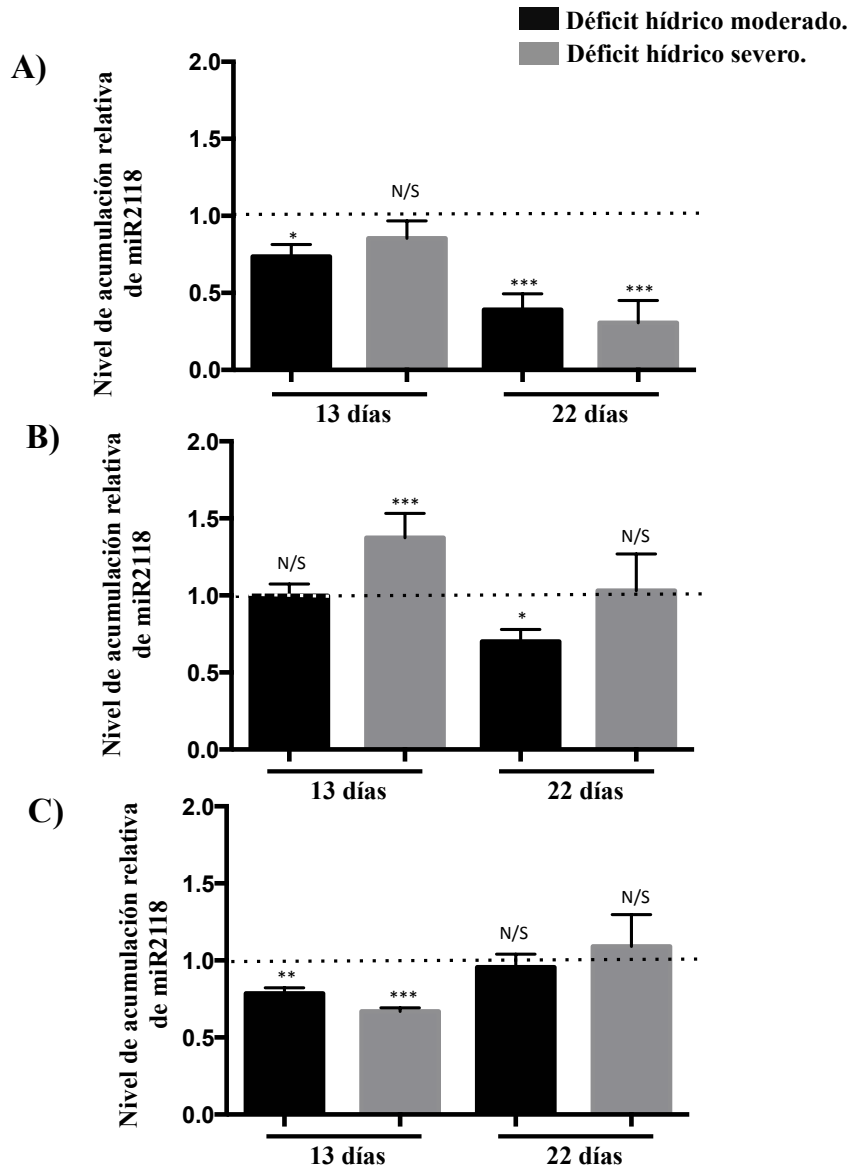
Anexo 7.



El miR2118 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de plántulas e hipocótilos en dos cultivares con diferente resistencia a la deshidratación. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) hipocótilo de PS, B) raíces de plántulas de PS. C) hipocótilo de BM y D) raíces de plántulas de BM. El déficit hídrico moderado representa una irrigación de 1/4 de cc, mientras que para déficit hídrico severo para plántulas de 1/8 de cc (ver materiales y métodos). Las muestras fueron colectadas en las horas indicadas.

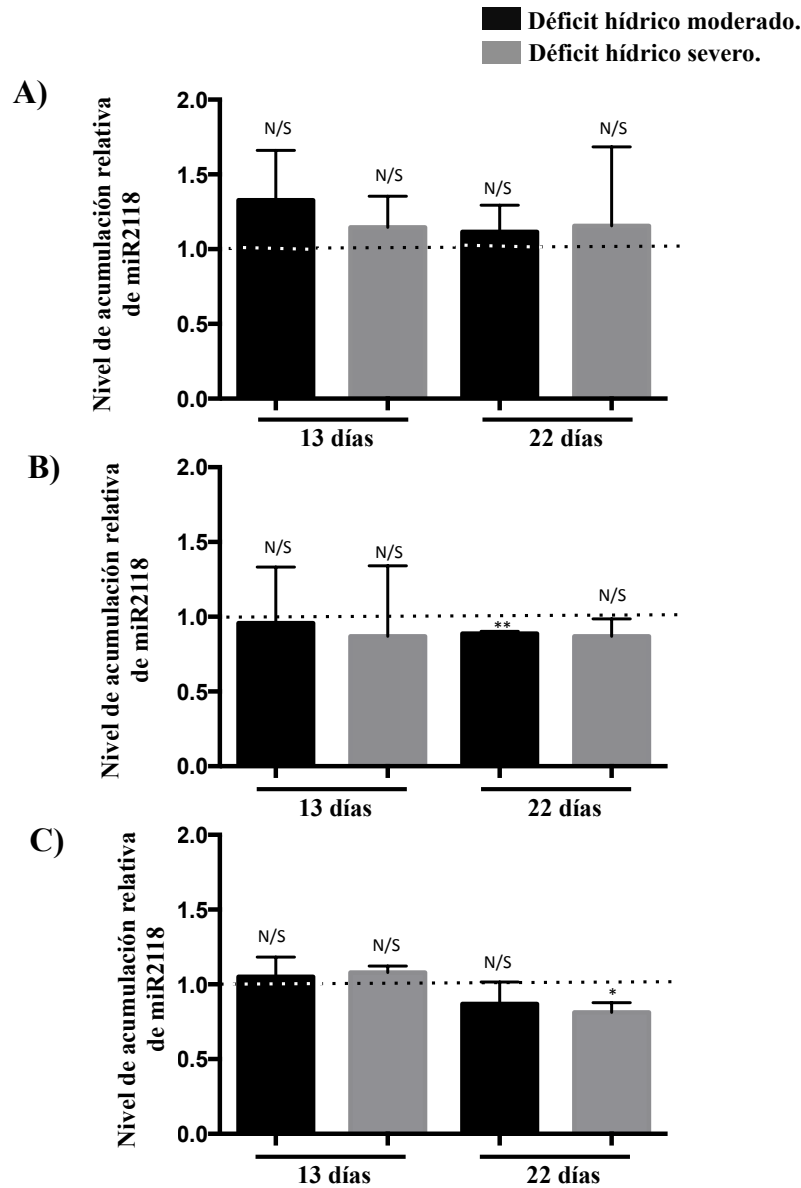
Las líneas punteadas representan los niveles control de miR2118 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR2118 en cada condición y, finalmente todos los valores de miR2118 fueron normalizados con los niveles endógenos del snARN U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuke's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S=No significativo, $n = 3$.

Anexo 8.



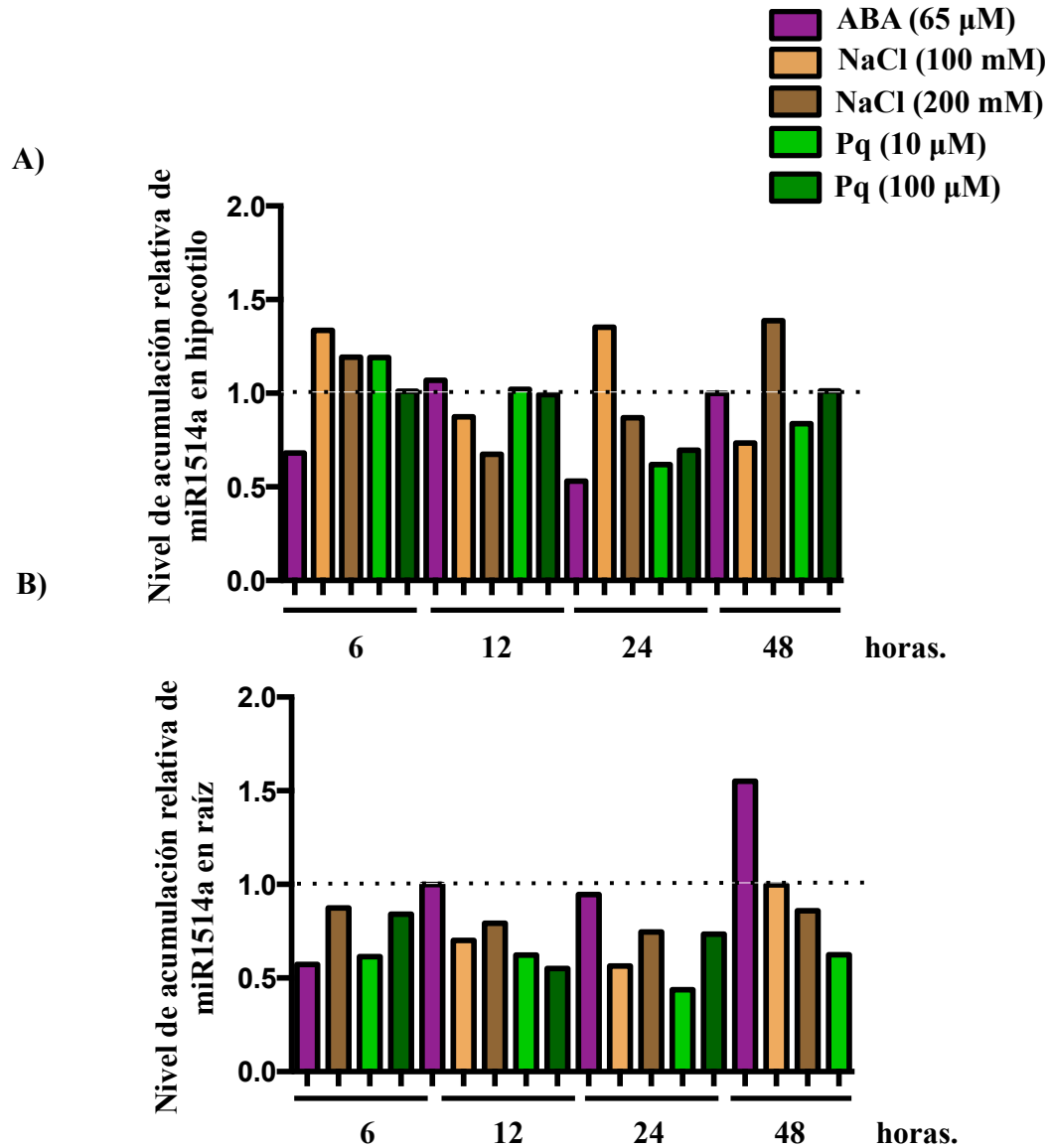
El miR2118 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de plantas adultas en tres cultivares con distinta resistencia a la deshidratación. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) raíces de PS, B) raíces PV, C) en BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR2118 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR1514a en cada condición, además todos los valores de miR1514a fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 9.



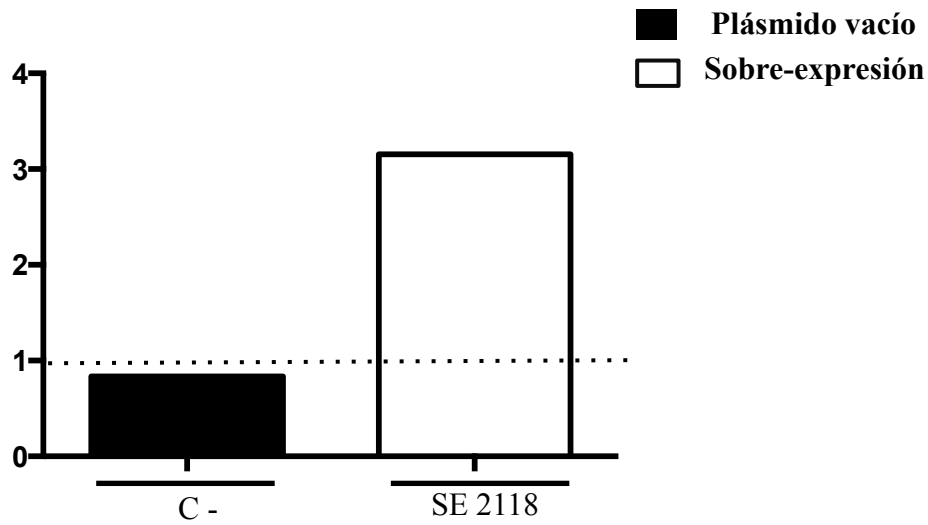
El miR2118 no muestra diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia a la deshidratación. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) hojas de PS, B) en hojas de PV y C) en hojas de BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR2118 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR2118 en cada condición, además todos los valores de miR2118 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuke's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 10.



Niveles de acumulación de miR2118 en hipocótilos y raíces de Pinto Saltillo bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Análisis del northern blot realizado en A) hipocótilos de plántulas, B) raíces de plántulas. Pq=Paraquat, NaCl=cloruro de sodio, ABA=ácido abscísico. Las líneas punteadas representan los niveles de miR1514a en las condiciones control en cada tiempo. Todos los valores de miR2118 fueron normalizados con los niveles endógenos del snARN U6.

Anexo 11.



Análisis del northern blot de la sobre-expresión de miR2118 en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La línea punteadas representan los niveles control de snRNA U6 endógenos del ARN pequeño U6. C- = plásmido vacío, SE = sobre-expresora de miR2118. Se muestra el resultado de un solo experimento de tipo northern blot.

Anexo 12. Predicciones bioinformáticas de los transcritos diana de miR2118, mediante el servidor en línea <http://plantgrn.noble.org>.

keywords:

Expectation:

UPE:

e.g. AT1G27360, miR156, transcription factor ...

Range: 0.0 - 3.0

Range: 0.0 - 25.0

miRNA Acc.
 Expectation(E)
 by:

List of Predicted miRNA/Target Pairs [#Session ID: 1467507528373423]

[Batch Download](#)

[Prev Page](#)

[Next Page](#)

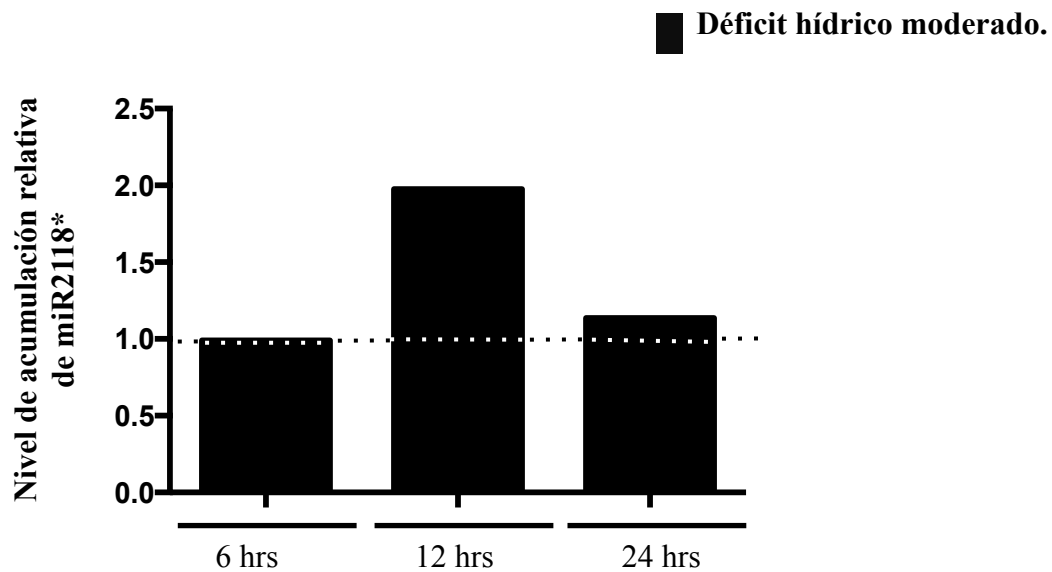
Page No. 1 / Total 1 Pages , 26 Records

miRNA Acc.	Target Acc.	Expectation (E)	Target Accessibility (UPE)	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.011G201000.1	2.0	22.75	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 632 UGGGAAUGGGUGGAGUGGGCAA 653	pacid=27152390 locus=Phvul.011G201000 ID=Phvul.011G201000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.010G025000.1	2.0	21.45	miRNA 21 UCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 672 GGGAAUGGGAGGGAUUGGCAA 692	pacid=27140443 locus=Phvul.010G025000 ID=Phvul.010G025000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.010G136700.1	2.0	23.899	miRNA 21 UCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 810 GGUUAUGGGUGGAAUUGGUAA 830	pacid=27140167 locus=Phvul.010G136700 ID=Phvul.010G136700.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G129200.1	2.0	23.584	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 476 UUGGUAUGGGUGGACUCGGCAA 497	pacid=27168586 locus=Phvul.002G129200 ID=Phvul.002G129200.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G131100.1	2.0	23.584	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 611 UUGGUAUGGGUGGACUCGGCAA 632	pacid=27169705 locus=Phvul.002G131100 ID=Phvul.002G131100.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G131200.2	2.0	20.895	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : ~ : : : : : Target 797 UUGGUAUGGGUGGACUCGGCAA 818	pacid=27171328 locus=Phvul.002G131200 ID=Phvul.002G131200.2.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G131200.1	2.0	20.895	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : ~ : : : : : : : : : : Target 797 UUGGUAUGGGUGGACUCGGCAA 818	pacid=27171329 locus=Phvul.002G131200 ID=Phvul.002G131200.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.011G203000.1	2.5	22.555	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 635 UGGGAAUGGGUGGAGUGGGUAA 656	pacid=27151641 locus=Phvul.011G203000 ID=Phvul.011G203000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.010G004700.1	2.5	24.986	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 686 UGGGAAUGGGUGGAGUGGGUAA 707	pacid=27140917 locus=Phvul.010G004700 ID=Phvul.010G004700.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.011G181500.1	2.5	22.585	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : ~ : : : : : Target 815 UGGGAAUGGGUGGAGUGGGUAA 836	pacid=27152520 locus=Phvul.011G181500 ID=Phvul.011G181500.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.010G025700.1	2.5	14.906	miRNA 21 UCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : : : : : : Target 645 GGGAAUGGGAGGGAUUGGUAA 665	pacid=27140493 locus=Phvul.010G025700 ID=Phvul.010G025700.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.010G008700.1	2.5	17.583	miRNA 21 UCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : ~ : : : : : Target 1759 GGGGAUGGGAGGAAUUGGUAA 1779	pacid=27139780 locus=Phvul.010G008700 ID=Phvul.010G008700.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G130300.1	2.5	19.607	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : ~ : : : : : : : : : : Target 572 UUGGUAUGGGUGGACUUGGCAA 593	pacid=27169559 locus=Phvul.002G130300 ID=Phvul.002G130300.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.002G131000.1	2.5	20.91	miRNA 22 AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : ~ : : : : : : : : : : Target 731 UUGGUAUGGGUGGACUUGGCAA 752	pacid=27169993 locus=Phvul.002G131000 ID=Phvul.002G131000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccaccauuccua	Phvul.011G030000.1	2.5	17.704	miRNA 20 CCUUACCCACCUUAGCCGUU 1 : : : : : : : : : : ~ : : : : : Target 658 GGAACAGGUGGAAUUGGCAA 677	pacid=27151278 locus=Phvul.011G030000 ID=Phvul.011G030000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1

uugccgauuccacccaauccua	Phvul.004G036300.2	3.0	23.126	miRNA Target	22 623	AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU UGGAAUGGGUGGUUAGGCAA	1 644	pacid=27158024 locus=Phvul.004G036300 ID=Phvul.004G036300.2.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.004G036300.1	3.0	23.126	miRNA Target	22 623	AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU UGGAAUGGGUGGUUAGGCAA	1 644	pacid=27158025 locus=Phvul.004G036300 ID=Phvul.004G036300.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.002G244600.1	3.0	13.525	miRNA Target	21 1683	UCCUUACCCACCUUAGCCGUU AGGAAGCGUGGAAUCGGCAC	1 1703	pacid=27170736 locus=Phvul.002G244600 ID=Phvul.002G244600.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.006G010000.1	3.0	19.518	miRNA Target	21 648	UCCUUACCCACCUUAGCCGUU GGGCAUGGGUGGAAUUGGUAA	1 668	pacid=27166775 locus=Phvul.006G010000 ID=Phvul.006G010000.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.004G139900.1	3.0	23.566	miRNA Target	20 646	CCUUACCCACCUUAGCCGUU GGAUUGGGAGGGAUCGGAAA	1 665	pacid=27157579 locus=Phvul.004G139900 ID=Phvul.004G139900.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.005G030500.1	3.0	24.772	miRNA Target	20 692	CCUUACCCACCUUAGCCGUU GGAGUUGGGUGGAAUAGGCAA	1 711	pacid=27149759 locus=Phvul.005G030500 ID=Phvul.005G030500.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.010G131900.1	3.0	19.016	miRNA Target	21 702	UCCUUACCCACCUUAGCCGUU GGCAUGGGUGGUAUUGGUAA	1 722	pacid=27140872 locus=Phvul.010G131900 ID=Phvul.010G131900.1.v1.0 annot-version=v1.0	Translation	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.010G132200.1	3.0	17.928	miRNA Target	21 1233	UCCUUACCCACCUUAGCCGUU GGGCAUGGGUGGUAUUGGUAA	1 1253	pacid=27140927 locus=Phvul.010G132200 ID=Phvul.010G132200.1.v1.0 annot-version=v1.0	Translation	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.010G136800.1	3.0	20.739	miRNA Target	21 801	UCCUUACCCACCUUAGCCGUU GGGUAUGGGGGAAUUGGUAA	1 821	pacid=27140116 locus=Phvul.010G136800 ID=Phvul.010G136800.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.004G086300.1	3.0	17.848	miRNA Target	22 1294	AUCCUUACCCACCUUAGCCGUU UUGGAAGGGUGGAAUUGGUAA	1 1315	pacid=27158332 locus=Phvul.004G086300 ID=Phvul.004G086300.1.v1.0 annot-version=v1.0	Cleavage	1
uugccgauuccacccaauccua	Phvul.008G031200.1	3.0	12.518	miRNA Target	20 631	CCUUACCCACCUUAGCCGUU GGAUUGGGUGGUCUUGGUAA	1 650	pacid=27154084 locus=Phvul.008G031200 ID=Phvul.008G031200.1.v1.0 annot-version=v1.0	Translation	1

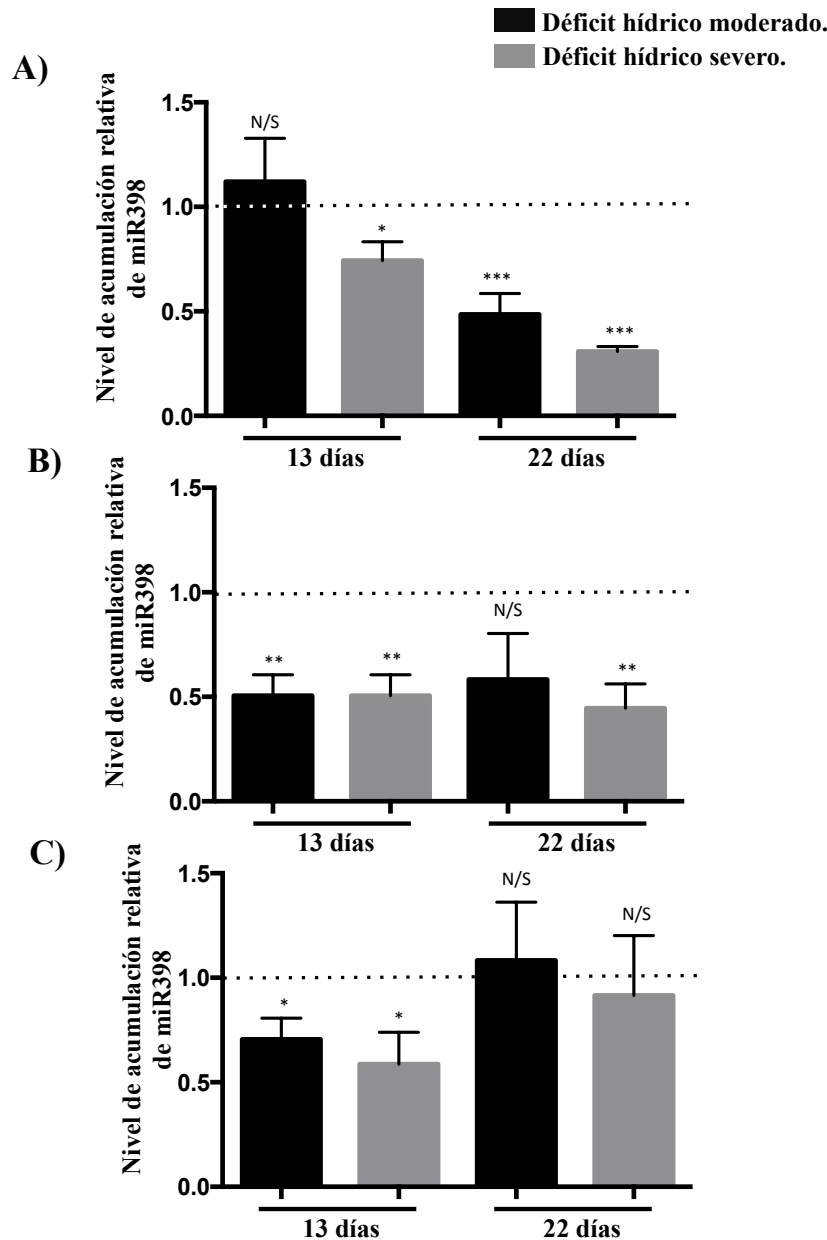
Anexos de otros microRNAs utilizados como referencia en este trabajo:

Anexo 13.



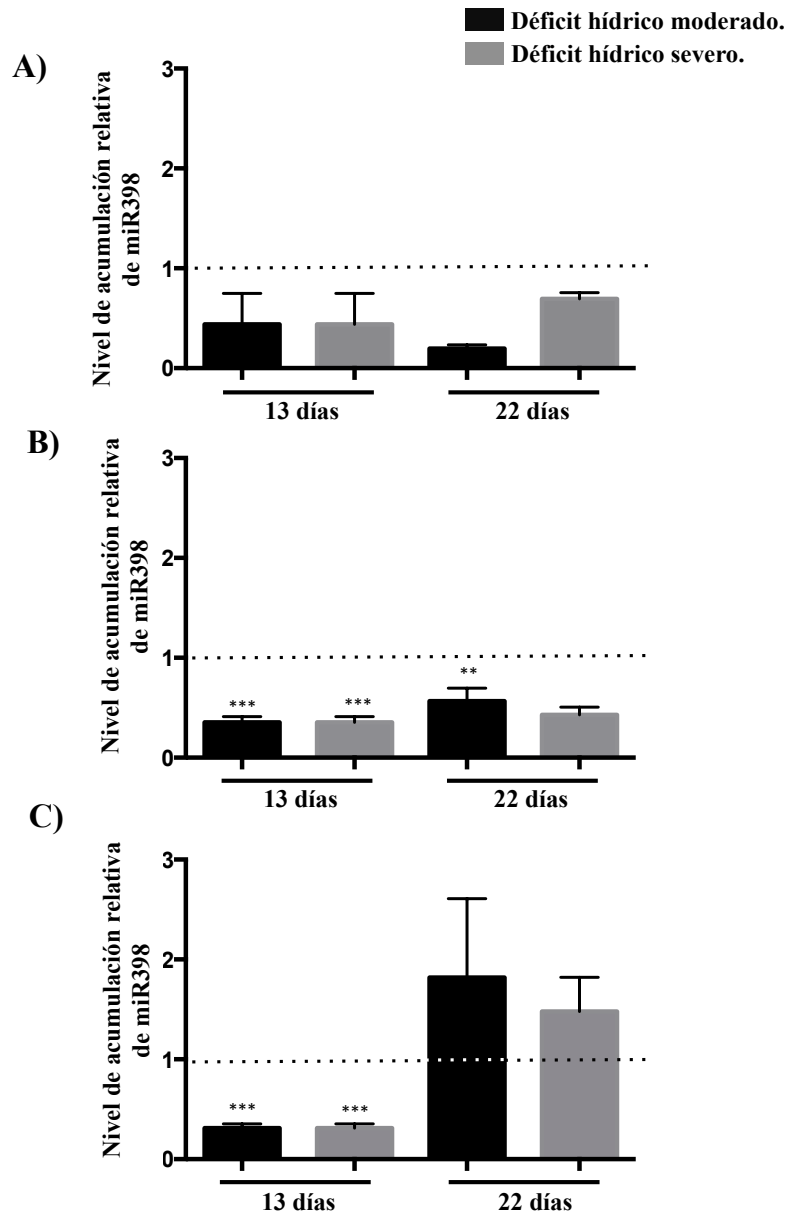
Análisis gráfico del northern blot mostrando la acumulación de miR2118* en raíces de Pinto Saltillo durante una cinética de déficit hídrico moderado. Las muestras fueron colectadas en las horas indicadas. Las líneas punteadas representan los niveles control de miR2118* en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR2118 en cada condición, además todos los valores de miR2118 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Todos los valores de miR2118* fueron normalizados con los niveles endógenos del snARN U6. Se muestra el resultado de un solo experimento.

Anexo 14.



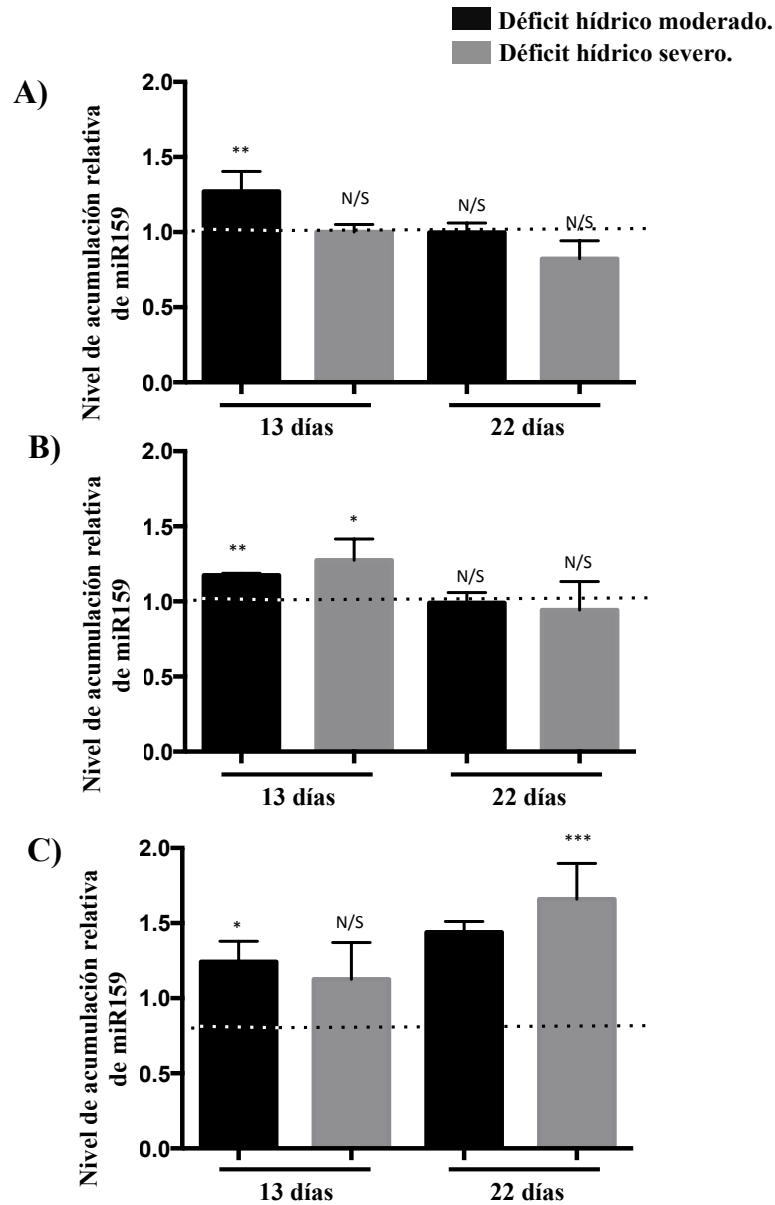
El miR398 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces adultas de tres cultivares con distinta resistencia a la deshidratación. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) raíces de PS, B) raíces de PV. C) raíces de BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR398 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR398 en cada condición, además todos los valores de miR398 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 15.



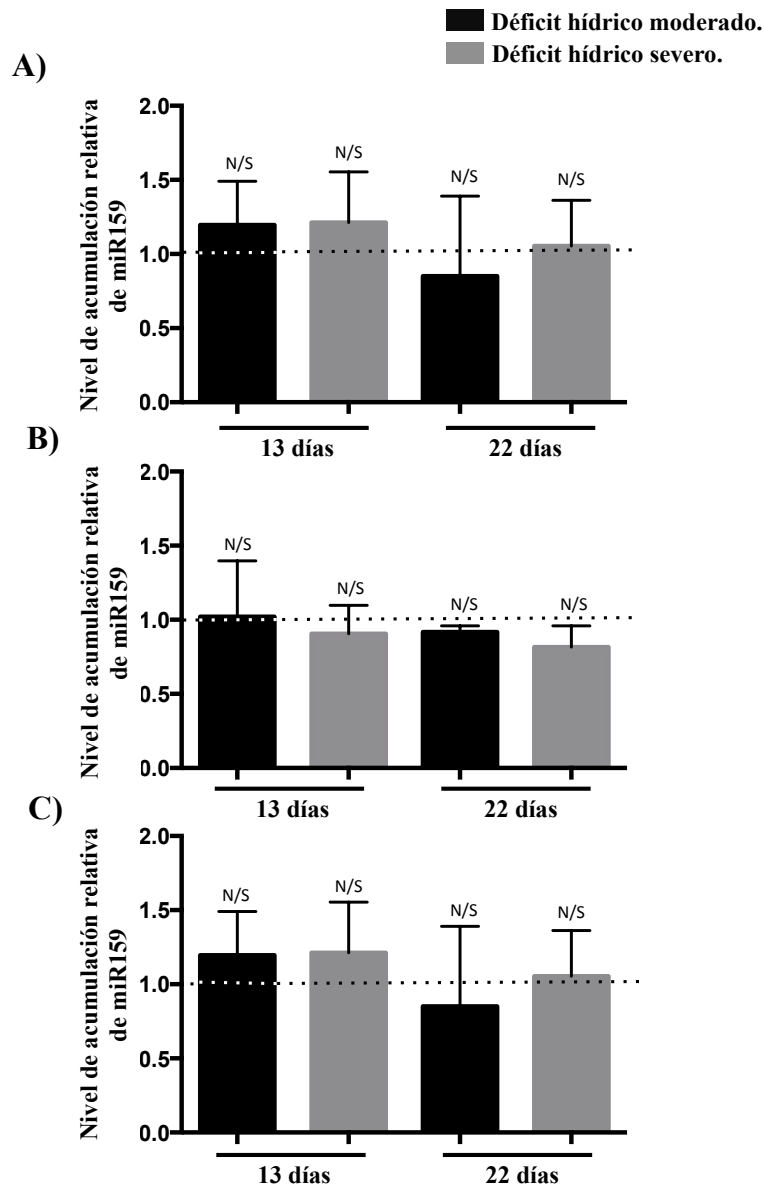
El miR398 muestra diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia al déficit hídrico. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) raíces de PS, B) en raíces de PV y C) en raíces de BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR398 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR398 en cada condición, además todos los valores de miR398 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuke's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 16.



miR159 muestra diferentes niveles de acumulación en raíces de tres cultivares con distinta resistencia al déficit hídrico. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) raíces de PS, B) raíces de PV y C) raíces de BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR159 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR159 en cada condición, además todos los valores de miR159 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tuckey's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 17.



El miR159 no muestran diferentes niveles de acumulación en hojas de tres cultivares con distinta resistencia al déficit hídrico.. Análisis gráfico del northern blot realizado en A) hojas de PS, B) en hojas de PV y C) en hojas de BM. Se cosechó el material después de 13 y 22 días después de haber aplicado el tratamiento de déficit hídrico moderado y severo (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas representan los niveles control de miR159 en cada tiempo de tratamiento, el cual fue utilizado para normalizar el nivel de acumulación de miR159 en cada condición, además todos los valores de miR159 fueron normalizados con los niveles endógenos del ARN pequeño U6. Los asteriscos indican la diferencia significativa comparada con las condiciones control, la cual fue dada por la prueba estadística de Tukei's de comparación múltiple (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), N/S= No significativo, $n = 3$.

Anexo 18. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos para análisis tipo Northern blot.

Nombre	Secuencia
AS-U6	CCAATT TTATCGGATGTCCCG
AS-miR1514a	CAATGCCTATTTTCAAATGAA
AS-miR2118	TAGGAATGGGTGGAATCGGCAA
AS-miR2118*	TTACCAACCCACCCACTCCCATA
AS-miR159a	TAGAGCTCCCTTCAATCCAAA
AS-miR398	AGGGGCGACCTGAGAACACAA

Oligonucleotidos para la clonación de miR1514a.

Nombre	Secuencia oligonucleótido líder (5'-3')	Secuencia oligonucleotido reverso (3'-5')
pre-miR1514a (Chr03)	CACCTTGCCTACCTTCTCAC	GTGAAGGAAGATAAGACTCCC
pre-miR1514b (Chr07)	GGGTTTTGCATCTGCCATGC	GCTCAGGAGGACCTTCACGAT
M 13 (-20)	GTAAAACGACGGCCAG	
T 7 P	TAATACGACTCACTATAGGG	
T 3	CAATTAACCCTCACTAAAGTG	

Oligonucleótidos utilizados en la inhibición de miR1514a.

Nombre	Secuencia oligonucleótido líder (5'-3')	Secuencia oligonucleotido reverso (3'-5')
STTM1514a	CACCAAGCTCAATGCCTATTTCTATCAAATGAAGTTGTTGTTGTTATGGTCTAATTTAAATATGGTC	GAATTCTTCATTTTGATAGAAATAGGCATTGATTCTTCTTCTTTAGACCATATTTAAATTAGACC

Oligonucleotidos para la clonación de NAC 700 (Phvul.010G120700).

Nombre	Secuencia oligonucleótido líder (5'-3')	Secuencia oligonucleotido reverso (3'-5')
Phvul.010G120700	CAC CAT GAA GAT TGT AGG ATT TGG TTT TC	AAA ACA ATT GAT CTC CAA AGG TTT AC

Oligonucleotidos para sobre-expresión de miR1514a.

	Secuencia oligonucleótido lider (5'-3')	Secuencia oligonucleotido reverso (3'-5')
Nombre		
35 S Promoter	CAC AAT CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC	
R_Nos_Ter		TGA TAA TCA TCG CAA GAC CG
Tomato 5'	CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA GG	TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G

Oligonucleótidos para los análisis tipo RT-qPCR.

	Secuencia oligonucleótido lider (5'-3')	Secuencia oligonucleotido reverso (3'-5')
Nombre		
ACTIN 11 (Phvul.008G011000)	TGC ATA CGT TGG TGA TGA GG	AGC CTT GGG GTT AAG AGG AG
EIF4 (Phvul.004G075100)	GGT CAT TGG TCA TGT CGA CTC TGG	GCA CCC AGG CAT ACT TGA ATG ACC
SKYP 16	CAC CAG GAT GCA AAA GTG G	ATC CGC TTG TCC CTT GAA C
NAC 100 (Phvul.010G121100)	CAA ACT CCT CAT TAT CAA CC	GGG AGA ATT GAT GCA CCA AA
NAC 600 (Phvul.010G120600)	CCT TCA AGA GGT ACT TCT GC	CCC AAA TAG AAC TCA GGA ATT G
NAC 700 (Phvul.010g120700)	CTA CAC TTT CAT CAG CTA AAA TT	ATG CTT CTT CTT CTG GAG ACT G
NAC 000 (Phvul.010g121000)	CAA CAG CAG AAG GAA TTT CAT	CCT CTT GCA ATG TCT CCC AA
Phvul.011G059000	TCT CTC TCG CCT CCT ACA CC	TAC TCG AGT GAC AGG GGT GA
Phvul.003G003200	AGG GCA ATG GTG AAG ATG GG	TCC AGA AGC ACG AGT GTG TT
Phvul.006G137200	TGG AAG GTT GTG AAG CCA CT	CAG CAG GGG GTT CAG GAA AA
Phvul.006G170400	ATG TAG GTT GTA GGT TGG CGT	ATC TCC CTC AAG TGC CAT CC
Fwd_1514a	TTC ATT TTG AAA ATA GGC ATT G	
UPL_RT_phasi4	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACC TTG GT	
Fwd_SL_phasi4	TCC TTC AGA TGG AAT CTG A	
UPL_RT_phasi1	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG TAG TT	
Fwd_SL_phasi1	TTC TGC AGA TTC CAT CTG A	
UPL_RT_phasi6	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACC TGC TT	
Fwd_SL_phasi6	TCG CGC TAT TAT CTG AAG CT	
UPL_RT_tasiARF	GTT GGC TCT GGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CCA GAG CCA ACG AGG TC	
Fwd_SL_tasiARF	TCG CTT CTT GAC CTT GTA A	
Fwd_phasi5	ATTCCGAAGGATGTCTTGAAT	
Universal SL	GTGCAGGCTCGAGGT	

