



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

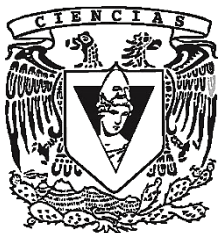
**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA
A SEQUÍA MEDIADA POR miRNAs A TRAVÉS DE LA
EVALUACIÓN DE SUS BLANCOS
ENCONTRADOS POR ANÁLISIS DE DEGRADOMA
EN EL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

ALMA JENNY GARCÍA MEJÍA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA**

**2018
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

García
Mejía
Alma Jenny
044 55 78 90 14 50
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306053261

2. Datos del tutor

Dr
José Luis
Reyes
Taboada

3. Datos del sinodal 1

Dr
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos del sinodal 2

Dra
Berenice
García
Ponce de León

5. Datos del sinodal 3

M en C
Ramiro
Cruz
Durán

6. Datos del sinodal 4

Quím
Viviana
Escobar
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la regulación de la respuesta a deshidratación mediada por miRNAs a través de la evaluación de sus blancos encontrados por análisis de degradoma en el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)
102 p.
2018

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Estudio de la Respuesta a Déficit Hídrico del consorcio Covarrubias-Reyes, del Instituto de Biotecnología de la UNAM; bajo la asesoría del Dr. José Luis Reyes Taboada.



Este trabajo fue apoyado parcialmente por fondos de los proyectos CONACYT (CB2010-151571) y DGAPA-PAPIIT (IN-205112 y IN-202918).

Agradecemos al Dr. Mario Arteaga (Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana) por el Análisis de Degradoma y a la Lic. Rosa María Solórzano por su apoyo técnico en el laboratorio durante la realización de este proyecto.

Agradecimientos académicos

Al Dr. José Luis Reyes Taboada (Pepe), por su apoyo, tolerancia, comprensión y paciencia durante el desarrollo de este trabajo y por todo lo que me enseñó.

A la Dra. Alejandra Covarrubias, por su motivación, amabilidad y excelente ejemplo.

A mis sinodales por sus excelentes aportaciones a esta tesis.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi familia el apoyo durante mi vida escolar. A mi mamá por ofrecer siempre su ayuda incondicional y por ser la persona que más me conoce en el mundo. A mi papá por su motivación y apoyo para concluir esta etapa. A mi hermana por ser mi compañera.

A los amigos que conocí en esta etapa: a Benjamín, mi mejor amigo; a mis compañeros del laboratorio en particular a Betty por tu amistad, apoyo y enorme tolerancia, a Miguel por tu apoyo en el laboratorio, a Cesar por ser un buen ejemplo, a Alfonso, por tus consejos y compañía, a Carlos por tu integridad y por ser un buen amigo, y a Rosy por tus enseñanzas y afecto.

Gracias a el resto de mis compañeros que hicieron de mi experiencia en el laboratorio una etapa inolvidable.

*A mis padres y hermana con
todo mi amor*

Resumen

Las plantas contienden con condiciones ambientales mediante diversos mecanismos. A nivel molecular, los miRNAs reguladores postranscripcionales negativos de sus mRNAs blanco. Para comprender su papel regulatorio, es necesario identificar los mRNAs blanco que regulan. En este proyecto se analizaron los mRNAs blanco de miRNAs encontrados por Análisis de Degradoma de plántulas de *P. vulgaris* sometidas a riego optimo y deshidratación moderada. Se encontraron 65 mRNAs blancos, algunos de los cuales se acumularon diferencialmente durante condición control y deshidratación. Con el fin de explorar el rol de los miRNAs en la respuesta a deshidratación, en este trabajo, se analizaron nueve pares miRNA-mRNA blanco. Estos pares fueron seleccionados de acuerdo con la degradación del mRNA blanco durante condiciones control, deshidratación o ambas. Estos mRNAs blanco de miRNAs se evaluaron mediante RT-qPCR. A partir de los resultados de este análisis, se concluyó que no siempre hay una correlación negativa entre los niveles de acumulación del mRNA blanco y el miRNA que lo regula, lo que sugiere que la abundancia del mensajero y del miRNA durante deshidratación, depende de múltiples factores, que incluyen la regulación mediada por miRNAs pero que no se limitan a esta.

Abstract

Plants contend with adverse environmental conditions by means of a variety of mechanisms. At the molecular level, miRNAs function primarily as posttranscriptional negative regulators and the understanding of its function depends on the identification of its targets. Target pairs of miRNA-mRNA were identified by high throughput sequencing from *P. vulgaris* seedlings during optimal irrigation or water deficit conditions, finding 65 targets, some of them exhibit changes under stress conditions. To explore the roles of miRNAs, in this work, nine of the miRNA-mRNA target pairs were selected: three that show cleavage reads only during optimal irrigation, three more during drought, and the last three showed no difference between the conditions analyzed. All the miRNA-mRNA targets were evaluated by RT-qPCR. This analysis did not reflect a negative correlation between the abundance of the miRNA and target messengers thus, we suggest that the resulting transcript abundance depends on multiple factors, including but not limited to miRNA regulation.

Índice

1. Introducción.....	11
1.1 <i>P. vulgaris</i> como cultivo de interés agronómico	12
1.1.a <i>P. vulgaris</i> y su cultivo.....	12
1.1.b El cultivo de <i>P. vulgaris</i> y el impacto de la sequía	14
1.1.c El estudio del <i>P. vulgaris</i> y las leguminosas.....	20
1.2 La restricción en la disponibilidad de agua es un factor de estrés.....	21
1.2.a Las plantas están expuestas al estrés abiótico	22
1.2.b La sequía es un fenómeno climático	23
1.2.c Diversos fenómenos causan la restricción en la disponibilidad de agua.....	23
1.3 Respuesta de las plantas al estrés	25
1.3.a Respuestas morfológicas y fisiológicas.....	26
1.3.b Respuesta molecular	27
1.4 Los miRNAs son RNAs pequeños y participan en la respuesta a estrés.....	28
1.4.a Los miRNAs son ncRNAs pequeños.....	29
1.4.b Biogénesis de los miRNAs.....	30
1.4.c Mecanismo de acción de los miRNAs y su participación en el estrés... ..	32
1.4.e Análisis de degradoma.....	36
2. Antecedentes	39
2.1 miRNAs en <i>P. vulgaris</i> y sus mRNAs blanco	39
2.2 Construcción de los Análisis de Degradoma.....	40
2.2.a Construcción de los Análisis de Degradoma	40
3. Hipótesis	42
4. Objetivos	42
5. Estrategia experimental	43
6. Materiales y Métodos	45
6.1 Anotación de las bibliotecas de los análisis de degradoma.....	45
6.2 Experimento de deshidratación en plántulas.....	46
6.2.a Esterilización.....	46
6.2.b Germinación y crecimiento.....	46
6.2.c Colecta de tejidos.....	47
6.3 Obtención de cDNA	47

6.3.a Extracción de RNA total	47
6.3.b Síntesis de cDNA para transcritos	48
6.3.c Síntesis de cDNA de miRNAs	48
6.4 Cuantificación de la acumulación relativa de RNAs mensajeros y miRNAs	49
6.4.a Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR	49
6.4.b RT-qPCR de mRNAs y miRNAs	53
6.5 Análisis de datos.....	55
7. Resultados	56
7.1 Anotación de las bibliotecas de los análisis de degradoma.....	56
7.2 Nuevos mRNAs blanco de miRNAs	62
7.3 Cuantificación por RT-qPCR de nueve mRNAs blanco encontrados por análisis de degradoma y los miRNA que los regulan.....	64
8. Discusión.....	74
8.1 Se identificaron 65 mRNAs blanco de miRNAs en <i>P. vulgaris</i>	75
8.2 Se encontraron 52 mRNAs blanco de miRNAs conservados y 13 mRNAs blanco de miRNAs no conservados	76
8.3 Los análisis de degradoma identificaron tres nuevos mRNAs blanco de miRNAs conservados en <i>P. vulgaris</i>	77
8.4 Acumulación de los mRNAs blanco de miRNAs seleccionados durante deshidratación	84
8.5 El degradoma no refleja la acumulación miRNA-mRNA blanco	92
9. Conclusiones	95
10. Referencias	96

Índice de tablas

Tabla 6-2 Oligonucleótidos empleados para cuantificar miRNAs	52
Tabla 6-3. Ciclos de amplificación para mensajeros	54
Tabla 6-4. Ciclos de amplificación para miRNAs.....	55
Tabla 7-1. mRNAs blanco encontrados por análisis de degradoma (control y deshidratación).....	57
Tabla 7-2 mRNAs blanco de miRNAs conservados en las plantas terrestres	61
Tabla 7-3 mRNAs blanco de miRNAs no conservados en las plantas terrestres.....	62
Tabla 7-4 Se muestran los nuevos mRNAs blanco de miRNAs conservados en las plantas terrestres.....	63
Tabla 7-5. mRNAs blanco de miRNAs seleccionados a partir de los datos obtenidos por los análisis de degradoma.....	64
Tabla 8-1. Resumen de resultados de la acumulación de miRNA-RNA blanco en respuesta a deshidratación	86

Índice de figuras

Figura 1-1. Superficie sembrada de los principales cultivos.	15
Figura 1-2. Producción de frijol nacional en el periodo 2003-2012.	16
Figura 1-3. Superficie sembrada de frijol en 2010 y el fenómeno de sequía en México. ...	19
Figura 1-4. Biogénesis de miRNAs.	32
Figura 1-5. Identificación de mRNAs blancos de miRNAs mediante el análisis del degradoma.	38
Figura 5-1. Estrategia experimental.	44
Figura 6-1. Diseño de oligonucleótidos para mRNAs blanco de miRNAs.	49
Figura 7-1. Función de los mRNAs blanco identificados por los análisis de degradoma. .	59
Figura 7-2. Acumulación de los mRNAs blanco que solo se degradan en control y los miRNAs que los regulan.	66
Figura 7-3. Acumulación de los mRNAs blanco que solo se degradan en deshidratación y los miRNAs que los regulan.	70
Figura 7-4. Acumulación de los mRNAs blanco que se degradan en control y deshidratación, y los miRNAs que los regulan.	73
Figura 8-1. Apareamiento entre miR159 y NOZZLE, y lecturas de corte del análisis de degradoma.	80
Figura 8-2. Apareamiento entre miR172 y la PTK, y lecturas de corte del analisis de degradoma.	81
Figura 8-3. Apareamiento entre miR396 y la proteína sin anotacion funcional (Phvul.007G253900), y lecturas de corte del análisis de degradoma.	83

1. Introducción

El agua es fundamental para la vida. La vida se originó en el agua hace unos 3.5 mil millones de años, por lo que es natural que este compuesto químico sea fundamental para su mantenimiento (Taiz y Zeiger, 2010). Las plantas son organismos fotosintéticos que colonizaron la tierra hace 450 millones de años (Proctor, 2014), esta transición es notable debido a que los elementos que sustentan la vida vegetal se encuentran disponibles de forma distinta en un hábitat acuático y en uno terrestre. Todos los organismos fotosintéticos requieren agua, CO₂, luz, y elementos químicos como N, P, K, Mg, Ca, Fe y otros los cuales son llamados micronutrientes (Proctor, 2014) para generar su biomasa, y estos organismos son la base de la cadena trófica.

La colonización del ambiente terrestre ofrece beneficios como los que proporciona el exponer a los tejidos fotosintéticos directamente a la luz, y la mayor disponibilidad del CO₂ debido a que su difusión es 10⁴ veces mayor en el aire que en el agua (Proctor, 2014). Sin embargo, existen limitantes que acompañan estas ventajas como que en el medio terrestre el agua solo se encuentre disponible de forma local e intermitente. En este contexto, fue necesario para las plantas desarrollar mecanismos que les permitieran contender con la restricción en la disponibilidad de agua a través de diversas estrategias como la aparición del sistema vascular, las raíces y la cutícula (Proctor, 2014).

En la actualidad, las plantas colonizan casi todos los ecosistemas en donde el agua sigue siendo un compuesto indispensable, y su disponibilidad, así como otros factores ambientales, moldean los ecosistemas. El ser humano ha seleccionado y cultivado para su consumo y otros usos, diversas especies vegetales, en este contexto, las problemáticas relacionadas con el aprovechamiento de las especies cultivables se encuentran estrechamente relacionadas con la disponibilidad del recurso hídrico. A continuación, se expone la situación de *Phaseolus vulgaris* (*P. vulgaris*), la leguminosa que es objeto de estudio en la presente tesis.

1.1 *P. vulgaris* como cultivo de interés agronómico

1.1.a *P. vulgaris* y su cultivo

P. vulgaris L., el frijol común, se encuentra en un género compuesto por 55 especies de las cuales cinco han sido domesticadas además de éste: *P. lunatus* L. (Frijol lima), *P. acutifolius* A. Gray (frijol tepari), *P. coccineus* L. ssp. (frijol ayocote) y *P. dumosus* Macfad = *P. polyanthus* (= *P. coccineus* ssp. *darwinianus* Hernández y Miranda) (frijol de año) (Gepts, 1990; Hernández-López et al., 2013). *P. vulgaris*, es la especie de este género más cultivada en todo el mundo y es la principal leguminosa cultivada para consumo humano directo (González-Estrada et al., 2003).

Este género pertenece a la Familia Leguminosae (Fabaceae) cuya aparición se ha estimado que ocurrió hace unos 60 millones de años (Ma). Este grupo se ha dividido tradicionalmente en tres subfamilias Papilionoideae, Mimosoideae, y Caesalpinioideae. La mayoría de las especies de importancia agronómica pertenecen a la subfamilia Papilionoideae. Este grupo puede ser reconocido porque poseen flores con simetría bilateral, y exhiben además un pétalo de mayor tamaño llamado estandarte, el cual cubre al resto de los pétalos. Las leguminosas poseen un fruto seco denominado legumbre que se origina en una flor monocarpelar que forma una vaina que contiene varias semillas. Las semillas de las leguminosas están formadas por testa y embrión. En la mayoría de las leguminosas la testa es dura e impermeable lo que provee protección. Los cotiledones almacenan los nutrientes como carbohidratos y aceites que son necesarios para el establecimiento de la plántula. Además, las leguminosas son muy importantes a nivel agronómico ya que son las más cultivadas después de los cereales (gramíneas). El consumo de sus hojas y semillas aporta gran parte de los nutrientes necesarios en la dieta y sus germinados son fuente de vitamina C (León, 2000).

Clasificación de *P. vulgaris* de acuerdo con el sistema APG (2009)

Eucarionte; Viridiplatae; Streptofita; Estreptofitina; Embriofita; Traqueofita;
Eufilofita; Spermatofita; Angiospermas; Mesangiospermas; Eudicotiledoneas;
Eudicotiledóneas centrales; Rosidas; Eurosids I; Fabales; Fabaceae;

Phaseolus vulgaris L.

Una característica muy importante de las leguminosas es su asociación simbiótica con bacterias fijadoras del nitrógeno. La endosimbiosis más común ocurre entre leguminosas y rizobacterias que incluyen los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium* (Taiz y Zeiger, 2010). Esto no solo proporciona eficientemente el nitrógeno necesario para el desarrollo de las leguminosas, sino que enriquece el suelo donde crece el cultivo y se establece esta asociación. Todas las plantas requieren nitrógeno como nutriente, pero gracias a la endosimbiosis, las leguminosas lo tienen más disponible, esto genera que estas plantas puedan almacenar mayor cantidad de proteínas en sus semillas, lo que las hace de un alto valor nutricional (Broughton et al., 2003).

El *P. vulgaris* que se cultiva fue domesticado a partir de su contraparte silvestre. Se considera al territorio mesoamericano como un centro de origen y domesticación para varias especies cultivadas entre ellas el maíz (*Zea mays* L.), el chile (*Capsicum spp.*), la calabaza (*Cucurbita spp.*) y por supuesto *P. vulgaris*. En México se han estudiado restos de semillas de *P. vulgaris* muy similares a las actuales halladas en cuevas en Tamaulipas, Oaxaca y Puebla. Mediante técnicas de radio carbono se determinó que estas semillas datan de hace 2 400 años aproximadamente. Sin embargo, se tiene conocimiento de localidades en Perú con restos de semillas que datan de hace 7680 a 4300 años, dependiendo del autor (Bitocchi et al., 2013; Hernández-López et al., 2013). Además, la evidencia molecular apoya la hipótesis de que el *P. vulgaris* que se cultiva actualmente fue domesticado a partir de su variedad silvestre en dos eventos independientes, uno localizado en Mesoamérica, en México y uno en la región andina sur (Bitocchi et al., 2013). Otros estudios consideran a la región andina norte como un posible tercer centro de domesticación (Gentry, 1969; Gepts, 1990).

El conocimiento del origen del frijol es importante ya que la domesticación de una especie reduce la variabilidad genética dentro de la población cultivada. Las variedades silvestres de una especie pueden ofrecer una fuente de variabilidad genética que provea de características favorables en contra de plagas u otras condiciones adversas. En el caso particular de *P. vulgaris*, los estudios moleculares sugieren que tanto en las variedades cultivadas en la región andina como en la mesoamericana ocurrió hibridación con las poblaciones silvestres de *P. vulgaris*, lo que ha aumentado la variabilidad genética de sus cultivos (Bitocchi et al., 2013). Esta variabilidad también se puede atribuir a un aumento en

la tasa de mutación de las variedades domesticadas, se sabe que este fenómeno se presenta después de que una población ha pasado por un cuello de botella genético como lo implica el fenómeno de domesticación (Bitocchi et al., 2013).

Se han definido diferentes variedades de *P. vulgaris*. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) reportó en 2004 (Rosales Serna et al., 2004) haber generado 142 variedades mejoradas de *P. vulgaris*. Las principales variedades comerciales de frijol en México son “flor de mayo”, “azufrado” “mayocoba”, “peruano” y “flor de junio” entre otros. En las variedades que ha generado el INIFAP se han seleccionado características que les permiten ser resistentes por ejemplo a plagas y a la sequía, y aumentar su productividad aun creciendo en suelos pobres. Una de las variedades liberadas por el INIFAP es la variedad “Pinto Villa” (Sánchez et al., 2001), y es una de las más sembradas en el país. Sus características son la resistencia a la deshidratación que ocurre durante la sequía, y la resistencia de la semilla a infecciones micóticas como la antracnosis (enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*), y la roya (causada por *Uromyces phaseoli*), entre otras.

Generar cultivos resistentes, ha sido una importante estrategia para enfrentar las problemáticas en torno al cultivo del frijol, pero aún existe una gran laguna en el conocimiento, para comprender los fenómenos de respuesta a la deshidratación en el frijol. Esto es importante ya que la problemática en torno a su cultivo se debe principalmente a dos factores: 1) la falta de agua en la zona geográfica donde se siembra el frijol, y como se agudiza con el cambio climático y 2) que la producción del frijol depende principalmente del riego de temporal. Estos aspectos se discutirán a continuación.

1.1.b El cultivo de *P. vulgaris* y el impacto de la sequía

P. vulgaris es una de las principales especies que se siembran en México. En la Figura 1-1, se muestran los 13 principales productos agrícolas de México de acuerdo con el área que ocupa su cultivo, estos son: maíz (*Zea mays*), pastos (diversos géneros de la familia Poaceae), sorgo (*Sorghum spp.*), frijol (*P. vulgaris*), avena forrajera (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum spp.*), alfalfa verde (*Medicago sativa* L.), chile verde (*Capsicum spp.*), tomate verde (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem) y tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.). Como resalta la gráfica en rojo, el cultivo de *P. vulgaris* es el cuarto lugar en importancia en cuanto

al territorio sembrado, ocupando 1.89 millones de hectáreas. Esto resalta la contribución de este cultivo en la producción agrícola del país y muestra el impacto que tiene a nivel económico (INEGI, 2016).

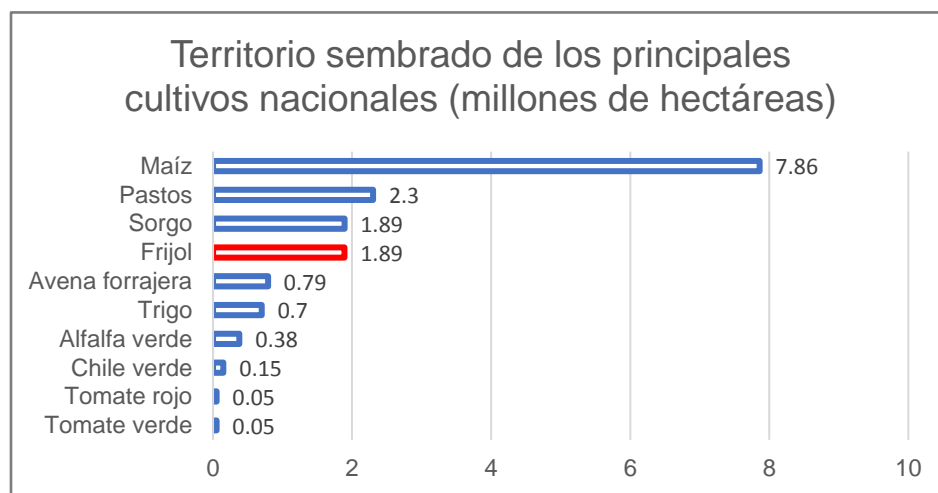


Figura 1-1. Superficie sembrada de los principales cultivos.

La gráfica muestra el número de hectáreas que se siembran de los principales cultivos en México. Las cifras están redondeadas por lo que el sorgo y el frijol (*P. vulgaris*) parecen tener el mismo número de hectáreas (datos tomados del Banco de Información INEGI, 2015)

Aunque México es uno de los principales productores de *P. vulgaris* en el mundo, no es autosuficiente en la producción de esta semilla. El INEGI (2016) reporta que en el periodo de enero a diciembre de 2014 se exportaron 2.5 millones de dólares en *P. vulgaris*. Esta cifra contrasta con los 10.3 millones de dólares importados de este producto, es decir, importamos más de cuatro veces la cantidad de *P. vulgaris* exportada. Además, México es el tercer productor de *P. vulgaris* de acuerdo con la extensión de territorio sembrado, sin embargo, es el quinto lugar en cuanto a volumen de semilla obtenida (González-Estrada et al., 2003), este hecho contrastante revela la baja eficiencia en la producción de *P. vulgaris* en relación a la extensión dedicada a su cultivo.

En México, el territorio donde se establecen los cultivos de *P. vulgaris* se encuentra principalmente en ambientes con precipitación errática y la sequía afecta su rendimiento. El altiplano mexicano es una región semiárida y es una de las principales regiones productoras de frijol alrededor del mundo. Esta leguminosa se cultiva principalmente en condiciones ambientales poco favorables que incluyen la falta de precipitación y la pobreza de los

suelos. El efecto de la sequía y en consecuencia, la deshidratación de las plantas durante la etapa reproductiva, conlleva a la pérdida parcial o total de la producción (Serna et al., 2000). Pese a las mejoras que han implicado la introducción y cultivo de especies mejoradas de frijol, este sector enfrenta problemáticas que afectan las ganancias de esta actividad económica. El principal factor de pérdidas económicas es la sequía ya que *P. vulgaris* se siembra en regiones con escasez hídrica.

La mayor producción agrícola del país se obtiene a través de los cultivos temporales, lo que revela el fuerte impacto del medio ambiente en la productividad agrícola. En el caso de *P. vulgaris*, el 70% del volumen de su producción es de temporal (Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial, 2016) es decir, este porcentaje está asociado a la estación de lluvias. Este hecho se ilustra en la Figura 1-2 donde se compara la producción anual de *P. vulgaris* obtenida a través del cultivo de temporal y a través del cultivo de riego. En total se producen 561 miles de toneladas de frijol al año por cultivos de temporal y 307 miles de toneladas por cultivos de riego (SIAP, 2014).

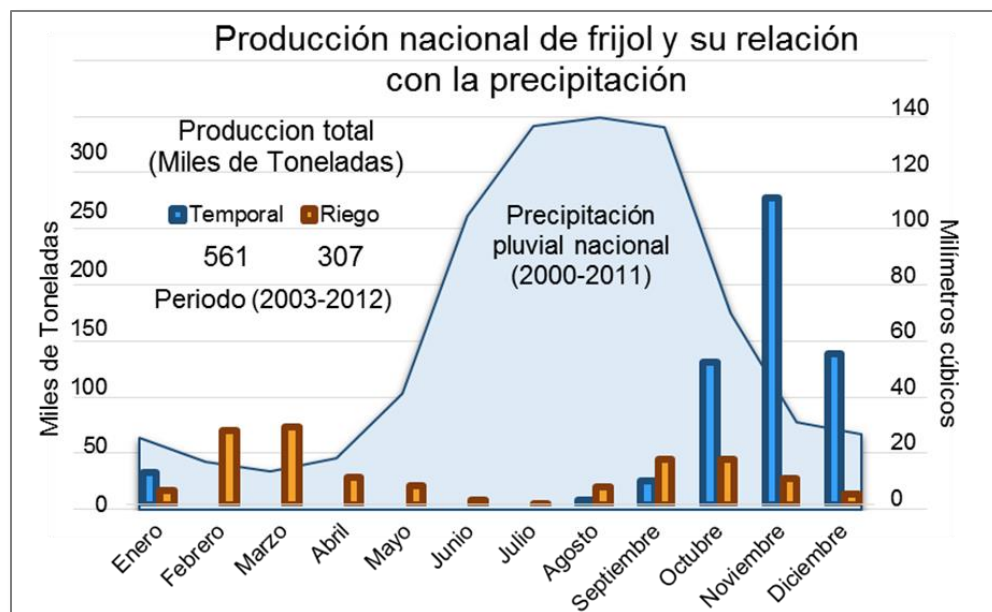


Figura 1-2. Producción de frijol nacional en el periodo 2003-2012. Se compara la producción de temporal y de riego (SIAP-SAGARPA en siap.gob.mx/estacionalidad-de-la-produccion). y se muestra la precipitación pluvial nacional del periodo 2000-2011, que muestra los meses de mayor precipitación (CONAGUA, Atlas Digital conagua.gob.mx/atlas/ciclo14.html).

En la Figura 1-2, se ilustra en el eje Y de la izquierda las toneladas de frijol que se cosechan cada uno de los meses del año y en el eje Y de la derecha la precipitación pluvial en milímetros cúbicos. De acuerdo con el eje Y de la izquierda, febrero y marzo son los meses con mayor producción de frijol debida al riego, pero durante todos los meses se continúa la cosecha del grano (barras anaranjadas). Por otro lado, en noviembre se obtiene la mayor cosecha de frijol debido al cultivo de temporal (barras azules) pero esta cosecha ocurre de agosto a enero únicamente. La gráfica también indica, de acuerdo con el eje Y de la derecha, que julio, agosto y septiembre son los meses más lluviosos. El pico de precipitación pluvial es sucedido por el pico de cosecha del cultivo de temporal en noviembre. Estos hechos permiten concluir que la mayor producción de frijol depende del clima y que está asociada con las lluvias (Comisión Nacional del Agua, 2012; Servicio de Información Agropecuaria y Pesquería, 2018). El análisis de esta información indica que el agua es un recurso limitante para la productividad del frijol de forma que entender como esta planta contienda con la restricción en la disponibilidad de agua será información importante para su mejoramiento biotecnológico.

En este panorama en que se pone de manifiesto la importancia del agua para el cultivo del frijol hay que considerar además el fenómeno del calentamiento global y el cambio climático que éste ha generado. El cambio climático afecta la agricultura y este efecto se acentúa en el cultivo del frijol debido a las regiones semiáridas donde se cultiva. Se documentó en 2011 que se obtuvo la mitad de producción de frijol esperada debido a la intensa sequía de ese año (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural Forestal y Pesquero, 2014).

De manera más detallada, en la Figura 1-3 A se muestra la superficie sembrada de *P. vulgaris* dividida en categorías de acuerdo con el número de hectáreas cultivadas en cada estado. Los estados con mayor área sembrada de *P. vulgaris* están resaltados en color morado indicando que de 38 mil a 509 mil hectáreas son cultivadas en estos estados. De acuerdo con este mapa, la mayor área sembrada de *P. vulgaris* está en el altiplano mexicano, una región de clima semiárido.

La Figura 1-3 B ilustra la distribución de la sequía sufrida en México durante 2012, este mapa compara el porcentaje de la precipitación pluvial de junio a agosto de 2012

respecto al promedio de la precipitación ocurrida entre 1961 a 1990. Las zonas en café identifican una disminución porcentual de la precipitación en 2012 respecto al periodo anterior mencionado y las zonas en azul identifican un aumento porcentual en la precipitación respecto al mismo período (Overpeck, 2013).

De esta forma, los mapas de la Figura 1-3 ilustran que la precipitación disminuyó considerablemente durante un periodo de sequía en la región de la altiplanicie que coincide con la región donde se cultiva el frijol (áreas en rojo en ambos mapas señalan la misma región). De aquí podemos concluir que la sequía es uno de los principales problemas que impactan el cultivo del *P. vulgaris* y que es un problema que se agravará en el futuro cercano debido al cambio climático. En este sentido, se ha vuelto de suma importancia el estudio de la fisiología del frijol y de los diferentes aspectos que afectan la resistencia de éste al estrés por falta en la disponibilidad de agua (González-Sánchez et al., 2000; Hardy, 2010).

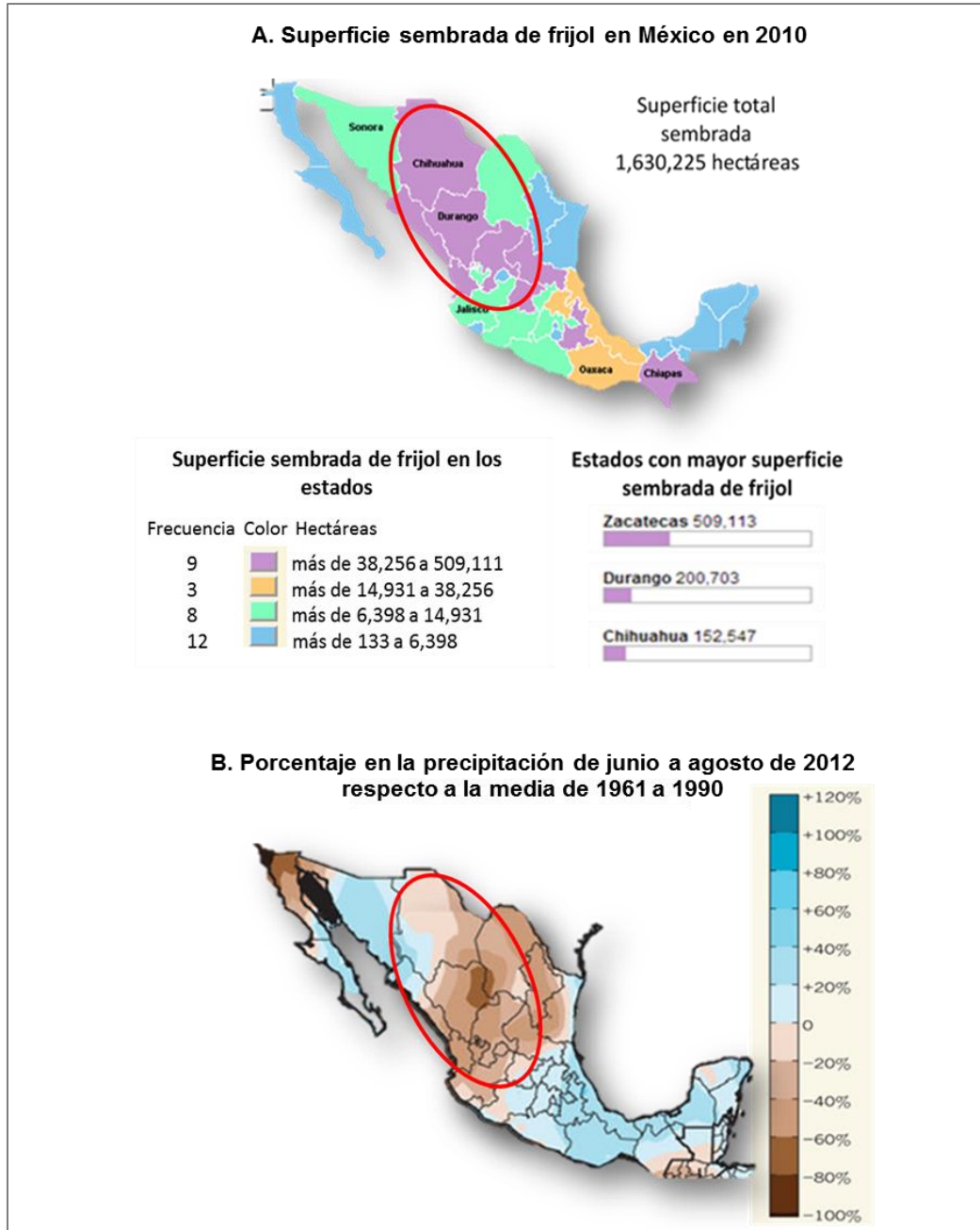


Figura 1-3. Superficie sembrada de *P. vulgaris* (frijol) en 2010 y el fenómeno de sequía en México. En el mapa A, se muestran los estados de México, identificados por la superficie de sembrada de *P. vulgaris* (INEGI, www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx). En el mapa B, se ilustran áreas donde porcentaje de la precipitación de junio a agosto de 2012 con respecto a la media 1961 a 1990 (Overpeck, 2013), cero refleja una precipitación diciente en los periodos comparados, el color azul identifica un incremento en la precipitación y el color café una disminución en la precipitación. La región con mayor superficie sembrada de *P. vulgaris* coincide con la región más afectada por la sequía, marcada en círculos rojos.

1.1.c El estudio del *P. vulgaris* y las leguminosas

Para el estudio de las leguminosas, las primeras plantas en establecerse como modelos fueron *Medicago truncatula* Gaertn. y *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen, sin embargo, hoy en día existen otras plantas que al contar con un genoma secuenciado y diversas herramientas técnicas para su estudio constituyen modelos de estudio de leguminosas. En total, existen actualmente veintiséis genomas de plantas pertinentes a la Familia Fabaceae cuyo genoma está albergado por el NCBI (Agarwala et al., 2016), las más importantes son: *Medicago truncatula* (usada comúnmente como forraje), *Lotus japonicus* (también usada como forraje), *Glycine max* (L.) Merr. (comúnmente conocida como soya, tiene múltiples usos como forraje y para alimentación humana), *P. vulgaris* (el cual es usado para consumo humano directo), *Cicer arietinum* L. (conocido como garbanzo, es usado para consumo humano) y *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (conocido como arveja, es usado para consumo humano). *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek (frijol mungo, es usado para consumo humano), *Vigna angularis* *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi y H.Ohashi (frijol Azuki, es usado para consumo humano directo). *Vigna unguiculata* L. (leguminosa tropical que es una de las principales fuentes de proteínas de la dieta en la India), *Arachis ipaensis* Krapov. y W.C.Greg. (cacahuete silvestre), *Glycine soja* Siebold & Zucc. (leguminosa cultivada para extraer el aceite de soya de glicina que se usa en productos cosméticos), *Vicia faba* L. (leguminosa usada para consumo humano directo), *Arachis duranensis* Krapov. y W.C.Greg. (leguminosa silvestre emparentada con el cacahuete), *Trifolium pratense* L. (leguminosa usada para forraje y abono), *Lupinus angustifolius* L. (cultivo australiano poco domesticado usado para forrajeo y consumo humano), *Trifolium subterraneum* L. (llamado trébol subterráneo, es usado como forraje) (Agarwala et al., 2016; Picard et al., 2013). Estos modelos poseen diferentes propiedades con fortalezas y debilidades en cada caso.

La soya es uno de los modelos más importantes de leguminosas debido a que se han obtenido protocolos para su transformación estable (Picard et al., 2013). *P. vulgaris* es también una especie de interés agronómico y es referida como la leguminosa más importante usada para consumo humano directo ya que es la principal fuente de proteínas en países como México y Brasil (Broughton et al., 2003) y conforma uno de los cultivos más antiguos junto al maíz. En torno a *P. vulgaris* se han desarrollado diversas líneas de investigación entre las cuales destaca el estudio de su relación simbiótica con bacterias fijadoras del nitrógeno, la generación de líneas resistentes a diversos factores

medioambientales y con mayor productividad, y el estudio de su respuesta a diversos factores de estrés.

Diversas variedades de *P. vulgaris* pueden ser crecidas en condiciones de laboratorio e invernadero. *P. vulgaris* alcanza su madurez alrededor de los 4 meses de ser sembrado (dependiendo de la variedad) por lo que su ciclo de reproducción no es largo y además ofrece gran cantidad material biológico para su análisis debido a las dimensiones de la planta. Se han establecido sistemas de crecimiento en varios sustratos y en sistema hidropónico. Actualmente el genoma de *P. vulgaris* G19833 (Project ID: 400630 (Nordberg et al., 2014)), una variedad de origen andino ya se ha secuenciado, ensamblado, anotado y se ha puesto a disposición del público a través del portal web Phytozome.net (Goodstein et al., 2012), (www.phytozome.net). También, recientemente Vlasova y colaboradores (2016), secuenciaron el genoma del *P. vulgaris* mesoamericano, abriendo una puerta al análisis comparativo.

Una de las limitaciones de este modelo biológico ha sido la dificultad de su transformación genética, la cual es una herramienta importante para la ingeniería genética. Actualmente la estrategia que ha logrado algunos resultados ha sido la transformación mediada por bombardeo de partículas, sin embargo la tasa de transformación es baja (Mukeshimana et al., 2012). Aunque este continúa siendo un reto, se han desarrollado sistemas de transformación transitoria en raíces pilosas mediante *Agrobacterium rhizogenes* lo que ha permitido explorar algunos fenómenos *in vivo* (Estrada-Navarrete et al., 2006).

1.2 La restricción en la disponibilidad de agua es un factor de estrés

Las plantas son organismos sésiles por lo que han desarrollado diversos mecanismos que les permiten contender con las condiciones de un medio que cambia constantemente, estas condiciones externas se vuelven estresores cuando comprometen el desarrollo óptimo o reproducción de la planta (Bohnert, 2007). El estrés se puede medir a través de su impacto en aspectos de la planta como su crecimiento, en su supervivencia y en su productividad (visto como cantidad de semillas obtenidas) (Taiz y Zeiger, 2002, 2010).

Uno de los diversos problemas que enfrentan las plantas es que el agua no esté disponible en su medio, y en particular implica una problemática para el cultivo del frijol como se estableció en la sección anterior.

1.2.a Las plantas están expuestas al estrés abiótico

Los factores externos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas se pueden dividir en dos grandes grupos, los factores bióticos y abióticos. Los primeros son originados por otros organismos, un ejemplo de este fenómeno es la depredación por parte de los herbívoros; los segundos son aquellos factores como la luz que recibe la planta, o la disponibilidad de nutrientes y agua en el sustrato (Bray et al., 2000; Taiz y Zeiger, 2010). Las condiciones que se consideran como de estrés pueden diferir entre las especies vegetales, el estado de desarrollo y órganos afectados de la planta, así como la duración de la condición adversa. Los factores abióticos también tienen un impacto importante en los cultivos de interés comercial (Taiz y Zeiger, 2010). En condiciones de cultivo, las situaciones de estrés abiótico más comunes son la restricción en la disponibilidad de agua, la inundación, las temperaturas extremas y la alta concentración de iones en el suelo (Patakas, 2012).

El hecho de que las plantas colonicen prácticamente todos los ambientes de la tierra sugiere que han desarrollado mecanismos para contender con las diversas condiciones climáticas y los tipos de suelo alrededor del mundo, por lo que el concepto de estrés está íntimamente relacionado con lo que llamamos tolerancia al estrés. La tolerancia al estrés se refiere a la capacidad de la planta para sobrevivir y reproducirse frente a condiciones adversas (Redondo-Gómez, 2013; Taiz y Zeiger, 2002). La tolerancia al estrés aumenta cuando la planta ya ha sido sometida a las condiciones adversas previamente, a este fenómeno se le conoce como aclimatación. Además, la variación genética en una población vegetal puede ser sustrato de la selección natural a través del estrés, lo que conllevaría al fenómeno de la adaptación con el paso de las generaciones (Bohnert, 2007; Taiz y Zeiger, 2002). Los fenómenos biológicos que ocurren en una planta durante estos procesos son diversos y ocurren a varios niveles, el nivel anatómico, morfológico, fisiológico, celular, bioquímico, genético y molecular, integrando una respuesta coordinada (Redondo-Gómez, 2013; Taiz y Zeiger, 2002) .

1.2.b La sequía es un fenómeno climático

Como fenómeno del clima, la sequía es relevante a nivel económico por su impacto en la producción agrícola (Overpeck, 2013). La restricción en la disponibilidad de agua ocurre durante la sequía, fenómeno en el que convergen otros tipos de estrés abiótico como el calor o la alta salinidad del suelo. En todo el mundo, la sequía es uno de los factores que reducen la productividad agrícola (Overpeck, 2013; S Zhang et al., 2013).

Definimos a la sequía como un periodo largo sin precipitación, y debido a la diversidad de las condiciones climáticas en el mundo, esta definición puede ser ambigua. Se define a la sequía de cuatro formas según Marcos (2001). La sequía meteorológica se refiere a una disminución respecto a la media de la precipitación local. La sequía agrícola se define como la falta de agua suficiente para el desarrollo de un cultivo, ésta depende no solo del tipo de cultivo sino del estadio de desarrollo; la sequía meteorológica no necesariamente provoca la sequía agrícola. La sequía hidrológica se refiere a una disminución en el volumen de las aguas superficiales o subterráneas, la medición de este fenómeno no se puede considerar como una señal del inicio de un periodo de sequía, pero si para señalar su intensidad; además, por otro lado, los recursos hídricos son explotados por lo que su disminución puede deberse no solo a la falta de precipitación durante cierto período. La sequía socioeconómica se presenta cuando el periodo de sequía es tal que afecta las actividades urbanas, la creciente población actual y su demanda por el agua han generado que la sequía socioeconómica se presente aún con una leve sequía meteorológica (Marcos, 2001).

1.2.c Diversos fenómenos causan la restricción en la disponibilidad de agua

El principal factor medioambiental que afecta la productividad y estabilidad de las plantas es la restricción en la disponibilidad de agua. En condiciones naturales y en los campos de cultivo, hay hechos que restringen la disponibilidad de agua en el sustrato, por ejemplo, la alta cantidad de sales en el suelo, o el hecho de que el sustrato no sea capaz de retener la humedad (Taiz y Zeiger, 2010). Las plantas contienen un importante porcentaje de agua en sus tejidos y continuamente la absorben a través de la raíz y la pierden por transpiración al evaporarse principalmente de sus hojas cuando los estomas se

abren para captar CO₂ (Taiz y Zeiger, 2002). La sequía es un fenómeno en el que las plantas sufren déficit hídrico durante un cierto periodo, lo que las lleva a un proceso de pérdida de agua generando deshidratación de los tejidos vegetales. El déficit hídrico ocurre en las plantas cuando la tasa de transpiración a través de las hojas excede la tasa de absorción a través de la raíz (Bray, 1997).

En condiciones de deshidratación, las plantas experimentan fluctuaciones osmóticas, se marchitan, decrece su actividad fotosintética y durante el estadio reproductivo disminuye la fertilidad y baja su productividad. Existen diversos fenómenos asociados al estrés. Por ejemplo: incremento en la concentración de solutos, cambios en el volumen celular y la forma de la membrana, cambio en la turgencia de la célula y en el aspecto de las hojas, disrupción de los gradientes de potencial hídrico en la planta, pérdida de la integridad de la membrana y cambios conformacionales en las proteínas, acumulación de especies reactivas de oxígeno, disminución en la tasa fotosintética, entre otras (Bray, 1997; Hardy, 2010; Haiyan Li et al., 2011). El grado de daño que sufre una planta y la posibilidad de recuperarse del mismo dependen de su capacidad para integrar un mecanismo de respuesta de defensa a nivel celular y a nivel del organismo, de la duración, la severidad del estrés, así como los órganos más expuestos (Bray, 1997; Hardy, 2010; Haiyan Li et al., 2011).

La presencia de solutos en el agua del suelo afecta la eficiencia con la que las plantas toman el agua del sustrato ya que el movimiento del agua a través de la planta se da por gradientes de energía libre. El potencial hídrico (Ψ_h) es la magnitud más empleada para medir el estado de energía libre del agua, el cual depende del movimiento de las moléculas de este fluido. El potencial hídrico depende del potencial osmótico (Ψ_o , debido a la presencia de solutos), potencial mátrico (Ψ_m , debido a la interacción del agua con las partículas sólidas de la matriz del suelo), potencial gravitatorio (Ψ_g , debido a la fuerza que exige la gravedad sobre la columna de agua transportada) y de presión (Ψ_p , debido al peso de las capas de aire sobre la columna de agua transportada). Esto se relacionan de la siguiente manera:

$$\Psi_h = \Psi_o + \Psi_m + \Psi_g + \Psi_p$$

El agua se mueve en los sistemas, de lugares donde tiene una mayor energía libre (donde es más abundante) a donde tiene menor energía libre (donde se encuentra menos

disponible). El agua pura tiene mayor energía libre y la presencia de solutos en esta, disminuye su energía libre. Normalmente el agua que se encuentra en el suelo tiene mayor energía libre que el agua dentro de la planta, por lo que entra y se desplaza hacia las hojas donde se acumulan los productos fotosintéticos, lugar de menor energía libre debido a la cantidad de solutos que afectan el Ψ_o . Por el contrario en un suelo muy salino (menor Ψ_o) o durante un periodo de sequía (menor Ψ_o y Ψ_m), la energía libre del agua es mucho menor en el suelo que dentro de la raíz impidiendo el flujo del agua de suelo hacia la planta (Arroyo, 2012; Bray, 1997).

La mayoría de las plantas pasan por periodos de deshidratación por lo menos de forma transitoria, además la deshidratación también puede ser un componente normal dentro del ciclo de vida de una planta. Por ejemplo, muchas plantas producen estructuras especializadas que toleran una alta deshidratación tales como la semilla, esporas y el grano de polen, las cuales contienen células que mantienen su viabilidad, esto sugiere que poseen mecanismos que les permiten sobrevivir a esta condición (Bray, 1997; Ingram y Bartels, 1996).

1.3 Respuesta de las plantas al estrés

Los ajustes que las plantas llevan a cabo para contender con el estrés alteran su desarrollo, los mecanismos metabólicos, su fisiología y la expresión genética. Estas respuestas son exitosas en la medida en que el organismo pueda sobrevivir y mantener su capacidad de reproducirse a pesar de las condiciones adversas (Redondo-Gómez, 2013).

El primer evento durante el fenómeno de estrés es la percepción del estímulo estresor lo que a continuación, desencadena las respuestas. Se ha propuesto que en las plantas, como en otros eucariontes, la percepción de los estímulos exteriores tanto benéficos como perjudiciales ocurre a través de proteínas transmembranales (proteincinasas de serina-treonina (STPK) y tirosina) que son capaces de percibir una señal en el exterior de la célula y transmitirla al citoplasma desencadenando la respuesta (Osakabe et al., 2013). Aún se sabe poco de cómo se percibe el estrés abiótico en plantas. Tras la percepción del estrés, se desencadena una serie de respuestas.

Las respuestas a estrés pueden clasificarse en general en tres grupos (Madhava, 2006): respuestas morfológicas (principalmente relacionadas al crecimiento), respuestas fisiológicas y respuestas moleculares (relacionadas principalmente con la expresión génica). A continuación, se detallan estas respuestas enfatizando la respuesta molecular.

1.3.a Respuestas morfológicas y fisiológicas

Diversos tipos de estrés abiótico provocan respuestas morfológicas similares en diferentes especies vegetales, éstas contribuyen al proceso de aclimatación. Hay tres fenómenos morfológicos que ocurren principalmente en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, estos son: Inhibición de la elongación, estímulo localizado de la división celular y cambios complejos en el proceso de diferenciación celular (Madhava, 2006; Patakas, 2012). Los cambios morfológicos son generados en última instancia por cambios en los patrones de división celular y en la tasa de elongación de las células y la reorientación del crecimiento (Madhava, 2006; Yokota et al., 2006). Estos procesos dependen de la homeóstasis de moléculas llamadas morfógenos, las principales son las fitohormonas auxinas, el etileno, y por otra parte, las especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (Patakas, 2012).

Cabe mencionar que los cambios morfológicos dependen de cambios en el metabolismo. El ajuste fisiológico frente a la deshidratación altera la tasa de transpiración, lo que reduce el transporte de agua desde el medio. También se altera el metabolismo energético, se altera la respiración y se reduce la tasa fotosintética. En las primeras etapas de la respuesta a la deshidratación, se detiene la síntesis de ATP y se deja de regenerar la ribulosa 1,5-bifosfato, azúcar que participa como sustrato para la fijación del carbono, esto cambia el balance energético impidiendo a la planta aumentar su biomasa. Posteriormente, durante la deshidratación severa o prolongada, ocurre el daño definitivo a la maquinaria fotosintética, principalmente al fotosistema II donde ocurre la fotólisis del agua e inicia el transporte de electrones (Yokota et al., 2006). Estas respuestas son coordinadas por hormonas, por lo que se observa un cambio en el balance hormonal.

A nivel fisiológico, los mecanismos que las plantas usan para enfrentar la deshidratación son entre otros: 1) La reducción en la pérdida de agua, cuando la planta

percibe un incremento en la presión de vapor de la hoja al aire, cierra los estomas reduciendo la pérdida de agua por transpiración. 2) Protección de la maquinaria fotosintética. La pérdida de agua genera una disminución en la turgencia de las hojas, en este estado las hojas no reciben de forma directa los rayos de luz. 3) El ajuste osmótico. Para evitar la pérdida excesiva de agua, las plantas sintetizan y acumulan solutos compatibles que son compuestos orgánicos tales como polialcoholes como el sorbitol y el manitol, iones como el potasio, aminoácidos como la prolina y carbohidratos solubles. Este ajuste le permite a la planta cambiar el potencial osmótico de la célula y por lo tanto el potencial hídrico (Oliver et al., 2010; Redondo-Gómez, 2013; Yokota et al., 2006).

1.3.b Respuesta molecular

La respuesta molecular, fisiológica y morfológica están integradas, y participan en la respuesta a estrés. Los fenómenos moleculares ligados a la expresión génica dictan en último término la presencia de una proteína o RNA en determinada condición. La presencia de una proteína funcional depende de varios puntos de regulación durante su biogénesis.

La regulación epigenética, ocurre a nivel de la cromatina, una estructura dinámica cuyo estatus de compactación se modula principalmente a través de tres mecanismos: (1) modificación covalente del DNA y/o de las histonas que lo empaquetan, (2) la presencia de complejos remodeladores del DNA y (3) remodelación de la cromatina dirigida por RNA (Lewin et al., 2011). El siguiente paso es la regulación transcripcional, debido a que la expresión de un gen está determinada fundamentalmente por la interacción de secuencias específicas en este, y sus factores represores o activadores. Las secuencias reguladoras son: promotor, potenciadores (*enhancers*) y aislantes (*insulators*) (Berg et al., 2007).

La regulación del mRNA ocurre a través del Cap, secuencias 5' y 3', las señales de procesamiento de intrones y exones en el cuerpo del mensajero, y la poliadenilación en el extremo 3' del mensajero (Lewin et al., 2011). Todas estas señales, determinan su exportación al citosol mediante los poros nucleares, su vida media y su reclutamiento a los ribosomas (Alberts et al., 2008; Lewin et al., 2011). La localización del mRNA también es regulada, ya que pueden ser transportados a regiones particulares del citoplasma para dirigir la síntesis del péptido que codifican de manera localizada, o entrar a vía de síntesis

y secreción a través del retículo endoplásmico rugoso (REr) (Alberts et al., 2008; Martin y Ephrussi, 2009). La traducción del mRNA, se modula por diversos factores que regulan el proceso durante la iniciación, elongación y terminación (Alberts et al., 2008). La vida media del mensajero está regulada por la estabilidad de mensajero y su degradación lo que determina que tanto se puede traducir un mensajero, el acortamiento de la cola de poli A mediada por exonucleasas 3' → 5' (Alberts et al., 2008). La regulación postraduccional implica el plegamiento adecuado de las proteínas, la unión de sus cofactores y las modificaciones covalentes (fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, etc.) que requiere para ser funcional (Alberts et al., 2008).

Los fenómenos descritos antes, están enfocados en un tipo particular de gen cuyo producto final es una proteína; pero existen genes cuyo producto activo es una molécula de RNA. Este grupo de genes se denominan RNAs no codificantes (ncRNAs por sus siglas en inglés). Estas moléculas de RNA participan en diversos procesos.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs de cadena sencilla de aproximadamente 21 a 24 nucleótidos de longitud, componen un grupo amplio de RNAs no codificantes que son capaces de regular a nivel postranscripcional la actividad de sus RNAs mensajeros (mRNAs) blanco guiando por complementariedad de bases al Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés), respecto a lo que se abundará en las siguientes secciones. Los miRNAs son uno de los grupos más importantes dentro de los RNAs pequeños no codificantes (sncRNAs por sus siglas en inglés), sin embargo, los sncRNAs participan en varios procesos. La regulación de la expresión genética mediada por miRNAs en plantas y animales, juega un rol clave en diversos procesos biológicos como el desarrollo y las respuestas al estrés (Axtell et al., 2011; B Li et al., 2011). Su biogénesis y mecanismo de acción se detallarán a continuación.

1.4 Los miRNAs son RNAs pequeños y participan en la respuesta a estrés

En 1993 se publicaron en la revista Cell un par de artículos sobre el gen *lin-14* en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. El gen *lin-14* codifica para una proteína que participa en el desarrollo y se describió que su acumulación es afectada por la presencia de *lin-4* un gen que no se traduce y cuya secuencia posee complementariedad a la región

3' no codificante (3'UTR) de lin-14 (RC Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Sin saberlo, se estaba describiendo el primer miRNA y su mRNA blanco. Lee y colaboradores (1993) discuten la posibilidad de que se trate de un RNA regulatorio, aunque comparándolo con los ejemplos conocidos hasta ese momento, por ejemplo, con el fenómeno de inactivación del cromosoma X a través de Xist, lin-4 parecía ser muy pequeño (RC Lee et al., 1993). Siete años más tarde se descubrió a lin-7, otro RNA pequeño que comparte características con lin-4, y además se encuentra evolutivamente conservado en los metazoarios (Berezikov, 2011; Tétreault y De Guire, 2013).

En 2002, Reinhart y colaboradores publicaron el hallazgo de que los miRNAs se encuentran presentes en plantas, identificando 16 miRNAs en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 8 de los cuales se conservan en *Oriza sativa* (arroz). La prevalencia de miRNAs entre plantas y animales indica que este mecanismo se originó durante la evolución temprana de los eucariontes, ya que tuvo que ser parte del ancestro de estos grupos. Actualmente se han identificado numerosos miRNAs en diversas especies de plantas. Estos esfuerzos han ayudado a delimitar la definición de miRNA, la descripción de su biogénesis y el hallazgo de las funciones que desempeñan. A continuación, describiremos estos procesos en plantas.

1.4.a Los miRNAs son ncRNAs pequeños

Los ncRNAs se pueden clasificar en dos grandes grupos según su función. En el primer grupo se encuentran aquellos que son producto de los genes de mantenimiento celular. Estos son los que participan en procesos biológicos básicos como los tRNAs, rRNAs, mRNAs en general, los RNAs que participan en el proceso de maduración de los mRNAs y el RNA molde de la telomerasa entre otros (Collins, 2011).

El otro grupo se refiere a los RNAs que interfieren la expresión genética por lo que se denomina a este fenómeno interferencia de RNA (iRNA del inglés *interference RNA*). Dentro de este grupo se encuentran diversos tipos, los más estudiadas son los miRNAs, los RNAs pequeños de interferencia (*small interference RNA*, siRNAs), los RNAs que interactúan con Piwi (*piwi interacting RNA*, piRNAs) y los RNAs largos no codificantes (*long non coding RNAs*, lncRNA). El tamaño de la secuencia de RNA no codificante ha sido un

factor importante dentro de la identidad de cada grupo. Los RNAs pequeños no codificantes (*small non coding RNAs*, sncRNAs) van de 20 a 24 nucleótidos (lo que incluye a los miRNAs, siRNAs y piRNAs), por otro lado, los lncRNAs pueden llegar a tener más de 200 bases. Todas estas especies de ncRNAs participan en la regulación de la expresión genética a diferentes niveles, que van de la degradación de moléculas de RNA guiada por complementariedad de bases a silenciamiento genético mediado por rearrreglos de la cromatina (Collins, 2011). De todos estos, los miRNAs son un grupo particular de sncRNAs cuyo mecanismo está relacionado al de los siRNAs. Su biogénesis e importancia se describen a continuación.

1.4.b Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs se encuentran presentes las plantas y en los animales y recientemente se ha demostrado su presencia en los hongos (Jiang et al., 2012). Aunque existen diferencias entre las rutas de biogénesis de los miRNAs entre plantas y animales, muchas de las características de la biogénesis se conservan entre estos grupos, a continuación, se describe la biogénesis enfatizando cómo se lleva a cabo en plantas (Figura 1-4).

Los miRNAs están codificados en el genoma y son referidos como genes *MIR*. En plantas, la mayoría de los miRNAs poseen su propia unidad transcripcional por lo que se localizan principalmente en zonas intergénicas (Rogers y Chen, 2013). Por otro lado, en animales es común encontrar grupos de miRNAs que además se transcriben como precursores policistrónicos. Los transcritos policistrónicos son raros en plantas, pocas familias de miRNAs los poseen, por ejemplo miR156, miR166 y miR395 cuyos precursores codifican dos o más miembros de la familia (Naqvi et al., 2012). De La Rosa y colaboradores (2018), reportaron reportó un precursor bicistrónico en *P. vulgaris* que posee a dos miembros de diferentes familias, miR398 y miR2119 también presente en otras leguminosas.

La RNA polimerasa II transcribe al gen *MIR* sintetizando al miRNA primario (primiRNA), este transcrito posee estructura secundaria que incluye la formación de estructuras tipo tallo-asa, y su longitud va de 70 a varios cientos de nucleótidos de longitud (Axtell et al., 2011; Zhu et al., 2013). Este mensajero posee un cap 5' y una cola poli-A 3' como ocurre

en transcritos que codifican para proteínas. Además, puede contener sitios canónicos de procesamiento de intrones. De esta forma, este mensajero denominado miRNA primario contiene elementos que son sujetos de regulación postranscripcional como otros mRNAs (ver sección 1.3.b y (Naqvi et al., 2012)).

La maquinaria que lleva a cabo el procesamiento de los miRNAs incluye cuatro actores principales, *DICER-LIKE 1* (DCL1), *HYPONASTIC LEAVES 1* (HYL1), *SERRATE* (SE) y *HUA ENHANCER 1* (HEN1). Los pri-miRNAs son procesados por DCL1, una RNAsa tipo III junto con SE y HYL1. DCL1 es una endorribonucleasa que corta RNA de doble cadena dejando dos nucleótidos desapareados en el extremo 3'; la proteína SE tiene motivo de dedos de Zinc, se une a RNA de doble cadena y es importante para la acumulación de varios miRNAs, se asocia en el núcleo con DCL y HYL1. HYL1 es una proteína que se une a RNA de doble cadena y participa en la precisión y eficiencia del procesamiento de los miRNAs (Szarzynska et al., 2009). Estas proteínas forman un complejo con el pri-miRNA en el núcleo donde lo procesan. Usualmente DCL1 corta al pri-miRNA por la base del tallo produciendo el miRNA precursor (pre-miRNA), y un segundo corte elimina el asa terminal de la estructura de tallo-asa y produce el dúplex miRNA/miRNA*. Este proceso en plantas es llevado a cabo en los cuerpos D dentro del núcleo (Axtell et al., 2011).

En el núcleo, el dúplex miRNA/miRNA* es 2'-O-metilado en los extremos 3' de cada hebra por la metiltransferasa HEN1 y tras esta modificación es exportado por HASTY (HST) al citoplasma. Se sabe que el miRNA maduro interactúa con ARGONAUTE 1 (AGO1), que es la enzima núcleo del complejo RISC (Axtell et al., 2011; Rogers y Chen, 2013). En este punto el miRNA es una molécula de cadena sencilla, la cadena complementaria que no se carga en AGO1 se denomina miRNA* y usualmente se degrada rápidamente.

En plantas, para que el miRNA guíe a RISC a su mRNA blanco, se requiere el apareamiento perfecto o casi perfecto de la secuencia blanco en el mRNA con la secuencia del miRNA maduro. En plantas, los sitios blanco de miRNAs se ubican principalmente dentro del marco abierto de lectura en los mRNAs y en menor proporción en las regiones 5' o 3' UTRs, situación común en animales (Axtell et al., 2011).

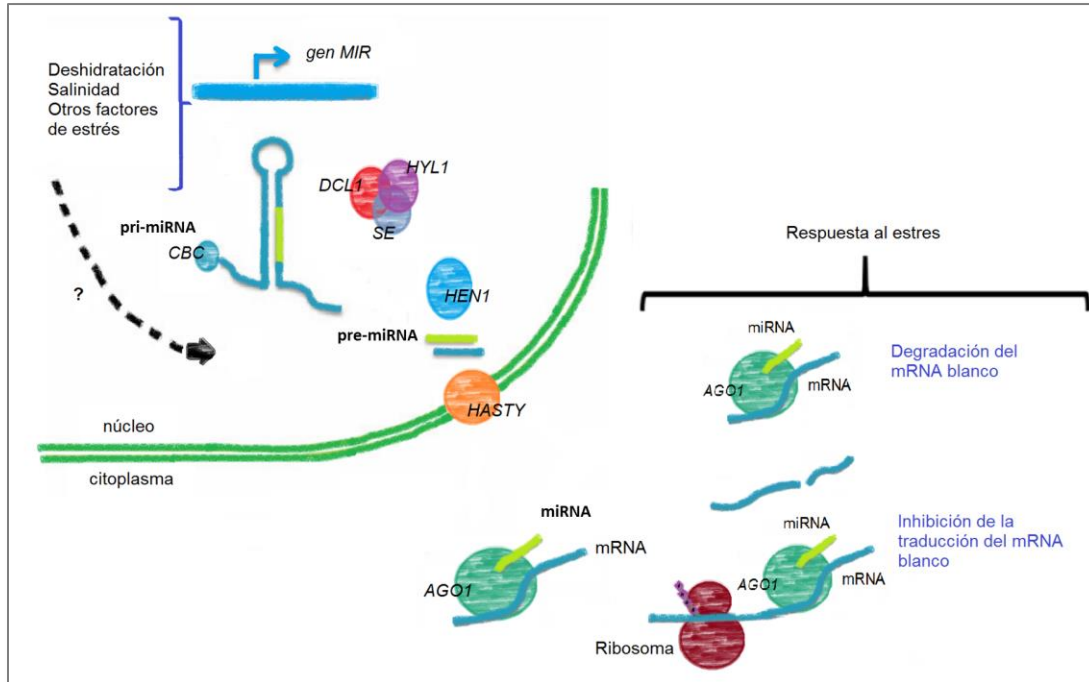


Figura 1-4. Biogénesis de miRNAs. La biogénesis de los miRNAs se ve afectada por factores de estrés como salinidad y deshidratación, que a través de su actividad (degradación e inhibición de la traducción) afectan a sus mRNAs blanco, a través de lo cual participan en la respuesta a estrés. DCL (DICER-LIKE 1), HYL1 (HYPOASTIC LEAVES), SE (SERRATE), HEN1 (HUA ENHANCER 1) AGO1 (ARGONAUTA 1) Modificado de Covarrubias y Reyes (2009).

1.4.c Mecanismo de acción de los miRNAs y su participación en el estrés

En plantas, el principal mecanismo de regulación de los miRNAs sobre sus mRNAs blanco, es el corte mediado por AGO1. En algunos casos la complementariedad del mRNA blanco y el miRNA que lo regula no es completa. Cuando ocurren desapareamientos en la región central del dúplex mRNA-miRNA, el miRNA y el mensajero se reconocen pero este último no se corta de inmediato por AGO1 (Axtell et al., 2011), aunque finalmente se degrada.

El análisis de los mRNAs blanco de miRNAs en plantas ha mostrado que la mayoría de mRNAs blanco son factores de transcripción (Reyes y Chua, 2007), y que tienen un papel relevante durante el desarrollo y en la respuesta al medio ambiente. Existe una íntima relación entre la respuesta al estrés y el desarrollo además, durante estos fenómenos

participan las hormonas vegetales. El estudio de la participación de los miRNAs durante el estrés se ha sondeado a partir de múltiples experimentos como el estudio de mutantes nulas de proteínas involucradas en su biogénesis. Por ejemplo, la mutante nula de *HYL1* es hipersensible al ácido abscísico (ABA) (Sunkar et al., 2012). El ABA es una hormona vegetal que participa durante respuestas a estrés biótico y abiótico, por lo que se le ha considerado una molécula señalizadora de estrés, aunque su rol no está acotado a este fenómeno (Raghavendra et al., 2010).

Otra evidencia es la modulación de la acumulación de miRNAs durante diversos tipos de estrés. De forma muy interesante, hay diversos miRNAs que se han descrito como responsivos a condiciones de deshidratación y/o estrés salino, por ejemplo miR393, miR160 y miR167 en diversas especies de plantas (Sunkar et al., 2012).

Un ejemplo de miRNA que participa en estrés y que además se encuentra relacionado a la vía de señalización mediada por la hormona ABA, es miR159. Este miRNA se acumula en respuesta a deshidratación, y se ha mostrado que también se acumula en respuesta al ABA (Reyes y Chua, 2007). Los mRNAs blanco de este miRNA son los factores de transcripción tipo MYB (R2R3-type myeloblastocis domain): MYB101 y MYB33. Para entender la participación de miR159, a continuación, se describe la vía de señalización que media el ABA.

La vía de señalización en que participa el ABA ocurre en tres fases: activación del receptor, transducción de la señal, y respuesta. Se han descrito tres tipos de receptores para el ABA, un receptor membranal, un receptor cloroplástico y un receptor soluble citoplásmico de dominio START, denominado *PYRABACTIN RESISTANCE I* (PYRI) y sus homólogos, las proteínas PYR-like (PYL). Estos son los principales receptores del ABA y mediante los que ocurre la señalización en respuesta a estrés abiótico (SC Lee y Luan, 2012; Light, 2013). En la primera fase, el ABA se une a estos receptores PYR/PYL, los cuales inhiben a un grupo de proteínas fosfatasa tipo 2C (PP2C), dentro de las cuales se encuentran *ABA INSENSITIVE 1* y *2* (ABI1 y ABI2). Las PP2C actúan sobre proteínas cinasas tipo 2 relacionadas con SNF1 (SNRK2), inhibiendo su función. Las SNRK2 a su vez, son reguladores positivos de la respuesta al ABA, mediante la fosforilación de sus proteínas blanco, entre las cuales se encuentran factores de transcripción como los ABRE binding factors (ABFs). Los blancos de esta cascada de regulación incluyen canales iónicos

como el canal de potasio KAT1, proteínas que regulan el balance redox celular como RbohF, una NADPH oxidasa y, también, otros factores de transcripción tipo ABF (Light, 2013). Los genes de respuesta al ABA participan en diferentes procesos, entre ellos, crecimiento y división celular, energía y metabolismo, síntesis de proteínas, comunicación celular, respuesta de rescate y defensa, entre otros (Hoth et al., 2002). Se sabe que cerca de un 10% de los genes de *A. thaliana* responden al ABA (Tian et al., 2015).

Regresando a miR159, se sabe que la acumulación de este miRNA durante la germinación depende del ABA (Reyes y Chua, 2007). Ya que el ABA induce la dormancia en la semilla, es necesario que disminuyan sus niveles para que ocurra la germinación. El ABA se acumula además en respuesta a estrés abiótico arretando el crecimiento del embrión tras la germinación. Por otro lado, MYB33 y MYB101, que son reguladores positivos del ABA, son a su vez blanco de regulación negativa a través de miR159, de esta forma, se ha postulado que miR159 constituye una retroalimentación negativa de la respuesta al ABA, que lleva a un retorno rápido al estado basal después de la exposición a estrés (Reyes y Chua, 2007). Este es un ejemplo del papel de los miRNAs en la regulación fina de las respuestas de las plantas al estrés.

1.4.d Estrategias para el estudio de los miRNAs y sus mRNAs blanco

El estudio de las vías de regulación que median los miRNAs consiste en dos partes. La identificación y análisis de los miRNAs, y la identificación y análisis de los mRNAs blanco que son regulados. La identificación de miRNAs se ha logrado mediante diversas estrategias. En primer término, los ensayos tipo Northern blot, permitieron en un principio identificar estas cadenas cortas de RNA. La implementación de tecnologías modernas ha permitido un enfoque global de la identificación de miRNAs a través secuenciación masiva de RNAs pequeños y el análisis de las características que deben cumplir estas especies pequeñas de RNA. Entre éstas están: ser codificados en el genoma en una unidad transcripcional, su precursor debe adquirir una conformación secundaria que cumple con ciertas características y su forma madura debe de tener cierta longitud y acumulación, además se espera la formación del miRNA estrella (miRNA*), es decir, la cadena complementaria al miRNA originada durante su biogénesis (Meyers et al., 2008).

El estudio de la participación de un miRNA en un proceso biológico requiere conocer los mRNAs blanco que regula. Varios enfoques se han implementado para encontrar los mRNAs blanco. Entre estos está el análisis bioinformático, los ensayos tipo *mRNA expression array*, y la identificación de mRNAs blanco mediante la estrategia de amplificación rápida de 5' terminales (*Rapid Amplification of cDNA Ends*, 5' RACE) (Thomson et al., 2011).

En el primer caso, el análisis bioinformático ofrece la ventaja de que es una estrategia de análisis global, la cual es posible, si se dispone del genoma de la especie estudiada. La debilidad de esta estrategia radica en que ofrece candidatos que deben ser corroborados uno a la vez con evidencia experimental. En el segundo caso, los ensayos tipo *mRNA expression array*, consisten en aumentar la expresión de un miRNA y analizar la respuesta en la acumulación de mRNAs durante esta condición, lo que ofrece evidencia experimental del efecto de un miRNA sobre sus mRNAs blanco a escala del genoma. Sin embargo, los cambios en la acumulación de los mRNAs blanco, puede deberse a efectos secundarios, por lo que no es una prueba directa, y es necesario realizar análisis complementarios como el que ofrece el tercer caso, el 5' RACE (Jones-Rhoades et al., 2006). El 5' RACE es la estrategia que ofrece evidencia directa, de la degradación de un mRNA mediante un miRNA. Esta técnica implica la ligación específica de un adaptador al extremo 5' sin cap de un transcrito que es producto del corte de las proteínas AGO. Estas secuencias se someten a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con una secuencia complementaria a esta región como oligonucleótido, y un oligonucleótido complementario a la cola de poliA. Luego se usan oligonucleótidos específicos para amplificar la población de interés, clonarla y someterla a secuenciación. Aunque esta estrategia revela además el sitio de corte del miRNA sobre el mensajero, tiene un alcance corto en cuanto al número de mRNAs blanco de miRNAs que se pueden identificar a la vez (Thomson et al., 2011). Otros puntos de partida son estrategias como la inmunoprecipitación de componentes de RISC y la secuenciación de los RNAs asociados a este, que también representa un estrategia global que ha aportado algunos pares miRNA-mRNA blanco (Thomson et al., 2011).

Otra estrategia de investigación que está basada en 5' RACE es el Análisis de Degradoma (Degradome analysis, *Degradome sequencing*, *Degradome-seq*) (Addo-Quaye et al., 2008). Este integra el 5' RACE modificado, la secuenciación masiva, y la bioinformática para encontrar mRNAs blanco de miRNAs. Esta estrategia también se llama

Análisis paralelo de RNAs 5' terminales (*Parallel Analysis of RNA Ends*, PARE) (German et al., 2009).

1.4.e Análisis de degradoma

El análisis de degradoma es un método experimental que permite identificar mRNAs blanco de miRNAs de forma global (Addo-Quaye et al., 2008). No requiere que existan predicciones bioinformáticas a cerca de los mRNAs blanco o la sobre expresión de mRNAs, y constituye evidencia de la degradación de un mRNA dirigida por un miRNA. El procedimiento se divide en dos partes, por un lado, la purificación de RNA y selección de mRNAs degradados para su secuenciación, y por el otro, el procesamiento bioinformático de los resultados de secuenciación masiva mediante CleaveLand (Addo-Quaye et al., 2009). En la Figura 1-5 se ilustran los pasos generales de la primera fase.

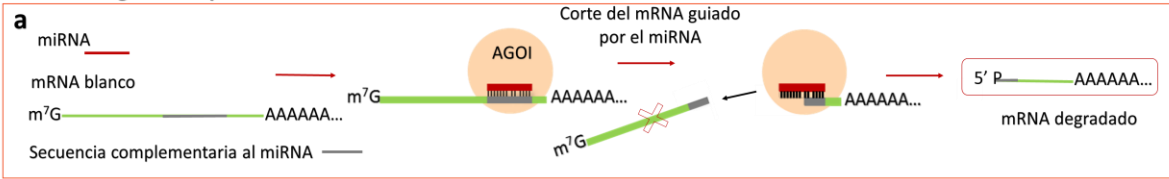
En el panel “a” de la Figura 1-5, se muestra cómo un miRNA guía a AGO1 a su mRNA blanco, el miRNA se empalma en la secuencia complementaria y AGO corta al mRNA generando un fragmento de RNA que posee parte de la secuencia blanco, un extremo 5' monofosfatado (5' P) y un extremo 3' poliadenilado. En la primera fase, el análisis de degradoma selecciona una población de mRNAs degradados con estas tres características, los cuales incluyen, pero no se limitan, a los mRNAs blanco de miRNAs ya que estas características las poseen otros mRNAs degradados por otros sncRNAs. El análisis bioinformático (CleaveLand) selecciona las secuencias que pertenecen a mRNAs blanco degradados por miRNAs (Addo-Quaye et al., 2008).

Durante la primera fase del análisis de degradoma, se extrae el RNA total del material biológico de interés, que incluye al rRNA, mRNA, lncRNAs, tRNAs, fragmentos producto de la degradación de diversos tipos de RNA, entre otros. De esta muestra se aísla la población de RNA poliadenilado (Figura 1-5, panel b), que incluye por ejemplo a los mRNAs con su cap 5' (m⁷G) entre otros. Posteriormente, se seleccionan los RNAs con un extremo 5' P mediante la ligación de un adaptador 5' ya que solo las moléculas de RNA con esta señal son competentes para la ligación. En el adaptador 5' se encuentra la secuencia de reconocimiento de la enzima MMEI. Esta muestra se somete a retro transcripción, usando un oligonucleótido dT que se empalma con la cola de poli A y posteriormente, se somete a amplificación mediante PCR (Figura 1-5, panel c). El siguiente paso es la digestión de los fragmentos amplificados con la enzima MMEI, lo que produce fragmentos de doble cadena

con extremos 3' OH (cadena 5' → 3') y 5' P (cadena 3' → 5'), la cadena 3' OH terminal es dos nucleótidos más larga lo que les permite a estos fragmentos ligarse al adaptador 3' de doble cadena (Figura 1-5, panel d). Finalmente, la muestra se amplifica mediante PCR, se purifica y se somete a secuenciación masiva.

Los resultados de secuenciación se analizan mediante el procesamiento bioinformático CleaveLand, este requiere las siguientes bases de datos: las secuencias del degradoma generadas en la primera fase, las secuencias de los miRNAs que se hayan reportado en esta muestra y el conjunto de los mRNAs de esta muestra (transcriptoma). Ya que los mRNAs con un extremo 5' P y 3' poli A incluyen, pero no se limitan a los mRNAs degradados por miRNAs, se aprovecha el fragmento de la secuencia complementaria al miRNA que permanece en el mRNA degradado. Ya que el miRNA se empalma en su secuencia blanco en el mRNA, abarcando alrededor de 20 nt, y dirige el corte entre la base 10 y 11 contando a partir del extremo 5' del miRNA, el fragmento 3' terminal del mRNA blanco, debe contener los primeros 10 nt de la región complementaria al miRNA en su extremo 5' terminal. Si se comparan las secuencias de estos fragmentos 3' terminales con el transcriptoma de la muestra que corresponde a los mRNAs no degradados, se puede extender la región complementaria al miRNA (13 nt hacia el extremo 5'). Si se comparan estos fragmentos reconstruidos con una base de miRNAs para la muestra analizada, se puede asignar a este mRNA un miRNA que lo regula gracias a la región complementaria reconstruida. Este análisis permite proponer así, que un mRNA es blanco de un miRNA con evidencia de su degradación dada por secuenciación (Addo-Quaye et al., 2009).

mRNA degradado por miRNAs



Análisis de degradoma

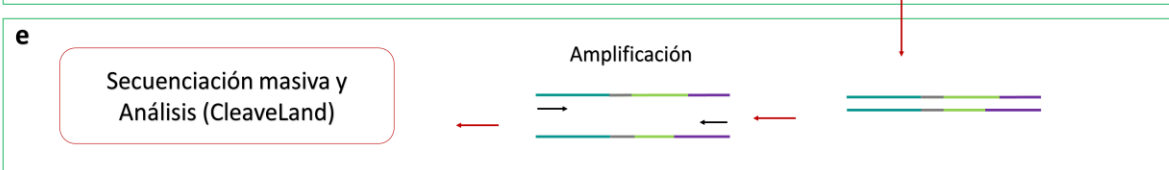
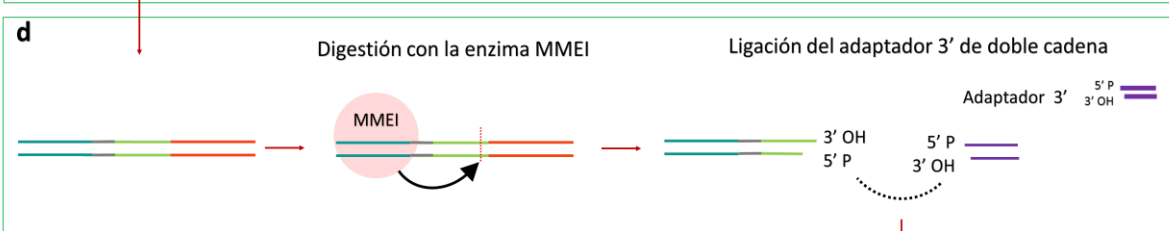
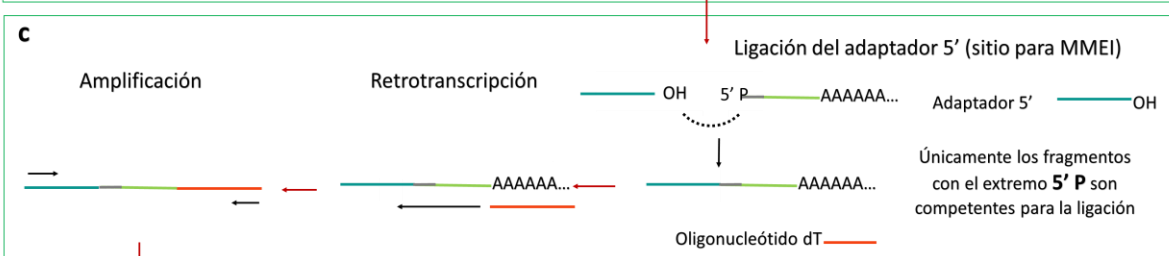
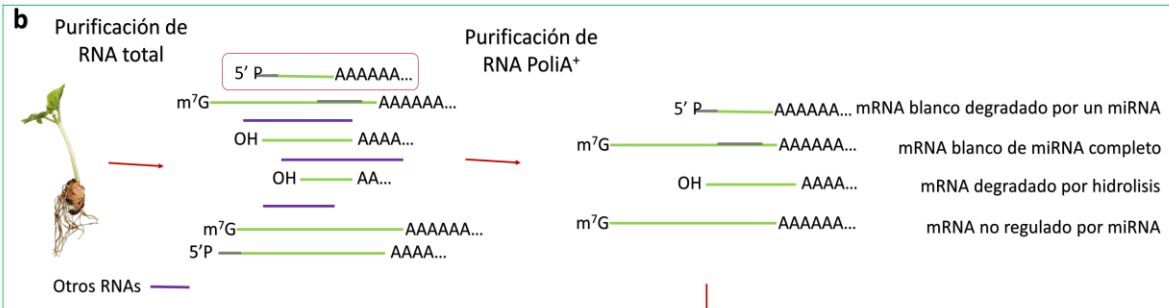


Figura 1-5. Identificación de mRNAs blancos de miRNAs mediante el análisis del degradoma. Muestra los pasos generales mediante los cuales se producen los fragmentos de mRNA degradados por miRNAs (a) y como el análisis de degradoma los identifica (b-e). El procesamiento requiere la obtención de RNA total del material vegetal de interés, a partir de este, se purifican los fragmentos poliadenilados (b). Mediante la ligación del adaptador 5' se seleccionan los fragmentos con el extremo 5' monofosfatado (5' P), tras esta selección, se lleva a cabo la retrotranscripción de los fragmentos de RNA y la muestra se amplifica mediante PCR (c). La muestra se digiere a continuación con la enzima MMEI que tiene un sitio de reconocimiento en el adaptador 5' y a los fragmentos obtenidos de esta digestión se les liga un adaptador de doble cadena en el extremo 3' (d). La muestra finalmente se amplifica y se somete a secuenciación masiva, los resultados de secuenciación se analizan usando el procesamiento bioinformático CleaveLand (e).

2. Antecedentes

Hasta este momento, en este trabajo se ha puesto en contexto la importancia agronómica del frijol, que la sequía es la principal problemática en torno a su cultivo y que este problema se puede agravar en un futuro. Se han descrito en general los mecanismos de regulación de las plantas frente al estrés, en particular el causado por la deshidratación. Se ha resaltado que el fenómeno de regulación postranscripcional mediada por miRNAs participa en respuesta a factores de estrés. Este contexto permite plantear lo siguientes cuestionamientos, ¿los miRNAs son factores activos en el frijol durante el estrés hídrico? ¿Cuáles miRNAs de *P. vulgaris* participan durante estrés hídrico? ¿Qué mRNAs blanco regulan en respuesta a estrés hídrico? ¿Cómo podemos usar este conocimiento para resolver el efecto de la deshidratación causada por la sequía como principal factor que lleva a la deshidratación vegetal? Se ha trabajado en las primeras dos preguntas a través del trabajo de Arenas-Huertero y colaboradores (2009) y Pelaez y colaboradores (2012). La tercera pregunta ha sido abordada con diversas estrategias (Formey et al., 2015; De la Rosa et al., 2018; Sosa-Valencia et al., 2017) y este trabajo partiendo del análisis de degradoma es una contribución con un enfoque global para responder esta pregunta. El uso de este conocimiento para enfrentar las problemáticas del cultivo del frijol requiere atención por parte de estudios futuros.

2.1 miRNAs en *P. vulgaris* y sus mRNAs blanco

Lo que conocemos de los miRNAs en plantas se ha obtenido del estudio de la planta modelo *A. thaliana* y de otras plantas de interés agronómico como el arroz (*Oryza sativa L.*) y soya (*Glycine max*), entre otras. Los primeros miRNAs en *P. vulgaris* fueron identificados por Arenas-Huertero y colaboradores (2009) y su trabajo fue continuado por el estudio a gran escala de Pelaez y colaboradores (2012) quien identificó los miRNAs de *P. vulgaris* a través de secuenciación masiva. La comprensión del mecanismo de acción de los miRNAs y su incidencia en los fenómenos biológicos depende del conocimiento de sus mRNAs blanco, en este sentido, se avanzó de forma importante en el conocimiento de algunos mRNAs blanco de miRNAs en *P. vulgaris* a través del trabajo de Arenas-Huertero y colaboradores (2009).

Esta estrategia, como se mencionó antes, requiere mayor esfuerzo ya que la confirmación experimental de cada mRNA blanco se realiza individualmente a través de 5' RACE. El presente trabajo de tesis se dedicó al estudio de datos arrojados por los análisis de degradoma de plántulas de frijol sometidas a condiciones control y de deshidratación, es decir, el protocolo descrito en la sección 1.4.e se llevó a cabo partiendo de plántulas control o de plántulas sometidas a deshidratación de forma independiente, generando dos bibliotecas de resultados de secuenciación analizadas independientemente mediante CleaveLand.

2.2 Construcción de los Análisis de Degradoma

Los análisis de degradoma fueron realizados por el laboratorio del Dr. Ramanjulu Sunkar (Oklahoma State University) con quien se colaboró. Fueron construidos como se describe en la sección anterior de acuerdo a lo reportado previamente (Addo-Quaye et al., 2009; German et al., 2009) y como se detalla en Formey et al., (2015). Respecto a la secuenciación.

2.2.a Construcción de los Análisis de Degradoma

Los análisis de degradomas se construyeron a partir de plántulas sin cotiledones de *P. vulgaris* variedad Pinto Villa. Las semillas fueron asepticadas como se indica en Formey et al., (2015) y se germinaron en toallas de papel húmedas, en condiciones de oscuridad y a 24 °C por 3 días. Las plántulas se transfirieron a vermiculita usada como sustrato. Para el tratamiento control, el sustrato se saturó al 100% de su capacidad de campo (cc), para el tratamiento de deshidratación el sustrato se hidrató a 1/8 de su cc. El tratamiento duró 48 horas con un ciclo de luz-oscuridad de 16 h/ 8 h. Las plántulas se colectaron y molieron con N₂ líquido y preservaron a -80 °C hasta la extracción del RNA total (Formey et al., 2015).

Se obtuvo RNA total de plántulas sometido a uno u otro tratamiento, cada muestra se procesó por separado generando bibliotecas de secuenciación de análisis de degradoma independientes. El análisis de degradoma para cada muestra se llevó a cabo, de acuerdo con Formey et al., (2015), esencialmente como se refirió en la sección 1.4.e

. A continuación, cada muestra (control y deshidratación), fueron sometidas a secuenciación SBS (Sequencing by Synthesis) en un equipo Genome Analyzer GAIIx (Illumina) en la Unidad Universitaria de Secuenciación masiva de DNA de la UNAM (UUSMD, IBT-UNAM).

Los resultados de secuenciación se analizaron usando CelaveLand versión 4. Los datos empleados fueron además de las bibliotecas de secuenciación de cada muestra, el transcriptoma de *P. vulgaris* de la versión 1 del genoma (Phytozome.net) y la biblioteca de todos los miRNAs de plantas (los de *P. vulgaris* identificados en Pelaez et al., (2012). Para predecir todos los mRNAs blancos de miRNAs

dentro de un mismo grupo de datos se usó el servidor psRNATarget y solo se retuvieron los mRNAs blanco con un valor p menor o igual a 0.05 (Formey et al., 2015) el procesamiento fue independiente en la muestra control y deshidratación. El análisis bioinformático fue llevado a cabo en colaboración con el Dr. Mario Arteaga Vázquez (INBIOTECA, Universidad Veracruzana).

Se obtuvo para cada muestra un listado con los mRNAs degradados secuenciados identificándolos con el nombre del locus en el genoma de *P. vulgaris*, junto con el miRNA asignado como regulador de cada mensajero y también el número de veces que aparecía ese fragmento en la secuenciación, lo cual denominamos *lecturas de corte*. Las lecturas de corte fueron normalizadas en cada muestra usando como referencia el tamaño total de la secuenciación (lecturas totales) con el fin de hacer comparables las bibliotecas de diferente tamaño (Addo-Quaye et al., 2009). Cada mRNA blanco listado tiene asociados los datos de la secuenciación, estos son representados como una gráfica denominada en inglés *target plot* (t-plot) que muestra la distribución de las secuencias de fragmentos del mRNA blanco a lo largo de la secuencia del mRNA blanco completo (sus nucleótidos se encuentran sobre el eje x), y la frecuencia con que un fragmento de mRNA blanco degradado inicia en ese nucleótido (eje y). En este grafico se denota en rojo la frecuencia de la secuencia que coincide con el sitio de empalme del miRNA que regula a este mRNA blanco, y es esta frecuencia la que se considera como el número de lecturas de corte del miRNA sobre el mRNA blanco identificado.

El análisis de degradoma de la condición control reportó 264,047 lecturas correspondientes a 57 mRNAs blanco reportados por esta biblioteca y el análisis de

degradoma de la condición deshidratación reportó 201,139 lecturas correspondientes a 48 mRNAs blanco reportados en esta biblioteca. El análisis de degradoma identificó que estos mRNAs blanco son regulados por 22 familias de microRNAs. Estos datos son el punto de partida de este estudio.

3. Hipótesis

La contribución de la vía de regulación mediada por miRNAs a la respuesta en deshidratación de *P. vulgaris*, puede ser determinada por la evaluación de la actividad de corte obtenida por análisis de degradoma y la correspondiente acumulación del miRNA y su mRNA blanco.

4. Objetivos

General

Evaluar la actividad de los miRNAs durante la deshidratación a través del análisis de la acumulación de estos y sus mRNAs blanco obtenidos mediante los análisis de degradoma.

Particulares

- 👉 Determinar los mRNAs blanco de miRNAs presentes en condiciones control y deshidratación mediante la anotación de los resultados de los análisis de degradoma.
- 👉 Identificar nuevos mRNAs blanco de miRNAs en la lista de transcritos con evidencia de corte.
- 👉 Comparar mRNAs blanco de las bibliotecas control y deshidratación de acuerdo con el número de cortes observados y seleccionar un grupo para llevar a cabo la cuantificación de su acumulación.
- 👉 Cuantificar la acumulación de los mRNAs blanco seleccionados y los miRNAs que los regulan y analizar la correlación entre la acumulación de estos pares.

- 🍌 Contrastar la cuantificación de la acumulación de miRNA-mRNA blanco con la acumulación del mensajero degradado (lecturas de corte) reportada por los análisis de degradoma.

5. Estrategia experimental

Con el fin de analizar la participación de la vía de regulación postranscripcional mediada por miRNAs durante el fenómeno de estrés por deshidratación en *P. vulgaris*, se planteó la siguiente estrategia experimental (Figura 5-1).

En la primera fase se llevó a cabo el análisis de mRNAs blanco identificados por los análisis de degradoma (control y deshidratación), a partir del cual se seleccionaron nueve mRNAs blanco: tres de estos mRNAs blanco se encontraron únicamente en las plantas tratadas como control, otros tres mRNAs blanco se encontraron únicamente en las plantas sometidas a deshidratación y tres mRNAs blanco más, se encontraron tanto en las plantas control como en las sometidas a deshidratación.

En la segunda fase se llevó a cabo el trabajo experimental. Se obtuvo el material biológico, plántulas de *P. vulgaris* variedad Pinto Villa de 7 días post-germinación sometidas a deshidratación de 1/8 de la cc de la vermiculita durante 48 horas. Se usaron plántulas sin cotiledones (porque el análisis de degradoma se realizó con este material biológico), y raíces de plántulas (por su papel en el estatus hídrico de la planta ya que son el órgano con el que la planta toma agua del medio). De este material se extrajo RNA con el que se sintetizó cDNA, a partir del cual se llevó a cabo la cuantificación relativa de la acumulación de los miRNAs y mRNAs blanco mediante RT-qPCR. Se cuantificó la acumulación relativa de los nueve mRNAs blanco seleccionados y los miRNAs que los regulan, y se contrastó con las lecturas de mRNAs blanco degradados reportados por el análisis de degradoma. Los resultados se reportaron en una gráfica que compara la acumulación de mRNA blanco y el miRNA en plántulas sometidas a deshidratación respecto a uno (su acumulación en plántulas control).

A partir del contraste de los resultados del análisis de degradoma y la acumulación relativa de los mRNAs blanco y los miRNAs que los regulan, se evaluó si el análisis de degradoma ofrece una imagen de la modulación de la acumulación de los mRNAs blanco por los miRNAs durante condiciones de deshidratación.

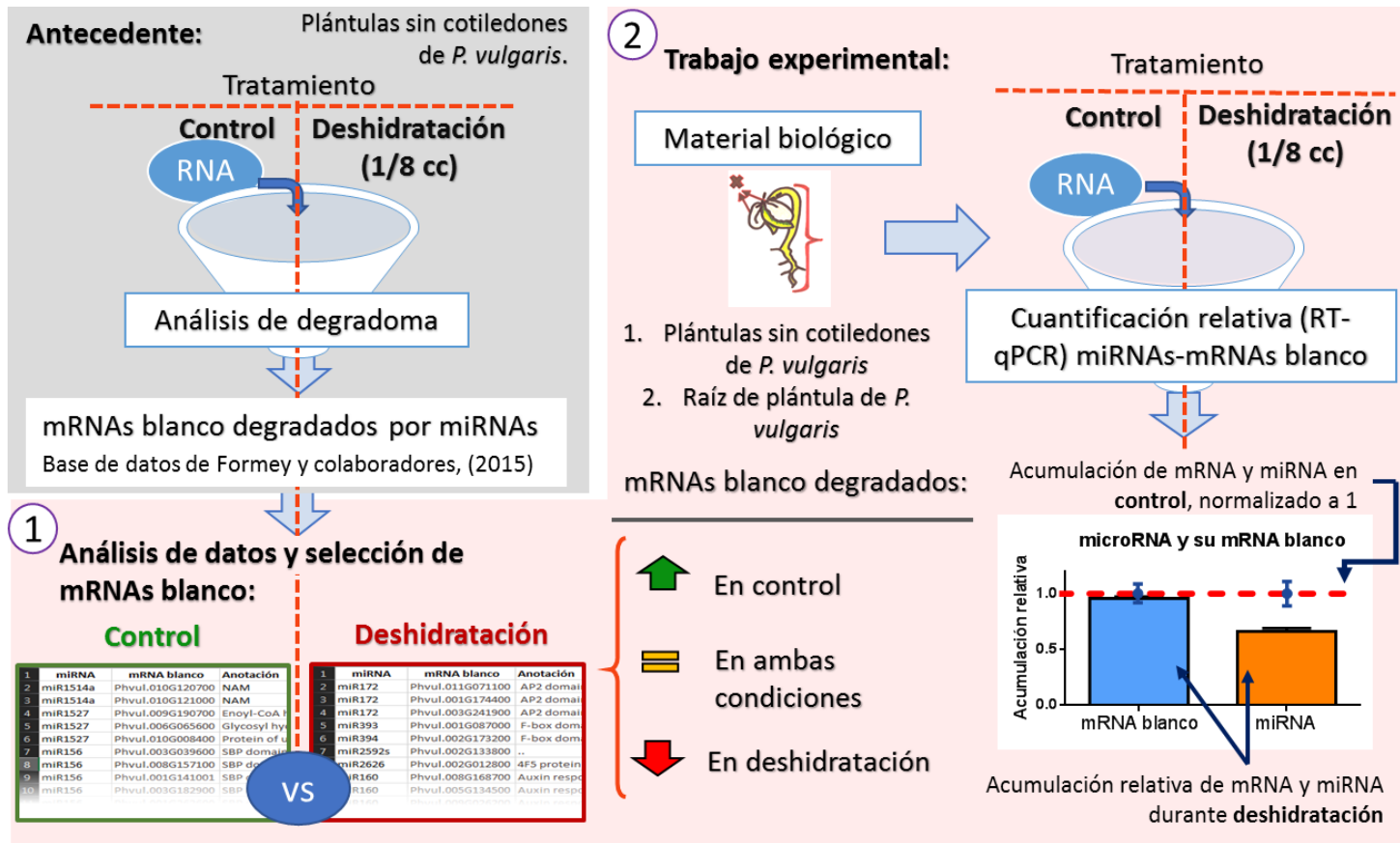


Figura 5-1. Estrategia experimental. Consiste de dos fases: 1) la exploración y selección de mRNAs blanco a partir de los datos del análisis de degradoma de Formey y col. (2015) y 2) el trabajo experimental, en el que se obtuvo el material biológico (plantulas y raíces de *P. vulgaris* variedad Pinto Villa de 7 días postgerminación sometidas a deshidratación de 1/8 de la cc de la vermiculita durante 48 horas), la obtención de RNA y la cuantificación de la acumulación de los miRNAs y mRNAs blanco mediante RT-qPCR. Se reporta como una gráfica que compara la acumulación de mRNA blanco y el miRNA en plantulas sometidas a deshidratación respecto a uno (su acumulación en plántulas control). Se analizaron tres mRNAs blanco que se degradan en control, tres en deshidratación y tres en ambas condiciones.

6. Materiales y Métodos

6.1 Anotación de las bibliotecas de los análisis de degradoma

El primer paso consistió en reducir los lisados de cada degradoma a blancos únicos (las entradas se duplicaban cuando un mRNA blanco podía ser reconocido por un microRNA de *A. thaliana* y por el mismo miRNA pero de *P. vulgaris*, debido a que se usaron todos los miRNAs de plantas), y posteriormente se comparó el listado de los mRNAs blanco identificados por el análisis de degradoma de la condición control y el de la condición de deshidratación, como resultado, se combinó la biblioteca de control que enlistaba 57 mRNAs blanco con la biblioteca de deshidratación que contó 48 mRNAs blanco. Estas se redujeron a 65 mRNAs blanco únicos (ya que había mRNAs blanco que se identificaron en las dos muestras) y se asociaron con sus lecturas de corte de cada condición. En esta nueva lista se comparó el número de lecturas de corte para cada mensajero en condición control y de deshidratación, con lo que se establecieron tres categorías: 1) los mRNAs blanco que se degradan únicamente en condición control, 2) los que se procesan sólo en condiciones de estrés por deshidratación y 3) los que muestran lecturas de corte en ambas bibliotecas sin considerar el número de lecturas.

Se realizó la anotación funcional de los mRNAs blanco reportados por los análisis de degradoma a través del genoma de frijol disponible en la base de datos de Phytozome.net. De este servicio web se extrajo la información sobre el carácter funcional de los genes a través de diferentes bibliotecas y bases de datos que vincula. Las bases de datos consultadas para la anotación de los análisis de degradoma fueron Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) que es una base de datos de familias de proteínas y dominios proteicos (Finn et al., 2010), KEGGORTH (<http://www.genome.jp/kegg/ko.html>), una base de datos para el análisis de la función de los genes (Ogata et al., 1999), Quick-GO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>) que es una base de datos que proporciona la anotación de los genes, entre otra información (Binns et al., 2009) y Panther (<http://pantherdb.org/>) que es una biblioteca de familias de proteínas indexadas por su función (Thomas et al., 2003).

6.2 Experimento de deshidratación en plántulas

Material biológico

El material biológico en el que se realizó la cuantificación de la acumulación relativa de los mRNAs blanco y sus miRNAs, reproduce las condiciones que el Dr. Sunkar y sus colaboradores emplearon para obtener los análisis de degradoma. A continuación, se describe como se generó este material.

6.2.a Esterilización

Se esterilizaron semillas de *P. vulgaris* variedad Pinto Villa (INIFAP) al someterlas a un lavado de dos minutos con etanol industrial, se retiró el etanol y se dio un segundo lavado con una solución 1:5 de cloro comercial en H₂O destilada, durante cinco minutos. En estos periodos de lavado se mantuvo una agitación suave. Se realizaron seis lavados de las semillas con H₂O destilada estéril en campana de flujo laminar.

6.2.b Germinación y crecimiento

En condiciones estériles, se colocaron 100 semillas por condición (control y deshidratación) en charolas (20 X 18 cm) con toallas de papel húmedo (estéril) cubiertas con aluminio para mantenerlas en oscuridad. Se germinaron en cuarto de cultivo (24 °C ±1). La eficiencia de germinación de este lote fue de alrededor del 40%.

Tras seis días, las semillas germinaron y produjeron plántulas de alrededor de 5 cm, estas se trasplantaron a las condiciones experimentales donde se usó vermiculita como sustrato. La condición control consistió en vermiculita hidratada con agua destilada estéril a 100% de su cc. La cc para este lote vermiculita fue de 5 mL de agua/g de vermiculita. La condición de deshidratación consistió en 1/8 de la cc, para lo que se agregaron 0.625 mL de agua/g de vermiculita. Las plántulas sometidas a cada tratamiento se mantuvieron a 24 °C±1 en oscuridad, durante 48 horas.

6.2.c Colecta de tejidos

Se colectaron dos muestras de cada condición, para cada muestra se colectaron al menos 5 plántulas. Se generaron dos grupos de muestras. En el primero, se colectaron plántulas sin cotiledones. Los cotiledones, se seccionaron con una navaja, evitando el daño a las hojas primarias y tallo. En el segundo grupo se colectaron solo raíces de plántula que también fueron seccionadas con navaja en la región donde termina el hipocótilo y comienza la raíz. Cada grupo se compuso de muestras de plántulas expuestas a condiciones control y de deshidratación de 1/8 de cc. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta que fueron utilizados.

6.3 Obtención de cDNA

6.3.a Extracción de RNA total

Se molieron los tejidos con nitrógeno líquido en morteros estériles, y se obtuvo así un polvo fino que se colectó. Para la extracción de RNA total se usó Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el protocolo recomendado por el fabricante, el cual se detalla a continuación.

Se colocó en un tubo de polipropileno un volumen aproximado a la línea de 0.1 mL del tejido pulverizado de cada muestra, manteniendo las muestras en nitrógeno líquido. En campana de extracción se agregó 1 mL de Trizol y se agitó vigorosamente en vórtex hasta que se homogenizó la mezcla, a partir de aquí las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12,000 x g durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras este periodo de incubación se les agregaron 200 µL de cloroformo frío. Se mezclaron los líquidos agitando a mano vigorosamente, se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugaron a 12,000 x g 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 500 µL de isopropanol frío, y se incubó a -20 °C durante 12 horas, tras las que se centrifugaron las muestras a 12,000 x g 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1mL de etanol al 75%. Se removió el etanol y se resuspendió la pastilla de RNA con agua *Mili-Q* y se cuantificó por absorbancia a 260 nm con el espectrómetro NanoDrop.

6.3.b Síntesis de cDNA para transcritos

Se incubó 1 µg de RNA previamente tratado con DNAsa I (1U/µL) (Thermo Scientific) con el oligonucleótido dT18 a 65 °C durante cinco minutos. Después se agregó la RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) junto con su buffer de reacción, el dNTPs mix (10 µM) y el inhibidor de RNAsas RiboLock (40U/µL) (Thermo Scientific). Esta reacción se incubó a 42 °C durante una hora y se detuvo incubando las muestras a 70 °C durante diez minutos. El cDNA que se obtuvo se diluyó 1:5 en agua y se utilizó como sustrato para las reacciones de PCR y qPCR.

6.3.c Síntesis de cDNA de miRNAs

Para la síntesis de cDNA para miRNAs se usó el paquete comercial NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR (Invitrogen). Este proceso inicia con la poliadenilación de los miRNAs a partir del RNA total, el siguiente paso, es la síntesis de la cDNA de cadena sencilla a partir del RNA poliadenilado con la transcriptasa reversa SuperScript® III, utilizando el oligonucleótido universal (Universal RT Primer), que es complementario a la hebra extendida por poliadenilación. El cDNA obtenido se usó para la amplificación por PCR cuantitativo (qPCR) de los miRNAs de interés. A) Poliadenilación. Se incubó el RNA total con la enzima PoliA polimerasa (2U/µL), en presencia de ATP (2µM) a 37 °C durante 15 minutos. B) El RNA poliadenilado obtenido, se incubó con el oligonucleótido universal (Universal RT Primer, 10 µM) a 65 °C durante 5 minutos, después se incubó en hielo por 1 minuto y luego se agregó la enzima SuperScript III® (200U/µL) junto con un inhibidor de Ribonucleasas (RNaseOUT™, 40 U/µL) y se incubó a 50 °C por 50 minutos. La reacción se detuvo aumentando la temperatura a 85 °C por 5 minutos. El cDNA se diluyó 1:10 con agua *Mili-Q*, y este material fue sustrato para cuantificar los miRNAs mediante qPCR.

6.4 Cuantificación de la acumulación relativa de RNAs mensajeros y miRNAs

6.4.a Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR

Oligonucleótidos para amplificar mRNAs

Los oligonucleótidos fueron diseñados para cuantificar la acumulación relativa de mRNAs blanco no procesados por miRNAs. Con este propósito, los oligonucleótidos se diseñaron flanqueando el sitio del corte del miRNA que lo regula de acuerdo con los datos obtenidos de los análisis de degradoma. Para esto se ubicó en la secuencia del mensajero, la región complementaria con el miRNA. Esto se ilustra en la Figura 6-1. Con este diseño, se amplifican solamente las secuencias de RNA que corresponde a mensajeros que no han sido cortados por el miRNA que los regula.

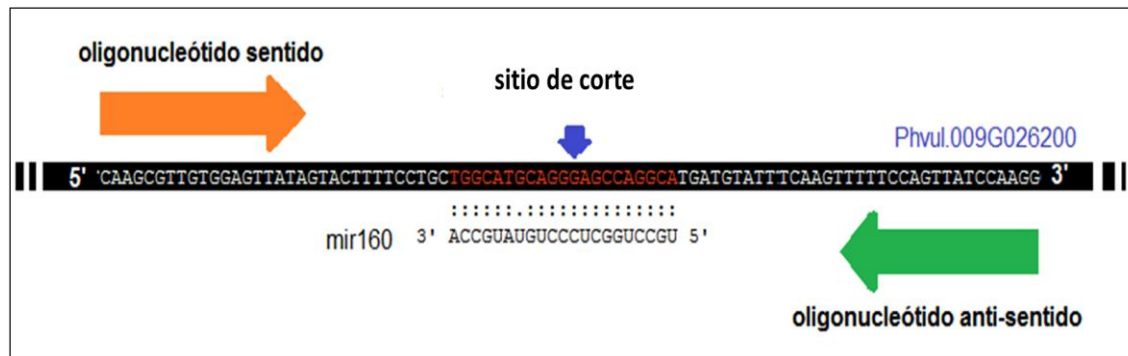


Figura 6-1. Diseño de oligonucleótidos para mRNAs blanco de miRNAs. Se muestran los sitios donde se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar los mRNAs blanco de miRNAs reportados por los análisis de degradoma. Como ejemplo se muestra el transcrito del gen Phvul.009G026200 y el sitio de reconocimiento para miR160.

Los oligonucleótidos para qPCR que se usaron para amplificar los mRNAs fueron diseñados de acuerdo con las siguientes características:

- 🍌 Los oligonucleótidos fueron de alrededor de 20 bases de longitud.
- 🍌 El contenido de bases G/C fue 50% o lo más cercano posible a este porcentaje.
- 🍌 La última base del extremo 3' fue C o G.
- 🍌 La temperatura de fusión (T_m) fue de 60 ± 2 °C calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$\bullet \quad T_m = 2(A + T) + 4(C + G)$$

Donde A es el número de adeninas, T el de timinas, C de citosinas y G de guaninas del oligonucleótido.

- 👉 La secuencia que amplifica el par de oligonucleótidos debe idealmente ser de alrededor de 150 pares de bases (pb) pero secuencias de hasta 250 pb fueron amplificadas y cuantificadas exitosamente.
- 👉 Se evitó que los pares de oligonucleótidos fueran capaces de formar estructuras tipo tallo-asa o de formar dímeros. Este aspecto se evaluó con OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), un servidor web diseñado para calcular las propiedades de secuencias de ADN y RNA ingresadas por el usuario (Kibbe, 2007).
- 👉 Se probó *in silico* la especificidad de las secuencias para amplificar el gen de interés, utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) como herramienta de búsqueda de similitud entre secuencias, a través de Phytozome.net. Las secuencias comparadas fueron la secuencia de cada oligonucleótido contra el genoma de *P. vulgaris* y se comprobó que el mRNA blanco fuera encontrado por la secuencia del oligonucleótido.

A continuación, se muestra los oligonucleótidos diseñados y sus características.

Tabla 6-1. Oligonucleótidos empleados para cuantificar mRNAs blanco

ID blanco/ Anotación funcional	Secuencia	%GC	Longitud (nts)	Tm (°C)	Producto (pb)
Phvul.003G189000/ NAM	Sentido: 5'ATTGGGTTTCATCTGCTCTGC3'	50	20	60	229
	Antisentido: 5'TTGAGTGGAGTAGAACGAGG3'	50	20	60	
Phvul.001G031000/ GRL1	Sentido: 5'TGGAAGGCCAATCAGGCCATG3'	57	21	66	205
	Anti-sentido: 5'CTCTTTGTTACTCATAAACATCC3'	35	23	62	
Phvul.009G026200/ ARF	Sentido: 5'ACTTGTTCCACCACACCTG3'	60	20	60	247
	Antisentido: 5'CATGTCCCTTGATAACTGG 3'	60	20	60	
Phvul.002G012700/ PTK	Sentido: 5'GGGCAGAGGGAAATATAGTG3'	50	20	60	151
	Antisentido: 5'GACAATATTTGGCCCTCCAC3'	50	20	60	
Phvul.003G241900/ AP2	Sentido: 5'ACTTGTTCCACCACACCTG3'	50	20	60	247
	Antisentido: 5'CATGTCCCTTGATAACTGG3'	50	20	60	
Phvul.010G146200/ TFH	Sentido: 5'CTTTCTAAGGCTACTGGGAC'3	50	20	60	214
	Antisentido: 5'TGAGAACATCAACAGCTCGG'3	50	20	60	
Phvul.005G055400/ NAC1	Sentido: 5'CTTTGGTTCAGAGGATTCCTTTC3'	43	23	66	200
	Antisentido: 5'CTTCAGATAAGTAAGTCTCTGAG3'	39	23	64	
Phvul.007G258400/ SBP	Sentido: 5'TGCATGGATCAGGGAGTGG3'	58	19	60	152
	Antisentido: 5'GTTGTTGAGCTCAACACTTGG3'	48	21	62	
Phvul.007G166200/ TIR1	Sentido: 5'TAGCCAATGCTGCAAAGCTG3'	50	20	60	116
	Antisentido: 5'GACTTCAACATTAAGCATCGG3'	40	21	60	

Nota: La anotación funcional en la tabla esta abreviada con el siguiente código: GRL1, factor de transcripción GRL1 (growth regulating factor like); NAM, proteína NAM (no apical meristem); ARF, factor de respuesta a auxina (Auxin response factor); TFH, factor de transcripción HEX (haematopoietically expressed homeobox); AP2, Factor de transcripción relacionado a AP2; PTK, subunidad alfa de la proteína cinasa II; NAC1, proteína tipo NAM (no apical meristem), TIR1, ubiquitina ligasa TIR1 (transport Inhibition response 1), SBP, factor de transcripción SBP (squamosa promoter binding protein). nts=nucleótidos, pb=pares de bases.

Oligonucleótidos usados para amplificar miRNAs

Para amplificar por PCR un miRNA es necesario un oligonucleótido sentido que corresponde a la secuencia del miRNA en dirección 5' - 3', y un oligonucleótido antisentido que corresponde a un oligonucleótido denominado Primer Universal provisto por el paquete comercial Ncode (Invitrogen) con el que se sintetizó el cDNA de miRNAs. El oligonucleótido universal se une a la región construida en el paso de poliadenilación por lo que este oligonucleótido antisentido es común para todos los miRNAs.

Para seleccionar la secuencia sentido para amplificar el miRNA de interés, se consideró en primera instancia el miRNA que reportó el análisis de degradoma como responsable de degradar el mRNA blanco identificado por secuenciación, sin embargo, como se explica en la sección 1.4.e, esto es parte del procesamiento bioinformático, por lo que para seleccionar el oligonucleótido sentido que se usó para amplificar al miRNA de interés se tomó en cuenta que la secuencia de miRNA fuera la más acumulada en plántulas de acuerdo a Pelaez et al., (2012) y/o que fuera una secuencia común a todas las versiones del miRNA (familia de miRNAs). Los oligonucleótidos usados se listan en la Tabla 6-2, el nombre de cada secuencia corresponde al reportado en el repositorio en línea miRBase (Griffiths-Jones et al., 2008), y se refiere a esta secuencia específica.

Tabla 6-2 Oligonucleótidos empleados para cuantificar miRNAs

miRNA	Secuencia	%GC	Longitud (pb)	Tm (°C)
ath-miR164a RT	5'TGGAGAAGCAGGGCACGUGCA3'	62	21	55
miR396a	5'TTCCACAGCTTTCTTGAAGTC3'	43	21	55
ath-miR160a-2RT	5'TGCCTGGCTCCCTGUAUGCCA3'	62	21	55
miR172g	5'GGAATCTTGATGATGCTGCAG3'	48	20	58
gma-miR166a RT	5'TCGGACCAGGCTTCATTCCCC3'	64	22	55
ath-miR156	5'TGACAGAAGAGAGTGAGCAC3'	50	20	55
osa-miR393 RT	5'TCCAAAGGGATCGCATTGATC3'	48	21	58

Nota: En la tabla no se muestra la secuencia del oligonucleótido Universal ya que este es provisto por en el paquete comercia Ncode pero no se especifica su secuencia.

6.4.b RT-qPCR de mRNAs y miRNAs

El ensayo de RT-qPCR de mRNAs y miRNAs consistió de dos pasos, el primero es la estandarización de las condiciones para la cuantificación de cada mRNA blanco de miRNA con el par de oligonucleótidos diseñado, esto incluye los siguientes puntos:

- 👉 Se optimizó el valor del ciclo umbral o CT para ponerlo en un rango entre 20 y 25 (se aceptó un valor de CT de 28 cuando el mRNA blanco fue muy poco abundante con la condición de tener variación mínima entre réplicas).
- 👉 Se vigiló la aparición de una curva de amplificación típica para la corrida del experimento. Esta curva posee una zona de ruido inicial, una zona de crecimiento exponencial y una zona de saturación.
- 👉 Se buscó obtener una curva de fusión (*melting curve* = curva de fusión) con un solo pico de amplificación.
- 👉 Se probó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos en el PCR para que se mantuviera alrededor del 100%.

Estos parámetros se ajustaron modificando la temperatura de alineamiento del PCR, la concentración de los oligonucleótidos en el volumen final de la reacción y la cantidad de cDNA en la reacción.

Experimento de eficiencia de los oligonucleótidos

El experimento para probar la eficiencia de los oligonucleótidos consiste en realizar una curva estándar. Para cada muestra, el cDNA que se generó en un volumen final de 20 μL se llevó a 100 μL , es decir se diluyó en un factor 1:5, a este volumen se le considera el 100 por ciento o 1. A partir de este cDNA, se realizaron diluciones 1:1, 1:5 y 1:10 las cuales fueron evaluadas por RT-qPCR en un experimento tipo curva estándar. En este experimento, se evalúan la eficiencia del PCR y la R^2 reportada. El estadístico R^2 o coeficiente de determinación, reporta el ajuste de los puntos experimentales al modelo esperado, mientras más cercano a uno, mejor es el ajuste.

Cuantificación de mRNAs blanco

Todos los mensajeros evaluados se cuantificaron en la dilución 1:1 de cada cDNA, (muestras de plántulas o raíces de plántulas en condición control y de las que se sometieron a deshidratación), sin embargo, debido a la variación en la acumulación de diferentes mensajeros medidos, para algunos genes fue necesario duplicar el volumen de cDNA en el volumen final de reacción del PCR para ajustar el valor del CT dentro del rango aceptado. Se usó el gen SKP16 referido en Vieira y colaboradores (2011) como un mensajero cuya abundancia se mantiene constante durante estrés abiótico en *P. vulgaris*.

La reacción de qPCR se preparó de la siguiente forma. Se preparó una mezcla con los siguientes componentes: SYBR Green Máster Mix 2.0 X PCR (Thermo Scientific), dNTP mix (10 μ M), y oligonucleótidos sentido (2 μ M) y antisentido (2 μ M). Para todos los mensajeros se usaron los ciclos de amplificación especificado en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3. Ciclos de amplificación para mensajeros

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	95 °C	5 minutos	1
2	95 °C	30 segundos	40
	55 °C	30 segundos	
3	95 °C	30 segundos	1
	55 °C	30 segundos	1
	55°C (Δ 0.5 °C)		
	95 °C	30 segundos	

Nota: En la parte final del paso tres se determina la curva de disociación donde se toma la fluorescencia cada 0.5 °C, comenzando a partir de 55 °C hasta llegar a 95 °C.

Cuantificación de miRNAs

Los miRNAs se cuantificaron en una dilución 1:10 del cDNA total sintetizado. La preparación de las reacciones que se siguió fue la misma usada para preparar las reacciones para cuantificar los mensajeros. Los ciclos establecidos para el PCR se muestran en la Tabla 6-4.

Tabla 6-4. Ciclos de amplificación para miRNAs

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	95 °C	5 minutos	1
2	95 °C	30 segundos	40
	55 °C	30 segundos	
3	95 °C	30 segundos	1
	60 °C	1 minuto	1
	55°C (Δ 0.3 °C)		
	95 °C	30 segundos	

Nota: La parte final de paso tres es la parte de la curva de disociación donde se toma la fluorescencia cada 0.3 °C, comenzando a partir de 55 °C hasta 95 °C.

6.5 Análisis de datos

Como se introdujo antes, el ensayo de qPCR arroja un valor llamado CT, este es usado para comparar la abundancia de la secuencia amplificada en las muestras. Esto se logra a través del método de CT comparativo ($\Delta\Delta$ CT). Este análisis determina de forma relativa la cantidad de la secuencia de interés en las muestras.

En este experimento, el método de CT comparativo evaluó la muestra control y deshidratación considerando la muestra control como la referencia. Para los mRNAs se usó el gen SKP16 como gen endógeno y para los miRNAs el miR2118, utilizando la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Estos cálculos se hicieron con el programa Microsoft Excel (2016) y las gráficas y análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism 6. La prueba estadística que se usó para evaluar la significancia de las diferencias fue la prueba de T con corrección de Welch (no asume igual desviación estándar entre grupos).

7. Resultados

7.1 Anotación de las bibliotecas de los análisis de degradoma

En la lista combinada de las bibliotecas control y deshidratación se identificaron 65 mRNAs blanco únicos regulados por 22 familias de miRNAs. En esta lista se reportan las parejas de miRNA-mRNA blanco y el número de lecturas de corte encontradas por el análisis de degradoma de cada condición. A partir de esta información se formaron tres grupos. En la tabla 7-1 se marcaron en verde los mRNAs blanco identificados por el análisis de degradoma de la condición control, en rojo los mRNAs blanco identificados por el análisis de degradoma del tratamiento de deshidratación y en amarillo, los mRNAs blanco identificados por los dos análisis de degradoma.

De los 65 mRNAs blanco de miRNAs, la mayoría (54) codifican para factores transcripcionales como se ilustra en la Figura 7-1. Los mRNAs blanco que codifican factores transcripcionales más abundantes corresponden a la familia de los factores de transcripción relacionados al crecimiento (11, GRLs por sus siglas en inglés) y proteínas de unión al promotor SQUAMOSA (ocho, SBPs por sus siglas en inglés). También se encontraron ocho mRNAs blanco que codifican para proteínas diferentes de factores transcripcionales, estas son: una proteína con dominio similar a la plastocianina, una proteína con motivo estructural Kelch, una proteína ribosomal 30S y 40S, una proteína de la familia 4F5, y tres proteínas de función desconocida, una de las cuales pertenece a la familia de proteínas no caracterizada UPF0005 y un gen sin anotación funcional. Además, se identificaron también tres enzimas, una β -glucosidasa, una hidrolasa y una caseína cinasa (Figura 7-1).

Tabla 7-1. mRNAs blanco encontrados por análisis de degradoma (control y deshidratación).				
microRNA	mRNA blanco	Lecturas		Anotación Funcional / Referencia
		C	S	
miR1514a	Phvul.010G120700	4	0	proteína NAM / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006355
miR1514a	Phvul.010G121000	49	24	proteína NAM / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006356
miR1527	Phvul.009G190700	2	2	metilglutaconil-CoA hidratasa / Kegg, ORTHOLOGY: K05607
miR1527	Phvul.006G065600	0	2	beta-glucosidasa / Kegg, ORTHOLOGY: K01188
miR1527	Phvul.010G008400	0	2	proteína de función desconocida (DUF962) / Pfam: PF06127
miR156	Phvul.003G039600	34	33	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03110
miR156	Phvul.008G157100	7	0	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03111
miR156	Phvul.001G141001	13	11	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03112
miR156	Phvul.003G182900	10	0	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03113
miR156	Phvul.001G262600	8	0	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03114
miR156	Phvul.011G164800	10	0	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03115
miR156	Phvul.002G286000	64	30	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03116
miR156	Phvul.007G258400	25	26	factor de transcripción SBP / Pfam: PF03117
miR159	Phvul.005G012900	7	6	factor de transcripción relacionado a MYB / Panther:10641:SF30
miR159	Phvul.011G191300	7	0	factor de transcripción relacionado a MYB / Panther:10641:SF31
miR159	Phvul.011G157100	3	0	factor de transcripción NOZZLE / Pfam: PF08744
miR160	Phvul.008G168700	9	6	factor de respuesta a auxina/dominio de unión a DNA B3 / Pfam:06507/Pfam:02362
miR160	Phvul.005G134500	43	37	factor de respuesta a auxina/dominio de unión a DNA B3 / Pfam:06507/Pfam:02363
miR160	Phvul.009G026200	29	0	factor de respuesta a auxina/dominio de unión a DNA B3 / Pfam:06507/Pfam:02364
miR160	Phvul.011G080100	43	37	factor de respuesta a auxina/dominio de unión a DNA B3 / Pfam:06507/Pfam:02365
miR164	Phvul.009G186000	26	50	proteína NAM / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006355
miR164	Phvul.005G055400	2631	2653	proteína NAM, NAC1 / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006356
miR164	Phvul.005G074500	2	2	proteína NAM / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006357
miR164	Phvul.003G189000	26	0	proteína NAM / Quick-Go EMBL-EBI GO:0006358
miR166h	Phvul.010G146200	0	66	dominio START, dominio MEKHLA, dominio Homeobox, factor de transcripción HEX / Pfam: PF01852/PF08670/PF00046 / KOG:0483
miR169	Phvul.001G196800	23	0	factor de transcripción relacionado a NF-YA / Panther:12632
miR169	Phvul.010G133300	67	100	factor de transcripción relacionado a NF-YA / Panther:12633
miR169	Phvul.008G283100	9	18	factor de transcripción relacionado a NF-YA / Panther:12634
miR169	Phvul.003G133100	147	154	factor de transcripción relacionado a NF-YA / Panther:12635
miR169f	Phvul.011G211300	84	104	factor de transcripción relacionado a NF-YA / Panther:12636
miR171b	Phvul.008G165200	7	5	factor de transcripción de la familia GRAS / Pfam:03514
miR172	Phvul.011G071100	16	12	factor de transcripción parecido a AP2 / KEGGORTH:09284
miR172	Phvul.001G174400	3	4	factor de transcripción parecido a AP2 / KEGGORTH:09285

Nota. mRNAs blanco que solo se encontraron durante condición control (verde), mRNAs blanco que solo se encontraron durante deshidratación (rojo), mRNAs blanco que se encontraron en ambas condiciones (amarillo). La anotación funcional de los genes corresponde a Pfam 27.0 PANTHER, KEGG (Kanehisa et al., 2014; Ogata et al., 1999), QuickGO (Binns et al., 2009) a través de Phytozome.net. La anotación de los mRNAs blanco se realizó con la versión 1.0 del genoma de *P. vulgaris*. Abreviaturas: **C**, control; **S**, deshidratación.

Tabla 7-1. mRNAs blanco encontrados por análisis de degradoma (control y deshidratación, continuación)

microRNA	mRNAs blanco	Lecturas		Anotación Funcional / Referencia
		C	S	
miR172f	Phvul.002G012700	0	11	subunidad alfa de la caceína cinasa II / KEGGORTH:03097
miR172	Phvul.003G241900	0	4	factor de transcripción parecido a AP2 / KEGGORTH:09286
miR2111	Phvul.001G094400	37	22	motivo Kelch/unión a proteínas / Pfam:01344/GO:0005515
miR2199	Phvul.010G158400	75	70	proteína de unión al elemento regulatorio de esteroides/factor de transcripción / Panther:12565/GO:0006355
miR2199	Phvul.010G158500	75	70	proteína de unión al elemento regulatorio de esteroides/factor de transcripción / Panther:12566/GO:0006355
miR2199	Phvul.010G158600	0	2	proteína de unión al elemento regulatorio de esteroides/factor de transcripción / Panther:12567/GO:0006355
miR2595	Phvul.006G095400	5	2	proteína ribosomal 40 S14/ proteína ribosomal 30S S11 / Panther:11759
miR2592s	Phvul.002G133800	0	2	sin anotaciones funcionales
miR2626	Phvul.002G012800	6	0	familia de proteínas 4F5 (función desconocida) / Pfam:04419
miR2671a	Phvul.007G194800	2	0	familia de proteínas asociadas HR-L inducción de lesión / Pfam:05514
miR319	Phvul.011G156900	29	12	familia de factores de transcripción TCP / Pfam:03634
miR319	Phvul.001G082900	60	37	familia de factores de transcripción TCP / Pfam:03635
miR319	Phvul.006G166600	77	73	familia de factores de transcripción TCP / Pfam:03636
miR319b	Phvul.011G191300	7	0	factor de transcripción relacionado a MYB / Panther:10641:SF30
miR393	Phvul.007G166200	213	289	ubiquitina ligasa TIR1 / KEGGORTH:14485
miR394	Phvul.002G173200	7	4	GRR1-RELATED, ARATH / Panther:23125:SF19
miR393	Phvul.001G087000	599	537	GRR1-RELATED, ARATH / Panther:23125:SF17
miR393	Phvul.001G202600	370	380	GRR1-RELATED, ARATH / Panther:23125:SF18
miR396	Phvul.003G131800	8	16	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.007G222300	25	9	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.009G228000	8	16	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.009G047000	77	23	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.001G031000	12	0	factor de transcripción GRL1 / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.002G131700	22	18	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.011G017700	176	121	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.010G130000	4	2	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.007G253900	2	0	sin anotaciones funcionales
miR396	Phvul.001G187500	28	29	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.002G041800	176	121	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR396	Phvul.010G048400	3	0	factor de transcripción GRL / GO:0006355/Pfam:08880
miR408	Phvul.010G049200	0	2	dominio similar a la plastocianina / Pfam:02298
miR4410	Phvul.006G157400	2	0	familia de proteínas no caracterizadas UPF0005 / Pfam:01027

Nota. mRNAs blanco que solo se encontraron durante condición control (verde), mRNAs blanco que solo se encontraron durante deshidratación (rojo), mRNAs blanco que se encontraron en ambas condiciones (amarillo). La anotación funcional de los genes corresponde a Pfam 27.0 PANTHER, KEGG (Kanehisa et al., 2014; Ogata et al., 1999), QuickGO (Binns et al., 2009) a través de Phytozome.net. La anotación de los mRNAs blanco se realizó con la versión 1.0 del genoma de *P. vulgaris*. Abreviaturas: **C**, control; **S**, deshidratación.

Genes blanco de miRNAs reportados por las bibliotecas control y sequía obtenidas por análisis de degradoma

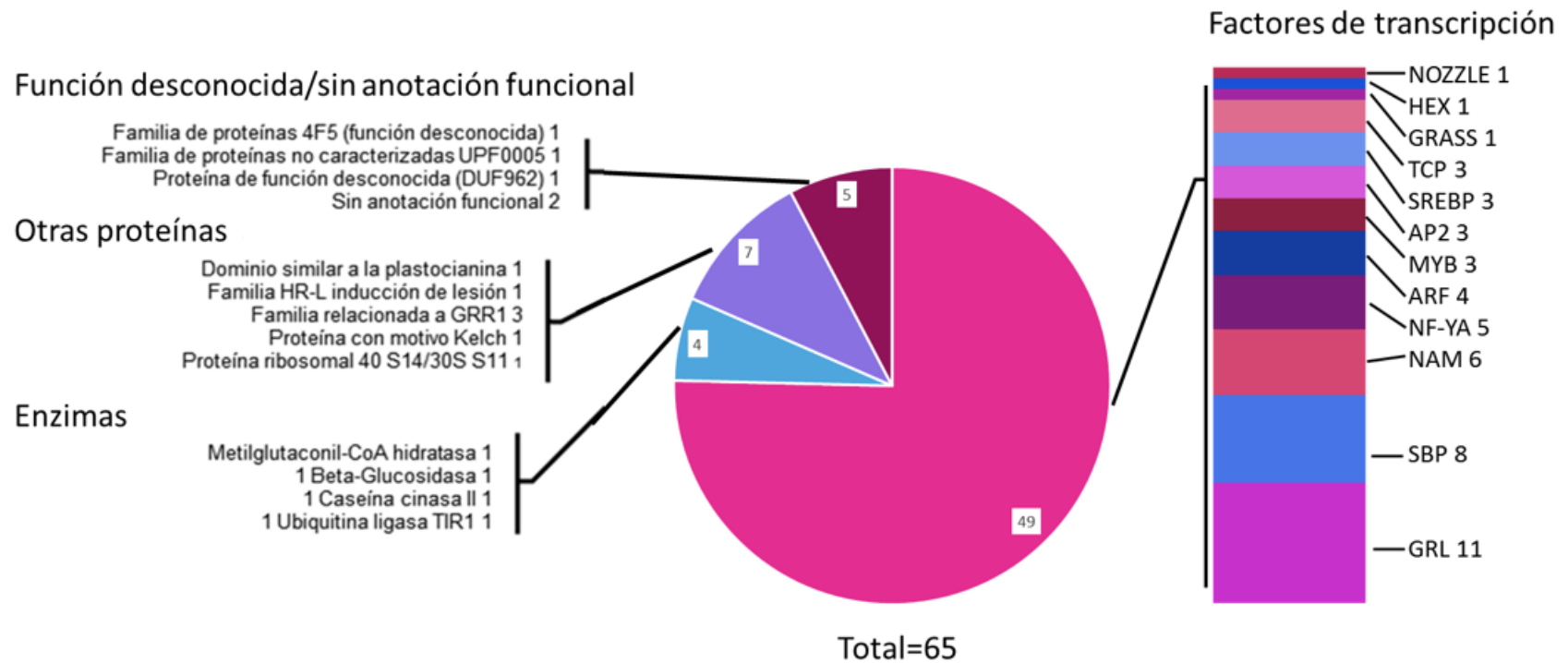


Figura 7-1. Función de los mRNAs blanco identificados por los análisis de degradoma.















De los 65 mRNAs blanco reportados en las dos bibliotecas de los análisis de degradoma, 53 son factores de transcripción (el tamaño del segmento de color representa el numero factores de ese tipo), cuatro son enzimas, dos son otro tipo de proteínas y seis no tienen anotación funcional o su actividad no esta caracterizada. Delante de cada categoria funcional se especifica el numero de mRNAs blanco pertinentes a la misma.

De estos 65 mRNAs blanco encontrados, 52 son regulados por 14 familias de miRNAs conservados como se especifica en la Tabla 7-2 y 13 son regulados por ocho familias de miRNAs no conservados los cuales se muestran en la Tabla 7-3. Denominamos como conservados a los miRNAs distribuidos ampliamente en diferentes familias de plantas incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas e incluso en algunos casos hasta en musgos. Por otro lado, los miRNAs no-conservados son aquellos que se encuentran representados sólo dentro de las leguminosas y algunas otras especies cercanas filogenéticamente.

En estas tablas se observa que la mayoría (75%) de mRNAs blanco de miRNAs son factores transcripcionales, pero hay una diferencia entre los mRNAs blanco de miRNAs conservados y no conservados. Para los 14 miRNAs conservados, 47 de los 52 mensajeros que regulan (es decir, el 90%), corresponden a factores transcripcionales. Por otro lado, para los ocho miRNAs no conservados, seis de los 13 mRNAs blanco (46%) corresponden a factores transcripcionales. La proporción de factores transcripcionales regulados por miRNAs conservados es mucho mayor que la de los factores transcripcionales regulados por miRNAs no conservados. Esta diferencia notable sugiere una correlación entre la conservación de miRNAs y sus mRNAs blanco a lo largo de la historia evolutiva y de la predilección de los miRNAs sobre los factores transcripcionales a lo largo de tiempo evolutivo. El resto de los mRNAs blanco de miRNAs se trata de algunas enzimas y otras proteínas, algunas sin anotación funcional o de función desconocida.














Respecto a los miRNAs, de las 22 familias de miRNAs reportadas en los análisis de degradoma, 14 son miRNAs conservados que pertenecen a las siguientes familias: miR156, miR160, miR159, miR319, miR166, miR171 y miR408, que se encuentran conservadas a nivel de embriofitas (plantas terrestres o plantas superiores); la familia del miR396 que está conservada desde plantas vasculares (traqueofitas); las familias miR169 y miR172, que están conservadas desde helechos y plantas con semilla (Eufilofita); las familias miR164, miR393, miR394, que están conservadas a nivel de plantas con semilla (Espermatofita) y el miR2111 está conservado a nivel de Eudicotiledoneas (conservación de las familias referidas en Taylor et al. 2014).

Tabla 7-2 mRNAs blanco de miRNAs conservados en las plantas terrestres

Familia de miRNA	Blancos de miRNAs Numero de mRNAs / Función que codifican	Tipo FT (verde) / Otro
miR396	11 / GRLs, 1 / UFP	
miR156	8 / SBPs	
miR169	5 / TNFyAlfa Related	
miR160	4 / ARF	
miR164	4 / NAM	
miR172	3 / AP2, 1 / Caseína Cinasa	
miR319	3 / TCP, 1 / MYB	
miR393	2 / GRR-ARATH, 1 / TIR	
miR159	2 / MYB, 1 / NOZZLE	
miR166	1 / HD-ZIP	
miR171	1 / GRAS	
miR394	1 / GRR-ARATH	
miR408	1 / Plastocianin Like Domain	
miR2111	1 / Kelch Motif Protein Binding	

Nota. La anotación corresponde a Gene Ontology a través del NCBI. En la tabla cada cuadro representa a un mRNAs blanco, reportado por el analisis de degradoma. El color verde representa a los mRNAs blanco de tipo Factor Transcripcional (FT), y el resto de los colores representa a los otros tipos de mRNAs blanco que no son factores transcripcionales: azul cielo corresponde a una caseína cinasa, el morado oscuro a TIR1, el café a un dominio de plastocianina, el morado claro a una proteína de función desconocida (UFP) y el azul oscuro a una proteína con motivo Kelch.

Tabla 7-3 mRNAs blanco de miRNAs no conservados en las plantas terrestres

Familia de miRNA	Blancos de miRNAs Numero de mRNAs / Función que codifican	Tipo		
		FT (verde) / Otro		
miR1527	1 / Hidrolasa, 1 / Beta-glucosidasa, 1 / UFP			
miR2199	3 / HLH			
miR1514	2 / NAM			
miR2595	1 / proteína Ribosomal 30S y 40S			
miR2592s	1 / sin anotación funcional			
miR2626	1 / proteína de la familia 4F5			
miR2671a	1 / factor de Transcripción HR-Like			
miR4410	1 / familia de Proteínas no caracterizada UPF0005			

Nota: La anotación corresponde a Gene Ontology a través del NCBI. En la tabla cada cuadro representa a un mRNAs blanco, reportado por el analisis de degradoma. El color verde representa a los mRNAs blanco de tipo Factor Transcripcional (FT), y el resto de los colores representa a los otros tipos de mRNAs blanco que no son factores transcripcionales: café corresponde a una hidrolasa, el naranja a una beta glucosidasa, el morado a una proteína de funcion desconocida, el rosa a una proteína ribosomal, el blanco sin anotación funcional, el cian a una proteína de la familia 4F5 y el amarillo a una proteina de la familia UPF0005.

Por otro lado, en los análisis de degradoma se encontraron 8 familias de miRNAs no conservados que se muestran en la Tabla 7-3. La familia del miR1527 prevalece en soya (*G. max*) (Goodstein et al. 2012, MirBase) y se reporta en frijol (*P. vulgaris*). La familia de miR1514 se ha reportado en *G. max* y en *P. vulgaris* (MirBase), en naranja (*Citrus sinensis*) (Pelaez et al., 2012) y en *Medicago truncatula* (Romero Perez, 2015). El miR2199 se encuentra en *Medicago* sp. y en *P. vulgaris* (Pelaez et al., 2012). Las familias miR2595, miR2592, miR2626, y miR2671 se han detectado previamente en *Medicago* sp. (MirBase.org ver. 20). El miR4410 se ha reportado en *G. max* (MirBase.org, ver. 20).

7.2 Nuevos mRNAs blanco de miRNAs

Los análisis de degradoma arrojaron tres mRNAs blanco nuevos de miRNAs conservados en las plantas terrestres, que no habían sido reportados antes en frijol. Por un

lado están el nuevo mRNA blanco de miR172 (subunidad alfa de la caseína cinasa II) y el nuevo mRNA blanco de miR396 (Phvul.007G253900, sin anotación funcional), que no se habían reportado en ninguna otra especie, y por el otro está el mRNA blanco del miR159, (factor transcripcional NOZZLE) que fue reportado previamente en jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Buxdorf et al., 2010), pero no había sido reportado para *P. vulgaris*. Estos mRNAs blanco se muestran en la Tabla 7-4 junto con su anotación funcional y el número de lecturas encontradas en cada biblioteca.

Tabla 7-4 Se muestran los nuevos mRNAs blanco de miRNAs conservados en las plantas terrestres

Familia de miRNA	ID blanco	Anotación funcional	Lecturas de corte	
			Control	Deshidratación
miR159	Phvul.011G157100	Factor de transcripción de Plantas NOZZLE	3	0
miR172	Phvul.002G012700	Subunidad alfa de la caseína cinasa II	0	11
miR396	Phvul.007G253900	Sin anotación funcional	2	0

Nota: El color verde resalta los mRNAs blanco para los que se detectaron lecturas de corte durante condición control únicamente, y el rojo resalta el mRNA blanco para el que se detectaron lecturas de corte solo durante deshidratación.

Los tres mRNAs blanco fueron reportados por los análisis de degradoma en la biblioteca restringida a un valor $p=0.05$ (95% de confianza) y $p=0.01$ (99% de confianza) sin embargo, como muestra la Tabla 7-4 estas secuencias están muy poco representadas en la secuenciación masiva en comparación con las lecturas que se obtuvieron para otros mRNAs blanco (por ejemplo, NAC1 fue identificado con >2000 lecturas como muestra la Tabla 7-1). Esto puede deberse a que el mayor impacto de estos miRNAs sobre sus mRNAs blanco no ocurre en las condiciones de estrés y/o edad analizadas en este caso, pero esta evidencia permite proponer a estos genes como nuevos mRNAs blanco de miRNAs.

7.3 Cuantificación por RT-qPCR de nueve mRNAs blanco encontrados por análisis de degradoma y los miRNA que los regulan.

De los mRNAs blanco reportados en los análisis de degradoma, se seleccionaron nueve (Tabla 7-5), tres de los cuales mostraban lecturas de corte únicamente en la biblioteca control, tres mRNAs blanco con lecturas de corte solo en la biblioteca deshidratación y tres con lecturas de corte en ambas bibliotecas. Con este grupo, se llevó a cabo el análisis propuesto en los objetivos (sección 4), para ello, se cuantificó la acumulación relativa de los mRNAs blanco seleccionados, la acumulación relativa del miRNA que regula a cada uno y se contrastó con el número de lecturas de corte reportadas en los análisis de degradoma.

Tabla 7-5. mRNAs blanco de miRNAs seleccionados a partir de los datos obtenidos por los análisis de degradoma

MiRNAs	mRNA blanco ID de Phytozome	Lecturas de corte		Anotación Funcional	Abreviatura usada
		C	S		
miR164	Phvul.003G189000	26	0	Factor de transcripción NAM	NAM
miR396	Phvul.001G031000	12	0	Factor de transcripción GRL1	GRL1
miR160	Phvul.009G026200	29	0	Factor de transcripción ARF	ARF
miR172	Phvul.002G012700	0	11	Caseína cinasa	PTK
miR172	Phvul.003G241900	0	4	Factor de transcripción AP2	AP2
miR166	Phvul.010G146200	0	66	Factor de transcripción HEX	TFH
miR164	Phvul.005G055400	2631	2653	Factor de transcripción NAC1	NAC1
miR156	Phvul.007G258400	25	26	Factor de Transcripción SBP	SBP
miR393	Phvul.007G166200	213	289	Ubiquitina ligasaTIR1	TIR1

Nota. El color verde resalta los mRNAs blanco que solo identificó el análisis de degradoma de plantas control, el rojo resalta los mRNAs blanco que solo se identificó el análisis de degradoma de plantas sometidas a deshidratación, y el amarillo resalta los mRNAs blanco que se identificaron en en ambas condiciones. La anotación funcional de los genes corresponde a Pfam 27.0 (Finn et al., 2010), PANTHER (Thomas et al., 2003), KEGG (Kanehisa et al., 2014; Ogata et al., 1999), QuickGO (Binns et al., 2009) a través de Phytozome.net. La anotación de los mRNAs blanco se realizó con la versión 1.0 del genoma de *P. vulgaris* (Phytozome.net).

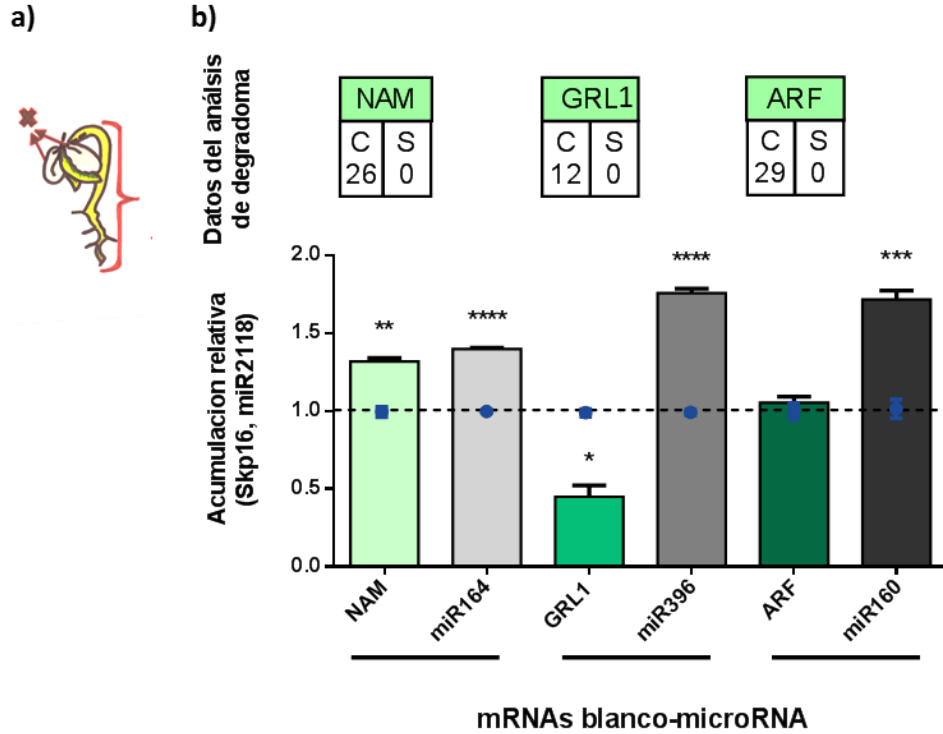
Los resultados de la cuantificación de la acumulación relativa de los nueve mRNAs blanco y sus miRNAs se muestran en las Figuras 7-2 a 7-4. Cada figura se dividió en cuatro paneles (a-d). El panel a esquematiza una plántula a la que se le quitan los cotiledones, con este material biológico se llevó a cabo la cuantificación por RT-qPCR de la acumulación relativa de mRNAs blanco y miRNAs, como muestra la gráfica en el panel b. Es oportuno puntualizar, que en el caso de los mRNAs blanco, las gráficas reportan la acumulación del mRNA blanco no degradado por miRNAs, como se explica en la sección 6.4.a. En el panel b en la parte superior, también se muestran los datos del análisis de degradoma, que indican las lecturas secuenciadas de mRNAs degradados por miRNAs (lecturas de corte). En el panel c se esquematiza que se conserva la raíz de una plántula, con este material biológico se realizó la cuantificación de la acumulación relativa de mRNAs blanco y miRNAs que muestra la gráfica del panel d. En cada caso, se analizaron plántulas sometidas a condiciones control y de deshidratación como se explica en las secciones 5 y 6.2.

En las gráficas se representa la acumulación relativa de cada mRNA blanco y su miRNA en condiciones control y deshidratación. La acumulación relativa en control se estandarizó a uno (línea punteada) y se graficó como un punto. La acumulación relativa en deshidratación se graficó como una barra que se interpreta como el cambio en deshidratación respecto a control. Para ambos datos se graficó el promedio de tres replicas técnicas con error estándar.

La Figura 7-2 a-b, muestra la acumulación relativa de tres mRNAs blanco que solo se degradan en plántulas crecidas en condición control estos son los mRNAs de los factores de transcripción NAM regulado por miR164, GRL1 regulado por miR396, y ARF regulado por miR160. Se espera que la acumulación de mRNAs aumenten en deshidratación ya que los análisis de degradoma detectaron que solo se degradan en plántulas sometidas a condiciones control. En consecuencia, se espera que la acumulación de los miRNAs que los regulan baje deshidratación.

mRNAs blanco de miRNAs que se degradan solo en condición control

Plántulas completas (sin cotiledones)



Raíz de plántula

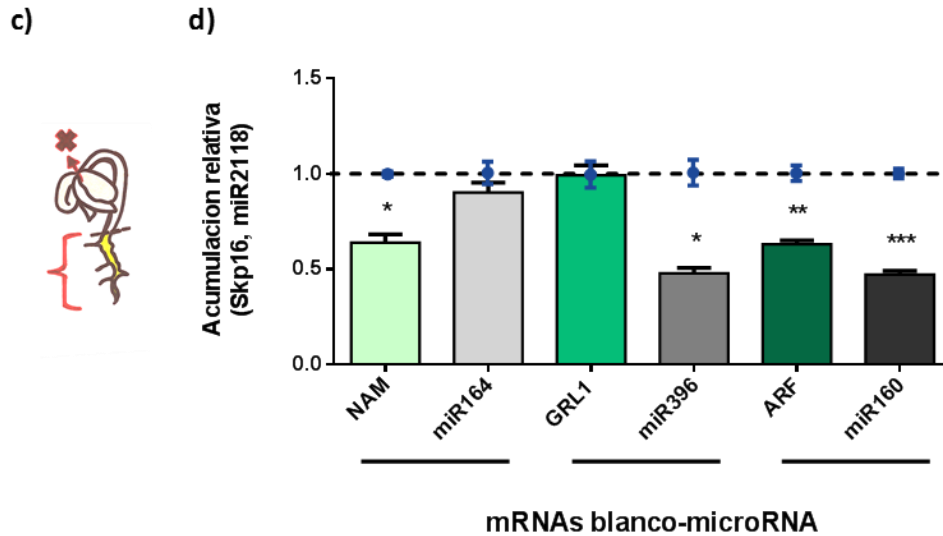


Figura 7-2. Acumulación de los mRNAs blanco que solo se degradan en control y los miRNAs que los regulan. a y c) muestras analizadas (plántula sin cotiledones y raíz de plántula). b superior) lecturas reportadas por el análisis de degradoma para los mRNAs de NAM, GRL y ARF en control (C) y deshidratación (S). Acumulación relativa de los mRNAs y miRNAs en plántula (b inferior) y raíz de plántula (d), las barras muestran la acumulación relativa en deshidratación respecto a control estandarizado como 1 (media de la acumulación como punto azul sobre la línea punteada). El * muestra la confianza estadística de la diferencia de cada barra respecto a 1 de acuerdo a la prueba de t (****,***,**,*)).

En el panel b superior de la Figura 7-2, se muestran las lecturas de corte reportadas por los análisis de degradoma, 26 lecturas de corte para NAM, 12 para GRL1 y 29 para ARF del análisis de degradoma control, y cero lecturas de corte del análisis de degradoma de plántulas sometidas a deshidratación en todos los casos. De acuerdo con estos datos, se espera que la acumulación del mRNA completo de estos factores aumente durante deshidratación esto en plántulas completas. Como indica la gráfica de acumulación relativa del panel b, el mRNA de NAM se acumula un 32% más durante deshidratación respecto a su acumulación en condiciones control, pero ni el mRNA del GRL1 ni el del ARF se comportan de esta forma. La acumulación del mRNA del GRL1 disminuyó un 55% en deshidratación respecto a control y la acumulación del mRNA del ARF no cambia.

Estos resultados muestran que solo el mRNA de NAM se comporta de acuerdo con lo esperado considerando los datos reportados por el degradoma, pero ¿cómo cambia la acumulación de los miRNAs que regulan estos mRNAs blanco en respuesta a deshidratación? Ya que los resultados del degradoma reflejan la actividad de los miRNAs sobre sus mRNAs blanco, se puede inferir de forma indirecta si un miRNA está presente en las condiciones analizadas. Si los mRNAs de los factores NAM, GRL1 y ARF solo se degradan en condición control según el degradoma, se espera que sea esta condición en donde se encuentren más acumulados los miRNA que los regulan y que la acumulación de estos miRNAs disminuya en deshidratación.

Si examinamos la acumulación del miR164 que regula al mRNA de NAM, en la gráfica del panel b de la Figura 7-2, su acumulación aumenta un 40% en deshidratación respecto a control, de forma opuesta a lo esperado. Por su parte, el miR396 que regula al mRNA del GRL1 se acumula un 76% más en deshidratación respecto a control, esto es opuesto a lo esperado de acuerdo con el degradoma, pero coincide con el comportamiento del mRNA del factor GRL1 cuya acumulación disminuye en deshidratación. Por otro lado, la acumulación del miR160, que regula al mRNA del ARF, aumenta 75% en deshidratación, aunque se esperaba que disminuyera de acuerdo con el degradoma.

En la Figura 7-2 d se muestra la acumulación relativa de los mRNAs de los factores NAM, GRL1 y ARF en raíz de plántulas. La acumulación de los mRNAs en este órgano no necesariamente es igual al de la plántula completa y por lo tanto no se espera que los resultados sean cien por ciento consistentes con el análisis de degradoma, aunque es

importante saber hasta qué punto podemos correlacionarlos y además conocer el comportamiento del miRNA y su mRNA blanco en este órgano ya que es el encargado de obtener agua del sustrato.

En raíz de plántula el mRNA del NAM, disminuye un 40% en deshidratación respecto a control, lo que es opuesto a lo que ocurrió al examinar su acumulación en la plántula sin cotiledones. La acumulación del miR164, el miRNA que lo regula, no cambia en deshidratación respecto a control, aunque de la acumulación del NAM hubiéramos inferido que la acumulación de este miRNA había aumentado en deshidratación. Estos resultados son distintos a lo que ocurre en plántula sin cotiledones y no tienen correlación con lo esperado a partir de los resultados de los análisis de degradoma. La acumulación del mRNA del GRL1 no cambió en raíz de plántula pese a que miR396 disminuyó en deshidratación un 52%. La relación entre la acumulación del mRNA de GRL1 y el miR396 en raíz de plántula no es inversa como en plántula y no coincide con lo esperado a partir del degradoma. Por último, la acumulación del mRNA del ARF disminuye un 37% en deshidratación y el miR160 disminuye un 53%, por lo que no tienen una relación inversa. La acumulación de miR160 y el mRNA de ARF en raíz no tienen relación con la acumulación de estos RNAs en plántula ni con lo esperado a partir de los análisis degradoma.

La Figura 7-3 a-b, muestra la acumulación relativa de tres mRNAs blanco que solo se degradan en plántulas crecidas en deshidratación, estos son el mRNA de la subunidad alfa de la caseína cinasa II (PTK) y el del factor de transcripción tipo AP2, que son blanco del miR172, y el factor de transcripción HEX (TFH), que es blanco de miR166. Se espera que, al cuantificar la acumulación del mRNA completo de estos mensajeros, se observe que disminuyen en deshidratación ya que solo se detectaron lecturas de corte en el análisis de degradoma de plántulas sometidas a esta condición. A partir de este razonamiento, también se espera que los miRNAs que los regulan aumenten en deshidratación.

El análisis de degradoma de plántulas sometidas a deshidratación identificó 11 lecturas de corte para la PTK, 4 para el factor AP2, y 66 para el TFH (Figura 7-3 b). Estos mRNAs blanco no fueron identificados por el análisis de degradoma de control. La gráfica de la Figura 7-3 b muestra que la acumulación del mRNA de la PTK disminuye un 64% en deshidratación respecto control. Esto coincide con lo esperado para los mRNAs de este

grupo, sin embargo, la acumulación del mRNA del AP2 y del mRNA del THF no cambian en deshidratación.

El análisis de degradoma de plántulas en deshidratación identificó al mRNA de la PTK y al mRNA del AP2 como blancos del miR172. Se esperaba que este miRNA aumentara en respuesta a deshidratación, pero no fue posible cuantificarlo, probablemente debido a que se acumula muy poco en las muestras analizadas y por lo tanto no se encuentran dentro del límite de detección del RT-qPCR. El THF fue identificado como blanco del miR166, la acumulación de este miRNA si aumenta en respuesta a deshidratación, y se cuantificó un aumento del 12%. En este grupo de mRNAs que solo se degradan durante deshidratación, solo el mRNA del AP2 se acumuló de acuerdo con lo esperado a partir del análisis del degradoma, pero no es posible establecer una relación entre su acumulación y la actividad del miR172 porque no pudo cuantificarse. Además, no fue posible identificar un par miRNA-mRNA blanco con la relación inversa esperada.

La Figura 7-3 d muestra la acumulación relativa de la PTK, AP2 y THF en raíz de plántula, así como la acumulación de miR166 que regula al THF, el miR172 tampoco pudo ser cuantificado en raíz debido a su baja acumulación. En raíz, la acumulación de la PTK no cambia durante deshidratación, mientras que en plántula sin cotiledones su acumulación disminuía. La acumulación del factor AP2 disminuye un 55% en deshidratación, lo que es distinto a lo observado en plántula sin cotiledones, donde no cambio su acumulación significativamente. Finalmente, la acumulación del factor THF no cambia en raíz de plántula durante deshidratación a pesar de que en esta condición el miR166 disminuye un 34%.

mRNAs blanco de miRNAs que se degradan solo en condición deshidratación

Plántulas completas (sin cotiledones)

a)



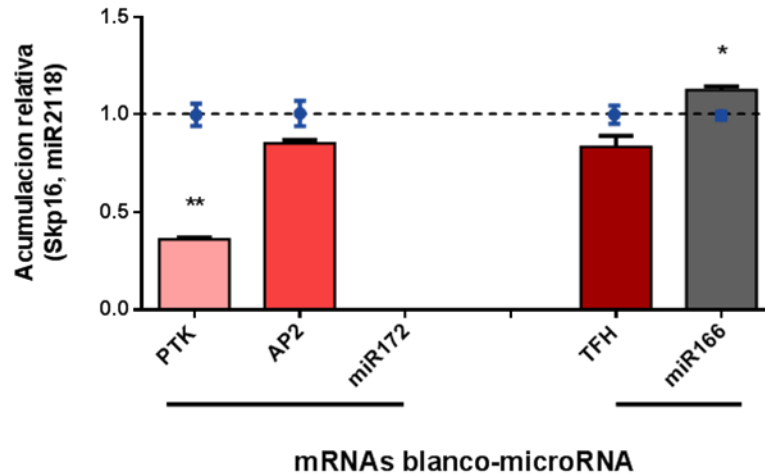
b)

Datos del análisis de degradoma

PTK	
C	S
0	11

AP2	
C	S
0	4

TFH	
C	S
0	66



Raíz de plántula

c)



d)

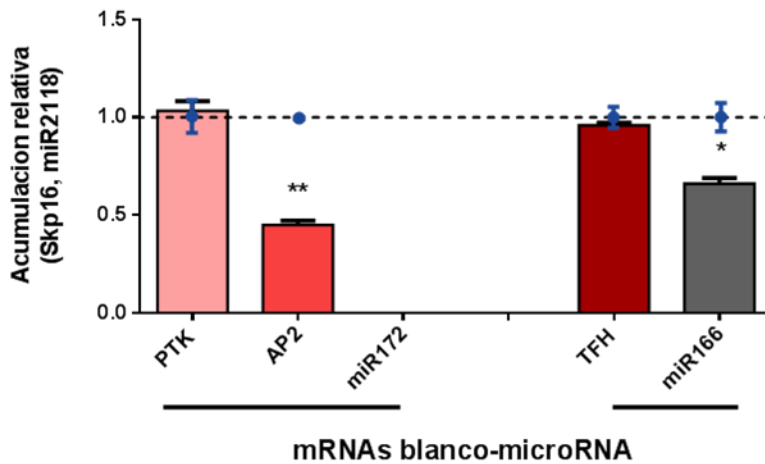


Figura 7-3. Acumulación de los mRNAs blanco que solo se degradan en deshidratación y los miRNAs que los regulan. a y c) muestras analizadas (plántula sin cotiledones y raíz de plántula). b) lecturas reportadas por el análisis de degradoma para los mRNAs de PTK, AP2 y TFH. en control (C) y deshidratación (S). Las gráficas muestran la acumulación relativa de cada mRNA y miRNA en deshidratación, respecto a control (referido a 1 y denotado con la línea punteada) en plántula (b inferior) y raíz de plántula (d). El símbolo * muestra la confianza estadística de la diferencia de cada barra respecto a 1 de acuerdo a la prueba de t (**,*)

En la Figura 7-4 se presenta la acumulación relativa de tres mRNAs blanco identificados tanto por el análisis de degradoma de plántulas control como por el análisis de degradoma de plántulas sometidas a deshidratación. Estos son el mRNA del factor de transcripción NAC1, regulado por el miR164; el mRNA del factor de transcripción SBP, regulado por el miR156 y el mRNA de la ubiquitina ligasa TIR1, regulado por el miR393. Se seleccionaron estos mRNAs blanco debido a que el número de lecturas de corte reportadas por los dos análisis de degradoma fue similar, encontrándose en el mismo orden de magnitud como se ilustra en la parte superior de la figura 7-4 b. Para el NAC1, el análisis de degradoma control reportó 2 631 lecturas y el de deshidratación 2653 lecturas, para el SBP se reportaron 25 y 26 lecturas respectivamente, y para la TIR1 213 y 289 lecturas respectivamente. De acuerdo con esto, se espera que no haya cambios en la acumulación de estos tres mRNAs blanco, ni en la acumulación de los miRNAs que los regulan.

En la Figura 7-4 b se muestra la acumulación del mRNA de NAC1 que en plántulas disminuye un 46% en respuesta a deshidratación, lo cual es inesperado de acuerdo con los análisis de degradoma. En esta figura también se observa que la acumulación del mRNA del factor de transcripción SBP no cambia significativamente en deshidratación, lo que coincide con lo esperado para este grupo de mRNAs blanco. También se observa que el mRNA de la enzima TIR1 aumentó su acumulación un 58 % durante deshidratación, como para el factor SBP, esto tampoco coincide con lo esperado.

El comportamiento de la acumulación de los miRNAs que regulan estos blancos tampoco es esperado de acuerdo con el degradoma. La acumulación del miR164 que regula al mRNA del factor NAC1 aumenta un 40% en deshidratación, el miR156 que regula al mRNA del factor SBP disminuye un 38% en deshidratación, y miR393 que regula al mRNA de la enzima TIR1, no pudo ser cuantificado lo que se debe posiblemente a su baja acumulación. Aunque no se esperaba que hubiera cambios en este grupo de mRNAs blanco, cabe resaltar que solamente el mRNA de NAC1 y el miR164 se comportan como es esperado entre un miRNA y su mRNA blanco.

Como muestra la Figura 7-4 d, en raíz de plántula el mRNA de NAC1 también disminuye en deshidratación, en este caso solo un 28%, sin embargo, el miR164 no cambia en deshidratación como se observó en plántula sin cotiledones. Por su parte, la acumulación del mRNA del SBP en raíz de plántula no cambió en deshidratación y miR156

disminuyó un 37%, este comportamiento es similar al que se observó en plántulas sin cotiledones. Aunque en plántula sin cotiledones, el mRNA de la TIR1 aumentó, en raíz de plántula este mRNA disminuyó un 42% en deshidratación, sin embargo, en este órgano tampoco se pudo cuantificar al miR393 que lo regula. La acumulación de ningún par miRNA-mRNA blanco se comportó de acuerdo con lo esperado a partir del degradoma.

A partir del análisis de las figuras 7-2, 7-3 y 7-4, se puede concluir que el número de lecturas de corte reportadas por los análisis de degradoma control y deshidratación, no permiten predecir la acumulación del mRNA no degradado en deshidratación respecto a control, ni inferir el estatus de la acumulación del miRNA que lo regula, ya que como en el caso de miR172 y miR393, aunque el degradoma identificó fragmentos de mRNAs degradados por estos miRNAs, no fue posible determinar su acumulación. Además, en pocos casos la acumulación del mRNA blanco y el miRNA que lo regula se comportan de forma consistente con lo esperado. Esto se discute más adelante.

mRNAs blanco de miRNAs que se degradan en condición control y deshidratación

Plántulas completas (sin cotiledones)

a)



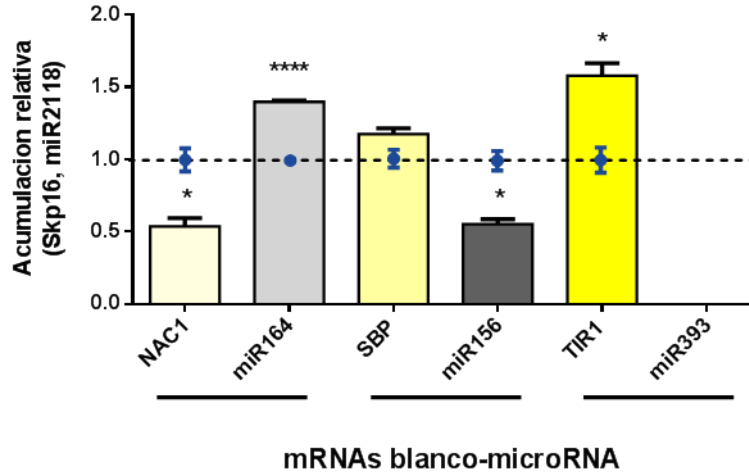
b)

Datos del análisis de degradoma

NAC1	
C	S
2631	2653

SBP	
C	S
25	26

TIR1	
C	S
213	289



Raíz de plántula

c)



d)

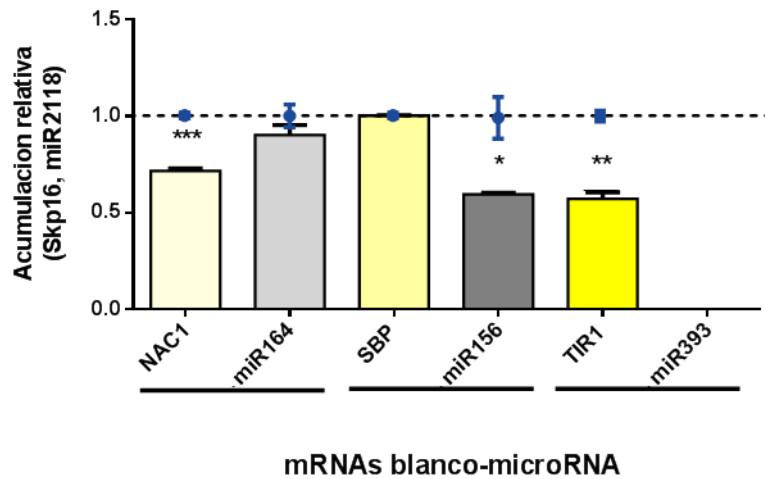


Figura 7-4. Acumulación de los mRNAs blanco que se degradan en control y deshidratación, y los miRNAs que los regulan. a y c) muestras analizadas (plántula sin cotiledones y raíz de plántula). b) lecturas reportadas por los análisis de degradoma para los mRNAs de NAC, SBP y TIR1 en control (C) y deshidratación (S). Las gráficas muestran la acumulación relativa de cada mRNA y miRNA en deshidratación, respecto a control (referido a 1 y denotado con la línea punteada) en plántula (b inferior) y raíz de plántula (d). El símbolo * muestra la confianza estadística de la diferencia de cada barra respecto a 1 de acuerdo a la prueba de t (****,***,**,*).

8. Discusión

Como se discutió en la introducción, el estudio de los miRNAs y su papel durante estrés se ha estudiado prioritariamente en plantas modelo, y solo recientemente se han incluido especies de interés agronómico como *P. vulgaris*. Esto se debe a que las herramientas como el genoma de *P. vulgaris* no estuvieron disponibles sino recientemente. Por otro lado, la participación de la regulación mediada por miRNAs en estrés abiótico en *P. vulgaris* era un tópico inexplorado hasta la contribución de Arenas-Huertero y colaboradores (2009), que describió miRNAs conservados en *P. vulgaris* y su presencia en diferentes condiciones, incluyendo condiciones de estrés abiótico.

Lo anterior, sentó un importante precedente en el estudio de la participación de los miRNAs en respuesta a estrés, sin embargo, entender el papel que juega este mecanismo de regulación, requiere develar la otra cara de la moneda que es la identidad de los mRNAs regulados por miRNAs. El avance que se ha tenido en este aspecto ha sido posible gracias a las tecnologías de secuenciación masiva y a la disponibilidad del genoma de *P. vulgaris*. Pelaez y colaboradores (2012) contribuyó con la identificación de la población miRNAs en *P. vulgaris* a gran escala, a través de la secuenciación masiva de especies pequeñas de RNA. Dada la presencia de estas especies de RNAs pequeños en varios organismos, la pregunta que se origina es cuál es su función en la célula, y la clave para responder a esta pregunta es identificar los mRNAs blanco de esta regulación. Por lo tanto, el siguiente paso, fue la identificación de los mRNAs blanco de miRNAs en *P. vulgaris*, lo que, en este punto, se convirtió en el principal factor limitante para entender la función de este mecanismo de regulación. En el presente trabajo, se muestran los resultados del análisis de los análisis de degradoma de plántulas de frijol en condición control y deshidratación, lo que contribuye al hallazgo de mensajeros regulados por miRNAs y, además, de forma muy importante, contribuye al análisis de la participación del miRNA y su mRNAs blanco en respuesta a estrés hídrico. Los análisis de degradomas que se tomaron como referencia en este trabajo, son parte de un análisis llevado a cabo por Formey y colaboradores (2015).

8.1 Se identificaron 65 mRNAs blanco de miRNAs en *P. vulgaris*

A través de la estrategia masiva que es el análisis de degradoma, se identificaron en la suma de la biblioteca control y la biblioteca de deshidratación, un total de 65 mRNAs blanco de miRNAs (Tabla 7-1), lo que aumenta el catálogo de mRNAs blanco con evidencia de regulación en *P. vulgaris*, respecto al trabajo de Arenas-Huerta y colaboradores (2009), donde se predijeron 13 mRNAs blancos de miRNAs conservados, mediante análisis bioinformático y se demostraron 7 mediante experimentos tipo 5' RACE.

El peso de identificar 65 mRNAs blanco para *P. vulgaris* se evidencia si se considera que Zhang y colaboradores en 2010, tenían una base de datos de miRNAs en plantas (PMRD: plant miRNA database, website), donde solo se incluyen posibles mRNAs blanco para *A. thaliana*, arroz, álamo, soya, algodón, *M. truncatula* y maíz, pero ninguno confirmando para *P. vulgaris*. Esto muestra la poca información disponible sobre los mRNAs blanco de miRNAs en general y en frijol, ya que los mRNAs blanco conocidos en ese momento se habían encontrado principalmente mediante estrategias bioinformáticas y el frijol no era un modelo estudiado. En cinco años este panorama cambió de forma acelerada, gracias a la disponibilidad del genoma de *P. vulgaris* y a la contribución del análisis de degradoma.

El antecedente más cercano de este tipo de experimentos para leguminosas, se encuentra en soya (*Glycine max*), donde Hu y colaboradores (2013), reportaron un análisis de degradoma, en sus resultados ellos reportan 211 mRNAs blanco potenciales de miRNAs, de los cuales 174 se encuentran conservados en el reino vegetal. Otro ejemplo es la aportación también en soya de Shamimuzzaman & Vodkin (2012), que reportan mRNAs blanco específicos en semilla. En el análisis de los degradomas construidos para frijol, analizados aquí, se encontraron solo 65 mRNAs blanco, pero el análisis se hizo en dos muestras de plántulas, una de control y una de deshidratación, en cambio, Hu y colaboradores (2013) usaron muestras de plantas de diferentes edades combinadas. Esto explicaría la diferencia entre el número de mRNAs blanco encontrados en cada biblioteca de análisis de degradoma, además de las diferencias biológicas de cada especie. El diseño de este análisis tiene la ventaja de que no solo permite generar un catálogo mayor de mRNAs blanco de miRNAs en *P. vulgaris*, sino que además aporta información acerca de la regulación de los mRNAs blanco de miRNAs en respuesta a estrés hídrico.

En cuanto a la composición de los mRNAs blanco encontrados en los análisis de degradoma, los resultados permiten concluir que el tipo de mRNA blanco de miRNAs más común, fueron los factores de transcripción (Figura 7-1) que representan el 75% de los mRNAs blanco de miRNAs. Esto es consistente con las tendencias reportadas en la literatura (Carrington, 2003), donde se ha establecido que la mayoría de los mRNAs blanco de miRNAs en plantas, son factores de transcripción. El resto de los blancos encontrados fueron mRNAs que codifican para enzimas y otras proteínas, y mRNAs que codifican para algunas proteínas sin anotación funcional. Los mRNAs blanco de miRNAs que codifican enzimas miRNAs no son comunes, pero es interesante dado el papel específico que el blanco podría tener en una vía metabólica.

Otro aspecto que hay que considerar en los resultados de las bibliotecas de los análisis de degradoma de *P. vulgaris*, es la presencia de mRNAs blanco ya conocidos. Al anotar las bibliotecas con el servicio de Phytozome.net, se encontraron coincidencias entre los resultados reportados por los análisis de degradoma y los mRNAs blanco de miRNAs que ya se conocían en *P. vulgaris* y otras leguminosas, lo que respalda dichos datos y puede ser tomado como un control de calidad de este experimento. Ejemplo de estos son: el mRNA que codifica para las proteínas NAM (blanco de miR1514 o miR164), los que codifican para los factores de transcripción SBP (blanco de miR156), los que codifican para los factores de transcripción MYB (blanco de miR159), los que codifican para factores de transcripción ARF (blanco de miR160), los que codifican para proteínas AP2 (blanco de miR172), los que codifican para los factores de transcripción TCP (blanco de miR319) y los mRNAs que codifican para los factores de transcripción GRL (blanco de miR396), que son los más representados en las bibliotecas de los análisis de degradoma.

8.2 Se encontraron 52 mRNAs blanco de miRNAs conservados y 13 mRNAs blanco de miRNAs no conservados

Se ha reportado que la mayoría de los mRNAs blanco de miRNAs son mRNAs que codifican factores transcripcionales (Jones-Rhoades et al., 2006), lo que los coloca como actores centrales en la regulación genética al afectar genes que son reguladores en sí mismos. De los 65 mRNAs blanco identificados por los análisis de degradoma, 53 fueron anotados como factores de transcripción. Este resultado coincide con lo que la literatura ha

reportado para otras plantas. Es interesante observar además lo que ocurre si dividimos los mRNAs blanco en dos categorías, por un lado, los mRNAs blanco de miRNAs conservados en plantas y por el otro, los de miRNAs no conservados como se mostró en la Tabla 7-2 y 7-3 de la sección de resultados.

En la Tabla 7-2 se mostraron los 52 mRNAs blanco de miRNAs conservados, de los cuales 47 son factores transcripcionales. A simple vista, de esta tabla se puede concluir que la mayoría de los mRNAs blanco de miRNAs conservados son factores transcripcionales, y que pocos pertenecen a otras categorías como enzimas y otras proteínas. En la Tabla 7-3 se mostraron los mRNAs blanco de miRNAs conservados. De esta tabla se puede concluir que 6 de 13 mRNAs blanco son factores transcripcionales. Esta proporción corresponde a menos de la mitad de los blancos de miRNAs no conservados, lo que sugiere que los miRNAs conservados se han seleccionado para regular mRNAs que codifican a los factores transcripcionales como blancos y que esta tendencia cambia en los miRNAs que aparecieron más recientemente.

Esto sugiere que los mRNAs blanco miRNAs que se originaron recientemente en el tiempo evolutivo, tienen un papel más acotado ya que regulan proteínas puntuales y no reguladores globales, son estrategias que prevalecen en grupos de plantas específicos.

8.3 Los análisis de degradoma identificaron tres nuevos mRNAs blanco de miRNAs conservados en *P. vulgaris*

Gracias al carácter global del análisis de degradoma, fue posible identificar tres mRNAs blanco novedosos para miRNAs conservados (Tabla 7-4). Estos mRNAs blanco codifican para el factor de transcripción NOZZLE (Phvul.011G157100) (regulado por miR159), la subunidad alfa de la caseína cinasa II (Phvul.002G012700), (regulado por miR172) y una proteína sin anotación funcional (Phvul.007G253900) (regulado por miR396). Los tres mRNAs blanco nuevos se identificaron en un solo análisis de degradoma. El factor NOZZLE y de la proteína sin anotación funcional se identificaron por el degradoma control con tres y dos lecturas de corte para cada mRNA respectivamente. La subunidad alfa de la caseína cinasa fue identificada por el análisis de degradoma de plántulas en deshidratación con cuatro lecturas de corte. Estos números son bajos comparados con el

mRNA de NAC1 que fue identificado con 2 653 lecturas en el análisis de degradoma de plántulas en deshidratación, lo que lo hace el blanco con mayor número de lecturas de corte secuenciadas. No obstante, no hay que olvidar, que los datos de secuenciación analizados, se encuentran normalizados al total de lecturas de cada secuenciación masiva, por lo que 4 lecturas de corte no corresponden a 4 moléculas de mRNA degradado sino posiblemente a más. Por otro lado, estos mRNAs blanco tienen hasta un 99% de confianza estadística como mRNAs blanco.

Con el fin de apoyar estos resultados, se analizó cada par de miRNA-mRNA blanco nuevo, con RNAhybrid versión 2.2 (Krüger y Rehmsmeier, 2006), que ha sido usado como predictor de mRNAs blanco de miRNAs. Esta herramienta busca la región de alineamiento con menor energía libre de hibridación entre un RNA largo y uno corto, el resultado debe ser menor o igual a cero y se interpreta como un sitio de unión estable entre el miRNA y su mRNA blanco, mientras menor sea el valor, la estabilidad de esta unión es mayor. Como referencia, la energía de hibridación entre miR159 y MYB101, cuya interacción ha sido validada (Reyes y Chua, 2007), es de 34.1 kcal/mol (no se muestra el análisis de RNAhybrid). Estos resultados se muestran en las figuras 8-1, 8-2 y 8-3.

En estas figuras también, se comparó este análisis mediante RNAhybrid con los resultados experimentales del análisis de degradoma. Lo que se hizo fue comparar la posición del alineamiento del miRNA sobre el mRNA blanco, encontrada por RNAhybrid, con la posición encontrada por el análisis de degradoma. En el análisis de degradoma se genera para cada mRNA blanco una gráfica denominada T-plot, que ilustra la frecuencia de los mRNAs degradados alineados sobre la secuencia del mRNA blanco identificado. En esta grafica se indica el inicio del fragmento de mRNA secuenciado, y se resalta en rojo la frecuencia de las secuencias cuyo inicio coincide con el sitio de corte de miRNA sobre el mRNA blanco.

Se debe considerar que un miRNA dirige el corte de su mRNA blanco entre la base 10 y 11, contando a partir del primer nucleótido del miRNA (5'→3'), por lo que se espera que el sitio de corte se ubique diez nucleótidos después del inicio de su alineamiento. RNAhybrid reporta la posición del primer nucleótido del miRNA sobre el mRNA blanco y el análisis de degradoma el sitio de corte, por lo que para compararlas se sumaron 10 nucleótidos a la posición que encontró RNAhybrid.

El miR159 es un miRNA conservado en las plantas terrestres (Taylor et al., 2014) desde las briofitas hasta las plantas con flor. Se ha reportado en la literatura que regula a factores de transcripción tipo MYB que están relacionados a respuestas al estrés biótico y abiótico además de tener roles en procesos de desarrollo y diferenciación celular, entre otros (Ambawat et al., 2013). Este es el primer reporte del mRNA que codifica para el factor NOZZLE (Phvul.011G157100) como blanco de miR159 en *P. vulgaris*.

En el panel a de la Figura 8-1, se muestra el alineamiento entre el miR159 y el mensajero del factor de transcripción NOZZLE. El apareamiento es casi perfecto como es común entre los miRNAs y sus mRNAs blanco en plantas y, en la región semilla (marcada en rojo), solamente hay un nucleótido desapareado. La energía libre del alineamiento entre el miRNA y el mRNA blanco es de -31.4 kcal/mol, ya que es menor que cero se puede concluir que es una interacción energéticamente favorable, y además es cercana a la energía libre entre MYB101 y miR159 (-34.1 kcal/mol). En el panel b, se muestra la T-plot para del mRNA de NOZZLE, la cual indica que miR159 corta al mRNA de NOZZLE en la base 607 (indicado con la línea roja). El sitio donde hibrida el miR159 sobre el mRNA de NOZZLE encontrado con RNAhybrid inicia en el nucleótido 595, por lo que el sitio de corte se espera en la base 605, por lo que existe un desfase de dos nucleótidos entre ambos análisis. Este desfase de dos nucleótidos no es importante, ya que hay factores que afectan el sitio de corte y su identificación. Hay que considerar que la muestra es muy pequeña ya que solo ofrece 3 lecturas normalizadas, y que, ya que el análisis de degradoma es una estrategia global, no ofrece una alta resolución para todos los mRNAs blanco identificados. Estos resultados permiten proponer al factor NOZZLE como un blanco de miR159 en *P. vulgaris*.

Alineamiento entre miR159 y el factor de transcripción NOZZLE y su T-plot

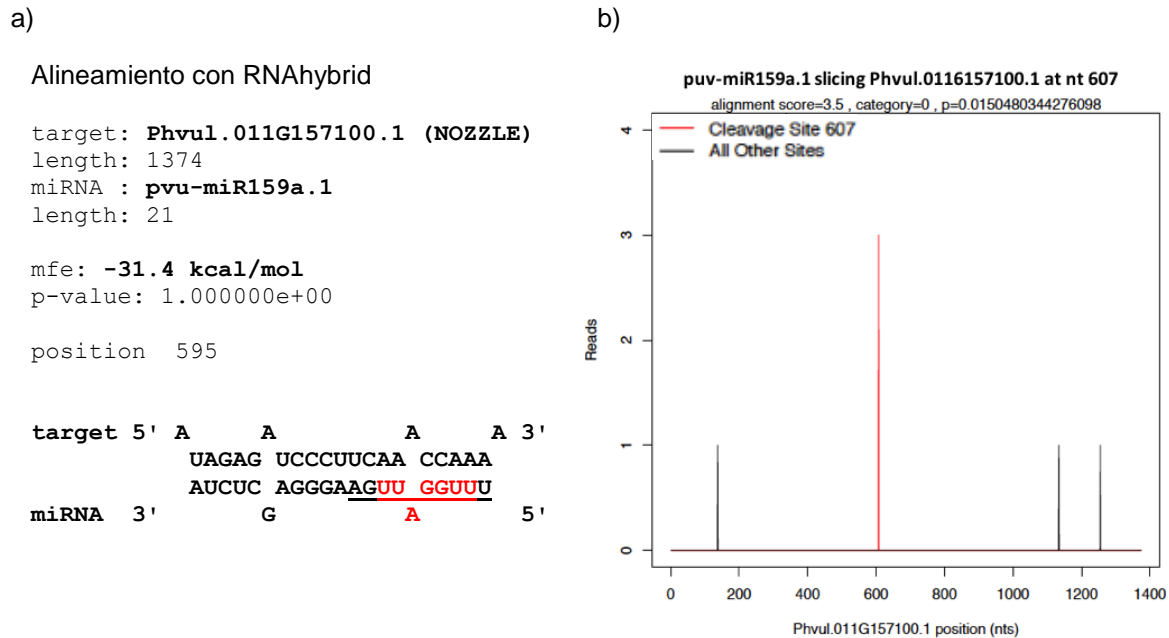


Figura 8-1. Apareamiento entre miR159 y NOZZLE, y lecturas de corte del análisis de degradoma. En la parte a, se muestran el alineamiento entre miR159 y el mensajero de NOZZLE, en RNAhybrid. Se muestra que la energía libre del duplex es de -31.4 kcal/mol. En b, se muestra la t-plot de Phvul.0116157100.1 y miR159se donde se indica la posición de los fragmentos secuenciados sobre el mensajero de NOZZLE. En rojo, se muestra para “a” la región semilla del miRNA y para “b” la frecuencia de las lecturas del sitio de corte.

El miR172 regula típicamente factores transcripcionales tipo AP2 que participan en la definición de la identidad floral (Aukerman y Sakai, 2003) y en respuesta a estrés (Mizoi et al., 2012). El análisis de degradoma de plántulas en deshidratación identificó un nuevo tipo de mRNA blanco para miR172, el mensajero de la subunidad alfa de la caseína cinasa II (PTK). Este mRNA blanco no se ha reportado en otras plantas, lo que se corroboró mediante una búsqueda en la base de datos de literatura de miRNAs PASmiR (S Zhang et al., 2013). El alineamiento de este par miRNA-mRNA blanco, se analizó con RNAhybrid, y en la Figura 8-2 a se observa que la energía libre del apareamiento entre miR172 y el AP2 es de -28.8 kcal/mol, esta interacción esta favorecida energéticamente, aunque sea menor a la energía de hibridación entre el mRNA del MYB101 y el miR159 o entre el mRNA del NOZZLE y el miR159.

En el panel b de la Figura 8-2, se muestra la T-plot del mRNA de la PTK. En esta grafica se indica en rojo que el sitio de corte del miR172 sobre este mRNA se encuentra en el nucleótido 471. De acuerdo con RNAhybrid, la posición donde inicia el alineamiento del miR172 sobre el mRNA de la PTK, es el nucleótido 461, por lo que al agregar 10 nucleótidos el sitio de corte se espera en el nucleótido 471, lo que coincide con lo que reporta el análisis de degradoma. Estos resultados permiten proponer al mRNA de la subunidad alfa de la caseína cinasa II como un blanco de miR172, aunque se deben llevar a cabo más análisis ya que no fue posible cuantificar al miR172 en las muestras estudiadas.

Alineamiento entre el miR172 y la PTK y su T-plot

a)

a) Alineamiento con RNAhybrid

target: Phvul.002G012700.1 (PTK)

length: 1620

miRNA : zma-miR172a

length: 21

mfe: -28.8 kcal/mol

p-value: 1.000000e+00

position 461

```

target 5'  C U      A          G 3'
           GC GCAU AUCAAGAUUCU
miRNA   3' UA  U      G  UAGUUCUAAGA 5'
  
```

b)

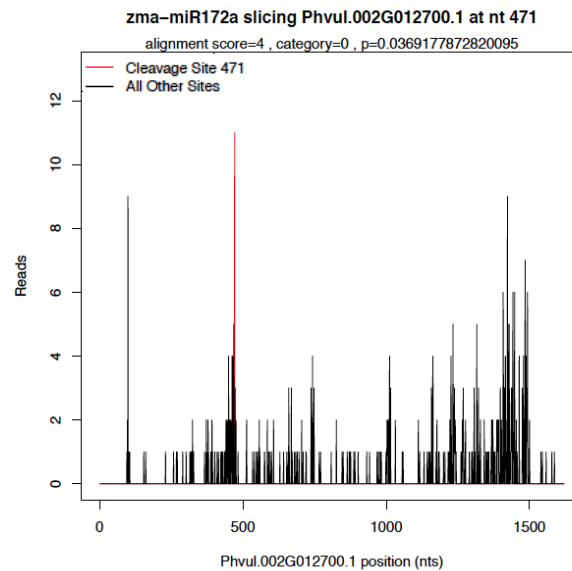


Figura 8-2. Apareamiento entre miR172 y la PTK, y lecturas de corte del analisis de degradoma. En la parte a, se muestran el alineamiento entre miR172 y el mensajero de la proteín casein cinasa, en RNAhybrid. Se muestra que la energía libre del duplex es de -22.4 kcal/mol. En b, se muestra la posición de los fragmentos secuenciados sobre el mensajero de PTK. En rojo, se muestra para “a” la región semilla del miRNA y para “b” la frecuencia de las lecturas del sitio de corte.

Los mRNAs blanco de miRNAs que codifican para enzimas son poco frecuentes en plantas, de hecho, la caseína cinasa, es uno de los cuatro mRNAs blanco de carácter enzimático de un total de 65 mRNAs blanco identificados en este estudio. Las otras enzimas son metilglutaconil-CoA, beta-glucosidasa 1, y la ubiquitina ligasa TIR1. El análisis del efecto de los miRNAs sobre estos mRNAs blanco que tienen un papel puntual (comparado con los factores de transcripción) resulta interesante para entender el rol de los miRNAs durante estrés, ya que el efecto del miRNA se podría observar de inmediato en una función, además las enzimas participan en diversos procesos, por ejemplo, la caseína cinasa II participa en el desarrollo de la planta y se sabe que participa en el ritmo circadiano (Mulekar y Huq, 2013)

El miR396, regula factores de transcripción pertenecientes a la familia de los GRL (Growth-regulating factor like) que también fueron identificados por los análisis de degradoma. La red regulatoria del miR396-GRL mejor caracterizada, es la que regula el desarrollo de la hoja a través de su efecto en la proliferación y división celular (Ke Zhang et al., 2015). El mRNA del locus Phvul.007G253900.1 fue identificado como blanco de miR396. No está caracterizado como un GRL, y aunque tiene posibles homólogos en soya y otras plantas (analizado mediante Phytozome.net), no hay ninguna referencia a su función en el genoma de *Phaseolus vulgaris* versión 1 (Phytozome.net), y no ha sido reportado como blanco de miRNAs. La Figura 8-3 a muestra el alineamiento entre en mensajero de Phvul.007G253900.1 y el miR396b que se encuentra *P. vulgaris* (Pelaez et al., 2012), la energía libre de hibridación es de -30.1 kcal/mol, esta es una unión favorecida energéticamente y que es incluso mayor a la energía determinada entre miR172 y el mRNA de la PTK. De acuerdo con RNAhybrid, el miR396 se alinea con el mRNA del Phvul.007G253900.1 a partir del nucleótido 140, por lo que se espera que el sitio de corte se ubique a 10 nucleótidos es decir en el nucleótido 150. El panel b de la Figura 8-3 corresponde a la T-plot del mRNA blanco, donde se observa que el sitio de corte identificado por el degradoma corresponde a la base 151, lo que coincide muy cercanamente con el sitio de corte predicho con los resultados de RNAhybrid. El desfase de un solo nucleótido es muy pequeño por lo que estos resultados permiten proponer que el mRNA del Phvul.007G253900.1 es blanco de miR396, aunque debe ser corroborado.

Alineamiento entre el miR396 y el Phvul.007G253900.1 y su T-plot

a)

a) Alineamiento con RNAhybrid

```

target: Phvul.007G253900.1
length: 643
miRNA : vvi-miR396b
length: 20

mfe: -30.1 kcal/mol
p-value: 1.000000e+00

position 140

target 5' A G A 3'
        AGU UAAGAAAGUUGUGGAA
        UCA GUUCUUUCGACACCUU
miRNA 3' A 5'
    
```

b)

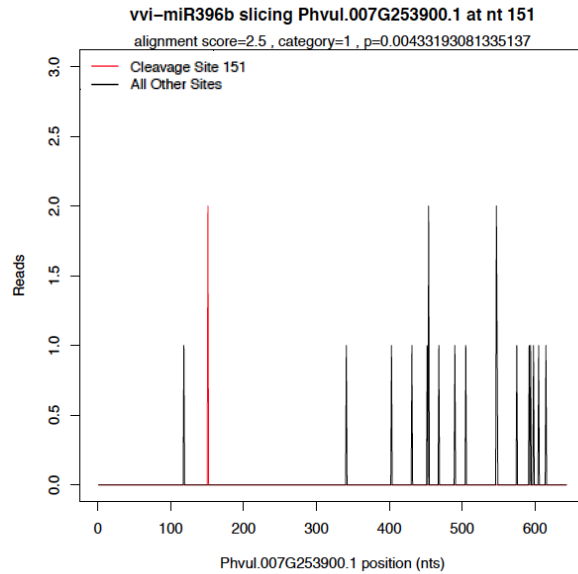


Figura 8-3. Apareamiento entre miR396 y la proteína sin anotación funcional (Phvul.007G253900), y lecturas de corte del análisis de degradoma. En la parte a, se muestran el alineamiento entre miR172 y el mensajero de la proteína caseína, en RNAhybrid. Se muestra que la energía libre del dúplex es de -30.1 kcal/mol. En b, se muestra la posición de los fragmentos secuenciados sobre el mensajero de Phvul.007G253900.1. En rojo, se muestra para "a" la región semilla del miRNA el sitio de corte y para "b" la frecuencia de las lecturas del sitio de corte.

Estos resultados muestran que el análisis de degradoma es una estrategia que permite identificar nuevos mRNAs blanco de miRNAs, y además que es necesario estudiar diversas condiciones de tratamiento ya que los nuevos mRNAs blanco de miRNAs fueron identificados solo por uno de los degradomas.

Aunque solo en el caso del miR172 y la PTK, el análisis del degradoma y el análisis con RNAhybrid indicaron el sitio de corte en la misma base, cabe considerar que el análisis de degradoma es una estrategia global que puede no ser precisa a una resolución muy fina, y que son diversos factores los que pueden afectar el sitio de corte de un miRNA sobre su mRNA blanco y la propia identificación de este sitio. Cabe recordar que cuando se busca el sitio de corte de un miRNA sobre su mRNA blanco mediante ensayos tipo 5' RACE, es común observar que algunas secuencias no inician exactamente en el mismo sitio de corte,

por lo que se analizan al menos eventos de secuenciación de mRNAs degradados y se reporta el sitio de corte como una fracción $n/10$.

Es necesario un análisis más detallado de estos mRNAs blanco y su regulación por miRNAs, y saber si participan en la respuesta a estrés por deshidratación. Pérez-Morales (datos no publicados) llevó a cabo el análisis de estos nuevos blancos de miRNAs mediante ensayos tipo 5' RACE, pero no fue posible corroborarlos, tal vez debido a que los mRNAs blanco o los miRNAs no se acumulan de forma suficiente en el material biológico analizado.

8.4 Acumulación de los mRNAs blanco de miRNAs seleccionados durante deshidratación

En la sección 7.3 se presentó la acumulación relativa en deshidratación, de los 9 mRNAs blanco seleccionados y los miRNAs que los regulan. La acumulación relativa de mRNAs blanco durante deshidratación se contrastó con el número de lecturas de corte identificadas por los análisis de degradoma. Vale la pena recapitular en este punto, la lógica de esta comparación.

Como se explica en la sección 1.4.c, el principal efecto de los miRNAs sobre sus mRNAs blanco en plantas, es dirigir su degradación. De esta forma el efecto de la acumulación de un miRNA es la disminución en la acumulación del mRNA blanco que reconoce, estableciendo una relación inversa.

El análisis de degradoma, es una estrategia de secuenciación masiva que identifica los mRNAs degradados por miRNAs, para cada mRNA identificado se asigna un número de lecturas normalizadas, que en esta tesis denominamos lecturas de corte, debido a que las secuencias van del sitio de corte del miRNA sobre el mRNA blanco hacia el extremo 3' de este último. De esta forma las lecturas de corte reflejan qué tanto se ha degradado un mRNA blanco por la actividad del miRNA que lo regula. En este contexto se espera que la población mRNAs blanco completos (mRNAs que cuentan con su cap 5' y su extremo 3' poliA) disminuya conforme el miRNA que lo regula aumente y que la población de mRNAs degradados aumente también.

De este razonamiento deriva la hipótesis de que las lecturas de corte reflejan cuantitativamente la acumulación del miRNA y del mRNA blanco. Una hipótesis subyacente de este escenario es que la vía de regulación mediada por miRNAs es un factor que modula la acumulación de mRNAs durante deshidratación. Estas hipótesis se tuvieron en mente durante el análisis de los resultados de la cuantificación de la acumulación de mRNAs y miRNAs, con conciencia de que otras explicaciones son posibles.

De esta forma, en la sección 7.3 se están comparando estos tres datos. Las lecturas de corte que reflejan la acumulación de los mRNAs degradados por miRNAs, la acumulación del mRNA blanco no degradado, y la acumulación del miRNA que degrada al mRNA blanco analizado, todo esto en plántulas tratadas con condiciones óptimas de irrigación y en plántulas sometidas a deshidratación, con el interés de observar el cambio en la acumulación de estas tres moléculas de RNA en deshidratación respecto a control.

En la Tabla 8-1 se resumen los resultados de la acumulación de los 9 mRNAs blanco y los miRNAs que los regulan. En esta tabla se indica la hipótesis a cerca de la acumulación que se espera para cada grupo de mRNAs blanco, y el cambio en la acumulación relativa del mRNA completo y el miRNA en deshidratación. Lo primero que salta a la vista es que la dirección de la acumulación de los mRNAs blanco en deshidratación, es diversa y en la mayoría de los casos no se ajusta a la hipótesis.

También es evidente que la acumulación del mRNA blanco y del miRNA difieren casi siempre entre plántula y raíz de plántula. El mRNA de la SBP y el miR156 son el único par miRNA-mRNA blanco, que se comporta de forma similar entre plántula y raíz de plántula. Esto es interesante, ya que, aunque no se espera que la acumulación de los miRNAs y los mRNAs sean iguales en los diferentes órganos, esto sugiere que la SBP tiene una respuesta homogénea a la deshidratación en plántula y raíz.

Otra observación derivada de esta tabla es el hecho de que solo se observa una relación inversa en la acumulación entre miRNA-mRNA en dos casos, el primero es el mRNA del GRL1 regulado por el miR396, y el segundo es el mRNA del NAC1 regulado por el miR164. Sin embargo, estos casos no coincidieron con las expectativas de acumulación en plántulas derivadas del análisis de los degradomas, es decir, pese a que el mRNA de GRL1 solo se degrada en control, la acumulación del mRNA no degradado no aumenta en deshidratación, y aunque el mRNA del NAC se degrada de forma similar en control y

deshidratación, el mRNA no degradado de NAC disminuye su acumulación en deshidratación.

Tabla 8-1. Resumen de resultados de la acumulación de miRNA-RNA blanco en respuesta a deshidratación

mRNA blanco /miRNA	Análisis de Degrado-mas		Cambio en la acumulación de mRNAs y miRNAs en deshidratación (dirección y porcentaje de cambio en deshidratación respecto a control)					
	C	S	Hipótesis (mRNA)	Plántulas		Raíz de plántulas		
				mRNA	miRNA	mRNA	miRNA	
NAM / miR164	26	0	↑	↑ 31.6	↑ 39.8	↓ 36.1	≡	
GRL1 / miR396	12	0		↓ 55.2	↑ 75.8	≡	↓ 52.1	
ARF / miR160	29	0		≡	↑ 71.4	↓ 37	↓ 52.8	
PTK / miR172	0	11	↓	↓ 64	N/C	≡	N/C	
AP2 / miR172	0	4		≡	N/C	↓ 55	N/C	
TFH / miR166	0	66		≡	↑ 12.4	≡	↓ 33.9	
NAC1 / miR164	2631	2653	≡	↓ 46.3	↑ 39.8	↓ 28.3	≡	
SBP / miR156	25	26		≡	≡	↓ 38.4	≡	↓ 37.1
TIR1 / miR393	213	289		↑ 57.9	N/C	↓ 42.8	N/C	

Nota. El color verde resalta los mRNAs blanco que solo identificó el análisis de degradoma de plantas control, el rojo resalta los mRNAs blanco que solo se identificó el análisis de degradoma de plantas sometidas a deshidratación, y el amarillo resalta los mRNAs blanco que se identificaron en en ambas condiciones. Los valores en la tabla representan porcentaje de cambio en deshidratación, respecto a control. Los simbolos denotan: ↑, aumento en la acumulacion relativa en deshidratación respecto a control; ↓, disminución en la acumulación relativa en deshidratación respecto a control; ≡ no hay cambio en la acumulacion relativa en deshidratación respecto a control.

Los tres mRNAs blanco que solo se degradan en plántulas control mostraron diferente comportamiento entre sí, el de NAM aumenta, el de GRL1 baja y el de ARF no cambia, esto en plántulas sin cotiledones. Dado que el degradoma de plántulas en

deshidratación no identificó a estos mRNAs degradados, se esperaba que los miRNA que los regulan disminuyeran en esta condición, pero paradójicamente, los miRNAs aumentaron en respuesta a deshidratación en lugar de disminuir.

La acumulación entre el mRNA blanco y el miRNA que lo regula, no tienen una correlación inversa en los tres mRNAs blanco que se degradan en plántulas sometidas a deshidratación y no hay un aumento en la acumulación de los miRNAs en respuesta a deshidratación, solo en el caso de miR166 cuantificado en las muestras de plántulas sin cotiledones.

En el caso de los mRNAs que solo se degradan en plántulas sometidas a deshidratación, solo el mRNA de la PTK disminuyó en plántulas sometidas a deshidratación, a pesar de que el miR172 que lo regula, se acumula tan poco que no fue posible cuantificarlo. Pese a la evidencia de degradación de sus mensajeros, no cambió la acumulación del mRNA del AP2 ni la del TFH durante deshidratación, aunque el miR166 que regula al mRNA del THF sí aumentó.

Los mRNAs blanco que se degradan en ambas condiciones se comportan de manera distinta entre sí. Por un lado, el mRNA de NAC1 disminuye y el mRNA de TIR1 aumenta, y por el otro el mRNA de la SBP no cambia. La acumulación de miR164 y miR156 cambia a pesar de que se esperaba que tampoco cambiaran, miR164 aumenta y miR156 baja. El miR393 no se acumula lo suficiente para ser cuantificado.

La disparidad del comportamiento observado en la acumulación de los mRNAs en plántulas respecto a lo esperado a partir de los degradomas de plántulas, indica no se puede predecir la acumulación de los mRNAs blanco a partir de los datos del degradoma, por lo que tampoco se puede predecir el comportamiento de los mRNAs en otro tipo de material biológico analizado como es la raíz.

Este panorama desafía la hipótesis del comportamiento esperado en la acumulación entre los miRNAs y sus mRNAs blanco, y la evidencia de degradación reportada por el degradoma. La acumulación de los mRNAs y miRNAs no se comporta de forma esperada en ninguno de los grupos. Incluso, en ninguno de los tres grupos se identificó un comportamiento homogéneo entre los tres mRNAs blanco evaluados, lo que revela que este es un fenómeno complejo y que hay otros factores que intervienen en la acumulación

de los mRNAs, y por lo tanto es no es posible deducir la acumulación de un mRNA y el miRNA que lo regula a partir de los datos que se obtienen mediante análisis de degradoma.

Los factores de transcripción NAM y NAC1 y miR164

En *A. thaliana*, se ha descrito que el mRNA de algunos miembros de la familia de factores transcripcionales tipo NAM, es blanco de miR164 (Baker et al., 2005). Un factor NAC comúnmente contiene el sitio NAC de unión a DNA, en la región N terminal, y un dominio C terminal variable. El sitio NAC contiene los dominios NAM, ATAF1/2 y CUC2 (Hendelman et al., 2013). Estos factores, están normalmente relacionadas al desarrollo, en varios procesos como la formación de la raíz, la senescencia de las hojas y en los cambios en el desarrollo que ocurren en respuestas a estrés (Hendelman et al., 2013).

En este panorama, este estudio contribuye con la información de la acumulación de NAM y NAC1 y miR164 en respuesta a deshidratación en *P. vulgaris*, donde no se había reportado. MiR164 aumentó en deshidratación en plántula de frijol, esto coincide con lo reportado para *Populus euphratica* Oliv. donde de acuerdo a PASmir, Li y colaboradores (2011) detectaron la acumulación de miR164 mediante el análisis de microarreglos para miRNAs. En *Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv. y *Medicago truncatula*, se ha reportado que la acumulación de miR164 disminuye en respuesta a deshidratación (B Li et al., 2011; Wang et al., 2011).

El factor GRL1 y miR396

El factor GRL1 (Growth regulating like transcription factor) pertenece a una familia de factores de transcripción específicos del reino vegetal que participan en procesos centrales del desarrollo (Omidbakhshfard et al., 2015). Los factores GRF son regulados a nivel de mensajero a través de miR396. El papel de este módulo de regulación se ha descrito principalmente en el desarrollo de la hoja en *A. thaliana* (Debernardi et al., 2014), sin embargo, hasta la fecha no se ha relacionado con la respuesta a estrés. Los GRFs se expresan en el estadio juvenil de la hoja y miR396 aumenta su acumulación conforme la hoja madura (Debernardi et al., 2014; Rodriguez et al., 2010). La ausencia de los factores

GRF o la sobreexpresión de miR396, afectan el tamaño de la hoja, reduciéndolo y, por el contrario, la sobreexpresión de los GRFs aumenta el tamaño de la hoja. Se ha postulado que miR396 participa en la modulación del crecimiento durante a estrés debido a su papel como regulador del desarrollo y que los cambios en el crecimiento son una respuesta común a los diferentes tipos de estrés (Madhava Rao et al., 2006), sin embargo, no hay evidencia experimental todavía.

El factor ARF y miR160

Los factores de transcripción de respuesta a auxina ARF10, ARF16 y ARF17, son regulados por MiR160 en *A. thaliana* (Mallory et al., 2005). Los ARF, constituyen una familia de proteínas de unión a DNA que controlan la transcripción regulada por auxinas. La descripción del papel que llevan a cabo los ARF y miR160 ha trascendido al estudio de *P. vulgaris*. Se ha estudiado el efecto de la sobreexpresión ectópica de miR160 en *Glycine max* (Turner et al., 2013) y se ha concluido que su sobreexpresión genera hipersensibilidad a auxinas y defectos en la nodulación. Esto ilustra la importancia de miR160 en la cadena de regulación de respuesta a hormonas y su participación en procesos biológicos diversos, aunque su participación en respuesta a estrés no ha sido documentada aún.

El factor AP2 y la enzima PTK y miR172

Se sabe que miR172, tiene efecto sobre la floración. En *A. thaliana*, miR172 regula la transición de fase y el patrón floral, a través de la regulación de APETALA2 y los factores AP2-like. Estos factores de transcripción, así como otros mRNAs blanco de miRNAs, son represores de la floración (Jung et al., 2014). La pérdida de esta regulación genera flores indeterminadas. MiR172 actúa como un represor floral y el papel de este miRNA en estrés sugiere el impacto de los factores climáticos en el desarrollo vegetal.

Por otro lado, el mRNA de la enzima PTK, es un blanco nuevo propuesto para miR172. Esta cinasa podría participar en la señalización durante varios procesos mediante la fosforilación de distintas proteínas. Esta modificación es reversible, el paso reverso se cataliza por fosfoproteína fosfatasas (Mulekar y Huq, 2013). La regulación negativa de

miR172 sobre la PTK podría representar un complejo mecanismo involucrando múltiples factores.

El factor de TFH y miR166

El miR166 tiene como blanco a los mRNAs que codifican la clase III de factores de transcripción HD-Zip. De acuerdo con Phytozome.net, Phvul.010G146200 corresponde una proteína que en *A. thaliana* se ha caracterizado como la HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER ATHB-15, que es una de las cinco proteínas de la familia HD-Zip III cuyo mRNA es blanco de miR165 y miR166 (The UniProt Consortium, 2015). Estos factores de transcripción especifican el destino de las células en el meristemo apical y lateral en *A. thaliana*. Los mRNAs de las proteínas PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV) y CLAVATA (CLV) son blancos de miR166 en *A. thaliana*. La falta de este módulo de regulación lleva a importantes defectos en el desarrollo, impactando en la forma de la hoja, generando diversos fenotipos (Jung y Park, 2007).

Los resultados mostraron que no había cambio en la acumulación del mRNA del TFH a pesar de que en plántulas miR166 aumentó significativamente en respuesta a deshidratación, y en raíz bajó, durante esta condición. El degradoma constituye evidencia experimental de la activa degradación del mRNA del TFH por miR166, pero los resultados de la cuantificación de miR166 y el mRNA de TFH no indican que se acumulen de forma esperada. Esto puede deberse a que hay otros mRNAs blanco de miR166. El tipo celular en que este módulo ejerce su función es muy pequeño en tamaño respecto a la planta o incluso la raíz completa, ya que ocurre en los meristemas, de forma que tal vez, la contribución de miR166 a la regulación de la acumulación de TFH puede no detectarse en las muestras analizadas.

La SBP y miR156

miR156 regula a la mayoría de los transcritos que codifican a proteínas de la familia Squamosa Binding Protein (SBP) o SBP like (SPL) en *A. thaliana*. Los SBP son factores de transcripción específicos de plantas que regulan procesos del desarrollo, como la arquitectura de la planta, la transición de fase, la distribución de los tricomas, entre otros aspectos fisiológicos (Silva et al., 2014). De acuerdo con las determinaciones de

abundancia, el transcrito de SBP no cambia su acumulación durante deshidratación ni en raíz de plántula ni en plántula completa. Esto coincide con lo mostrado por el degradoma, sin embargo, la acumulación de miR156 disminuye significativamente en cada caso. La participación de este nodo de regulación está relacionado íntimamente a la capacidad reproductiva de la planta y sugiere que es uno de los vínculos entre el estrés y la capacidad reproductiva de la planta, dado que miR156 responde al estrés hídrico. Ya que hay otros factores SBP cuyo mRNA es blanco de miR156, el efecto de la acumulación del miRNA podría ser visto sobre otros transcritos.

La proteína TIR1 y miR393

TIR1 (Transport Inhibitor Response Protein 1) es uno de los cuatro receptores parcialmente redundantes para las auxinas, y su mRNA es blanco de miR393. TIR1 funciona junto con el receptor Auxin-related F-box (ARF) y auxin/índole-3-acetic acid (AUX/IAA) como correceptores. La unión de estas proteínas a la auxina promueve que se degraden los represores transcripcionales de los factores de transcripción de respuesta a esta hormona (Auxin Response Factors, ARF) transmitiendo la señal (Tomas et al., 2013). Se ha descrito a partir del estudio de TIR1 en *A. thaliana*, que es un regulador positivo del crecimiento y desarrollo. Si TIR1 no se regula apropiadamente por miR393, el fenotipo resultante es la falta de crecimiento apical de la raíz y la formación de mayor número de raíces laterales en *A. thaliana* (Chen et al., 2011).

De acuerdo con los resultados de los degradomas, TIR1 se degrada activamente por miR393, debido a que las bibliotecas identificaron 213 y 289 lecturas de corte (en control y deshidratación, respectivamente). El resultado de la cuantificación del mensajero de TIR1, sugiere que, en plántulas completas, la acumulación de este mRNA aumenta en respuesta a deshidratación, y en raíz, su acumulación disminuye en respuesta a deshidratación. Pese a que se detectó este cambio significativo, miR393 no se pudo detectar en ninguna de las muestras. El degradoma sugiere que TIR1 se degrada continuamente tanto en control como en deshidratación, de forma que, aunque no pudimos detectar a miR393 mediante RT-qPCR, debe estar presente en cantidades que no podemos detectar mediante este método. El papel que se conoce de TIR1 en la regulación del desarrollo, está relacionado íntimamente con el fenómeno de estrés hídrico y esto se ha estudiado no solo en *A.*

thaliana, sino en cultivos como el arroz (Bej y Basak, 2014). De esta forma, la modulación de TIR1 en respuesta a deshidratación coincide con lo esperado, aunque no fue posible cuantificar al miR393.

8.5 El degradoma no refleja la acumulación miRNA-mRNA blanco

De los nueve transcritos analizados en este trabajo, sólo para los mRNAs de NAC1 y de GRL1 se identificó un comportamiento esperado entre la acumulación del miRNA y su mRNA blanco, es decir, que se acumulen de forma inversa. Ya que el resto de los mRNAs blanco no mostraron esta tendencia, esto sugiere que existen otras variables que modulan la acumulación de los miRNAs y/o los mRNAs blanco. Durante la introducción se enfatizó que son muchos los niveles de regulación que determinan la expresión y ejecución de la función de una proteína determinada. De forma que son muchos los pasos regulatorios necesarios para que un mRNA se acumule y estos pasos se pueden modular de forma diferencial. Por lo tanto, la regulación que permiten que un mRNA se acumule, no se restringe a la regulación mediada por miRNAs, existen otros mecanismos, por lo que la acumulación de un miRNA no determina necesariamente que su blanco se degrade por completo.

En este sentido, Addo-Quaye y colaboradores (2008) compararon en plántulas e inflorescencias de *A. thaliana*, la abundancia de mRNAs degradados (análisis de degradoma) y mRNAs completos (transcriptoma). Estos resultados mostraron de forma global que, la abundancia de los mRNAs degradados reflejan la abundancia de su propios mRNAs completos. Es decir que mientras más abundante sea un mRNA más se degrada.

Dado que algunas Familias de genes pueden compartir la secuencia de reconocimiento de un miRNA (elementos de respuesta a miRNAs), también se ha propuesto que cuando un miRNA regula varios mRNAs blanco, la abundancia de uno de estos mRNAs blanco afecta la degradación de los otros, debido a que el número de moléculas de un miRNA es limitado, generando una competencia mediante la cual los mRNAs blanco de un mismo miRNA se regulan entre si (Figliuzzi et al., 2013; Salmena et al., 2011). Esto debe considerarse debido a que los mRNAs analizados son blanco de miRNAs que regulan a otros mRNAs. miR164 que regula al mRNA de NAM y al de NAC1, degrada a otro par de

mRNAs blanco; miR396 que regula al mRNA de GRL1, degrada a otros 11 mRNAs blanco; miR160 que regula al mRNA de ARF regula a otros tres mRNAs; miR172 que regula ala PTK y al AP2 regula a otro par de mRNAs; el miR156 regula a otros siete mRNAs; el miR393 regula a otros dos mRNAs; únicamente el miR166 que regula al TFH, no tiene otros mRNAs blanco con evidencia de degradación identificada por los análisis de degradoma de este estudio (Tabla 7-1). Esto ayuda a explicar por qué la acumulación de los mRNAs y los miRNAs que los regulan no se ajusta a lo esperado.

También cabe considerar que la secuencia blanco de un miRNA puede diferir entre sus mRNAs blanco, generando distinto grado de afinidad por el miRNA, observemos por ejemplo la energía libre entre el miR159 y sus blancos, el MYB101 (34.1 kcal/mol) y el NOZZLE (31.4 kcal/mol) discutido en la sección 8.3. Esto abre un nuevo panorama en el estudio del papel de la regulación mediada por miRNAs.

En plántula, la acumulación del mRNA del TFH no cambia en deshidratación a pesar de que miR166 aumenta y que no hay otros mRNAs blanco de este miRNA identificados en estas muestras por los análisis de degradoma. Este ejemplo permite discutir otro punto de vista a cerca de la regulación de los miRNA sobre sus mRNAs blanco. Este sugiere que el papel de un miRNA no es siempre impedir que un mRNA se acumule, sino que, a través de su regulación, puede mantener estable la acumulación de un mRNA blanco. Es decir, si la transcripción de un mRNA aumenta, el miRNA aumenta también para degradar el mRNA excedente y estabilizar su acumulación. Aunque no tenemos evidencia de un aumento en la transcripción del mRNA del TFH, esta hipótesis explicaría la acumulación del mRNA de TFH y el miR166. La tabla 8-1 muestra que análisis de degradoma identificó que, en deshidratación, el mRNA del TFH se degrada (66 lecturas de corte), sin embargo, la acumulación del mRNA completo no cambia, y el miR166 aumenta un 12.4%. En raíz de plántula por otro lado, el mRNA completo del mRNA del TFH no cambia a pesar de que en este órgano el miR166 disminuye un 33.9%. De forma que, en plántula y raíz de plántula, el miR166 modularía su acumulación en respuesta a deshidratación para mantener estables los niveles del mRNA del TFH en esta condición.

Aunque la acumulación final de un mRNA no se deba principalmente a la regulación mediada por miRNAs, no quiere decir que la degradación que se validó con los datos de degradoma no tenga un papel o función biológica. El papel activo de los miRNAs en un

tejido puede dirigirse a modular en niveles determinados la abundancia de un mensajero o un grupo de mensajeros. Se ha propuesto que la regulación mediada por miRNAs es una regulación fina de respuesta rápida.

La acumulación y actividad de los miRNAs también está sometida a regulación, así como la maquinaria de biogénesis de miRNAs y el complejo RISC mediante el cual ejercen su actividad, lo cual incrementa el nivel de complejidad de esta vía de regulación en respuesta a deshidratación.

Cabe considerar, además, las limitaciones de este estudio. Por una parte, no se realizó el experimento de degradoma con réplicas biológicas. Las réplicas biológicas son necesarias debido a que implican un mayor muestreo. Al escoger los mRNAs blanco con mayor número de lecturas de corte se intentó evitar falsos positivos que estuvieran poco representados, sobre todo si solo se identificaron por uno de los análisis de degradoma. Tampoco la evaluación mediante tiempo real empleó muestras biológicas independientes. Las barras de error de las gráficas corresponden a las réplicas técnicas del RT-qPCR. Sin embargo, estos experimentos apoyan los hallazgos del degradoma, los cuales, aunque son de distinta naturaleza describen el mismo fenómeno. Por otro lado, no fue posible usar el mismo lote de *P. vulgaris* para el análisis de degradoma y la cuantificación de la acumulación de los mRNAs y miRNAs.

La amplificación por qPCR de los mRNAs blanco no es una confirmación de los resultados del degradoma, ya que corrobora la presencia de un mensajero en una muestra, aunque la confirmación de un mensajero como blanco de un miRNA se lleva a cabo a través de experimentos tipo 5' RACE. Los mRNAs blanco de miRNAs analizados, ya se han confirmado en otras plantas como mRNA blanco, a excepción de la PTK (Phvul.002G012700).

En cuanto a las limitaciones de la estrategia experimental, cabe considerar que la cuantificación de los mRNAs y miRNAs no fue absoluta sino una cuantificación relativa y que el número de lecturas de corte de los degradomas se normalizó para poder comparar la secuenciación de plántulas control y deshidratación. Por lo tanto, los datos permiten observar el cambio en deshidratación respecto a control, pero no la cantidad de moléculas

de mRNAs degradados, mRNAs completos, y miRNAs por lo que la comparación entre la acumulación de estas moléculas no es directa. Además de esta consideración, una estrategia interesante que se puede añadir para tener un análisis más robusto sería cuantificar los niveles de los productos de degradación de los miRNAs, por ejemplo, mediante un 5' RACE cuantitativo. De esta forma se podría estimar la actividad de corte en cada condición para poder relacionarla directamente con la abundancia del miRNA y la del mRNA blanco.

En cuanto al papel de los miRNAs en la respuesta a deshidratación de *P. vulgaris*, hay que considerar que tanto el análisis de degradoma como la cuantificación de la acumulación relativa de los pares mRNAs-miRNAs ofrecen la foto de un momento en la respuesta a la deshidratación de *P. vulgaris*, y que esta respuesta es dinámica y que puede diferir entre los órganos y tejidos de la plántula, por lo que es necesario estudiar los casos particulares de miRNAs-mRNAs blanco apoyándose con estudios fisiológicos.

Pese a todas estas limitaciones, este estudio cumplió con el objetivo de identificar los mRNAs blanco de miRNAs en deshidratación, analizar la acumulación de los mRNAs blanco y sus miRNAs durante deshidratación, conocer la relación entre los datos obtenidos por análisis de degradoma y mediante la cuantificación de la acumulación relativa (RT-qPCR), así como conocer los alcances y limitaciones de la estrategia experimental propuesta.

9. Conclusiones

Acerca del degradoma

- 🍌 Se encontraron 65 mRNAs blanco de miRNAs en *P. vulgaris* en dos bibliotecas de degradoma obtenidas de plántulas de condición control y deshidratación. 8 mRNAs solo se degradan durante deshidratación y 17 solo se degradan durante condiciones control.
- 🍌 El 75% de los mRNAs blanco identificados son factores de transcripción. Esto coincide con la literatura donde se refiere a los factores transcripcionales como el tipo de mRNAs blanco más común para los miRNAs. Sin embargo, también se

encontraron mRNAs blanco menos comunes como mRNAs que codifican para enzimas o proteínas sin anotación funcional.

- 👉 Los mRNAs blancos de miRNAs conservados codifican en su mayoría (90%) para factores de transcripción. Menos de la mitad (46%) de los blancos de miRNAs no conservados codifican para factores de transcripción.
- 👉 Se encontraron en *P. vulgaris* tres mRNAs blanco nuevos de miRNAs conservados: el factor de transcripción NOZZLE, la subunidad alfa de la caseína cinasa II, y el Phvul.007G253900 (sin anotación funcional).

A cerca del análisis de la acumulación 9 mRNAs blanco y los miRNAs que los regulan

- 👉 Solo en dos casos la acumulación del mRNA blanco y la del miRNA que lo regula se comportan de forma inversa, estos son NAC1 (miR164) y GRL1 (miR396).
- 👉 El número de lecturas de corte de cada mRNA blanco que identifiqué el degradoma no permite predecir el cambio en la acumulación del mRNA blanco completo en respuesta a deshidratación.

A cerca de la participación de los miRNAs en la deshidratación

- 👉 El análisis de degradoma de plántulas control y el de plántulas sometidas a deshidratación permitió encontrar mRNAs que se degradan solo en estas condiciones o en ambas.
- 👉 Los mRNAs blanco y los miRNAs que los regulan se acumulan de forma distinta en plántula sin cotiledones y raíz de plántula en respuesta a deshidratación.
- 👉 Se identificaron sistemas miRNA-mRNA blanco que pueden estar involucrados en la respuesta a la deshidratación, pero es necesario el estudio puntual de cada caso.

10. Referencias

Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., y Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Current Biology*, 18(10), 758–62.

- Addo-Quaye, C., Miller, W., y Axtell, M. J. (2009). CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets. *Bioinformatics*, 25(1), 130–131.
- Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D. A., Bollin, C., Bolton, E., Bourexis, D., et al. (2016). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D7–D19.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. (A. Marjorie y S. Granum, Eds.) (5a ed.).
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N. R., y Yadav, R. C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 19(3), 307–21.
- Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., et al. (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology*, 70(4), 385–401.
- Arroyo, I. A. (2012). *Caracterización fenotípica de mutantes en genes para proteínas LEA de la familia 6 en respuesta a déficit hídrico en Arabidopsis thaliana*.
- Aukerman, M. J., y Sakai, H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes. *The Plant cell*, 15(November), 2730–2741.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., y Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome biology*, 12(4), 221.
- Baker, C. C., Sieber, P., Wellmer, F., y Meyerowitz, E. M. (2005). The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(4), 303–315.
- Bej, S., y Basak, J. (2014). MicroRNAs: The Potential Biomarkers in Plant Stress Response. *American Journal of Plant Sciences*, 05(05), 748–759.
- Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 846–860.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2007). *Bioquímica* (6ta ed.).
- Binns, D., Dimmer, E., Huntley, R., Barrell, D., O'Donovan, C., y Apweiler, R. (2009). QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics*, 25(22), 3045–3046.
- Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., et al. (2013). Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *The New phytologist*, 197, 300–13.
- Bohnert, H. J. (2007). Abiotic Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2), 48–54.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., y Weretilnik, E. (2000). Response to abiotic stresses. En B. B. Buchanan, W. Gruissem, y R. L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular biology of plants* (pp. 1158–1249).
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., y Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - Model food legumes. *Plant and Soil*, 252(1), 55–128.
- Buxdorf, K., Hendelman, A., Stav, R., Lapidot, M., Ori, N., y Arazi, T. (2010). Identification and characterization of a novel {miR159} target not related to {MYB} in tomato. *Planta*, 232(5), 1009–1022.
- Carrington, J. C. (2003). Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science*, 301(5631), 336–338.
- Chen, Z.-H., Bao, M.-L., Sun, Y.-Z., Yang, Y.-J., Xu, X.-H., Wang, J.-H., Han, N., et al. (2011). Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is

- involved in normal development in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 77(6), 619–629.
- Collins, L. J. (2011). The RNA infrastructure: An Introduction to ncRNA Networks. *Madame Curie Bioscience Database*.
- Comisión Nacional del Agua. (2012). Atlas Digital del Agua México: distribución de la precipitación pluvial anual 1971-2000.
- Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2009). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, cell & environment*, 1–9.
- Debernardi, J. M., Mecchia, M. A., Vercruyssen, L., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Inze, D., Rodriguez, R. E., et al. (2014). Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *The Plant Journal*, 79(3), 413–426.
- Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. (2016). *Frijol. Panorama Agroalimentario*.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Diaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., et al. (2006). Agrobacterium rhizogenes transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(12), 1385–1393.
- Figliuzzi, M., Marinari, E., y De Martino, A. (2013). MicroRNAs as a Selective Channel of Communication between Competing RNAs: a Steady-State Theory. *Biophysical Journal*, 104(5), 1203–1213.
- Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural Forestal y Pesquero. (2014). *Panorama del Frijol*.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., et al. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 38, D211–D222.
- Formey, D., Iñiguez, L. P., Peláez, P., Li, Y. F., Sunkar, R., Sánchez, F., Reyes, J. L., et al. (2015). Genome-wide identification of the Phaseolus vulgaris sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 423.
- Gentry, H. S. (1969). Origin of the Common Bean, Phaseolus vulgaris. *Economic Botany*, 23(1), 55–69.
- Gepts, P. (1990). Biochemical Evidence Bearing on the Domestication of Phaseolus (Fabaceae) Beans. *Economic Botany*, 44(3), 28–38.
- German, M. A., Luo, S., Schroth, G., Meyers, B. C., y Green, P. J. (2009). Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nature Protocols*, 4(3), 356–362.
- González-Estrada, A., Acosta Gallegos, J., Sánchez Valdez, I., Ochoa Márquez, R., Pajarito Ravelero, A., Ibarra Pérez, F. J., Compeán Guzmán, F. J., et al. (2003). *Impacto Económico del Mejoramiento Genético del Frijol en México: Variedad Pinto Villa*. (D. Garza y Rueda, V. Gómez Cuevas, y C. Castellanos Constantino, Eds.) (Primera.).
- González-Sánchez, F. del A., Frías Treviño, G. A., García Salinas, A., y Flores Olivas, A. (2000). Resistencia de Genotipos de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) a Razas de Colletotrichum lindemuthianum. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 87–91.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40, 1178–1186.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., y Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*.
- Hardy, A. (2010). Candidate Stress Response Genes for Developing Commercial Drought Tolerant Crops. *MMG 445 Basic Biotechnology*, 6, 54–58.

- Hendelman, A., Stav, R., Zemach, H., y Arazi, T. (2013). The tomato NAC transcription factor SINAM2 is involved in flower-boundary morphogenesis. *Journal of experimental botany*, 64(18), 5497–507.
- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M. L. P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., y Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(2), 95–104.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.-P., Hanafey, M. K., Tingey, S. V, y Chua, N.-H. (2002). Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of cell science*, 115(Pt 24), 4891–900.
- Hu, Z., Jiang, Q., Ni, Z., Chen, R., Xu, S., y Zhang, H. (2013). Analyses of a Glycine max Degradome Library Identify microRNA Targets and MicroRNAs that Trigger Secondary siRNA Biogenesis. *JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY*, 55(2), 160–176.
- Ingram, J., y Bartels, D. (1996). The Molecular Basis of Dehydration Tolerance In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (2016). Banco de Información INEGI. Recuperado a partir de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/>
- Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J., y Zhu, X. (2012). Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS one*, 7(12), e52734.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., y Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 19–53.
- Jung, J.-H., Lee, S., Yun, J., Lee, M., y Park, C.-M. (2014). The miR172 target TOE3 represses AGAMOUS expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Science*, 215–216, 29–38.
- Jung, J.-H., y Park, C.-M. (2007). MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*. *Planta*, 225(6), 1327–1338.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., y Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research*, 42, D199-205.
- Kibbe, W. a. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W43-6.
- Krüger, J., y Rehmsmeier, M. (2006). RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Research*.
- De la Rosa, C., Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2018). A dicistronic precursor encoding miR398 and the legume-specific miR2119 coregulates CSD1 and ADH1 mRNAs in response to water deficit. *Plant, Cell & Environment*.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., y Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Lee, S. C., y Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, cell & environment*, 35, 53–60.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales* (3a ed.).
- Lewin, B., Krebs, J. E., Kilpatrick, S. T., Goldstein, E. S., y Lewin, B. (2011). *Lewin's genes X*.
- Li, B., Qin, Y., Duan, H., Yin, W., y Xia, X. (2011). Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3765–3779.
- Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., Liu, X., Wang, Y., et al. (2011). Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC PLANT BIOLOGY*, 11.

- Light, M. E. (2013). The Molecular Life of Plants. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 75(2), 103–104.
- Madhava, R. K. V. (2006). Introduction. En K. . Madhava Rao, A. S. Raghavendra, y K. Janardhan Reddy (Eds.), *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*.
- Madhava Rao, K. ., Raghavendra, A. S., y Janardhan Reddy, K. (Eds.). (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*.
- Mallory, W. C. A., Bartel, D. P., y Bartel, B. (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell*, 17(1360–1375).
- Marcos, Ó. (2001). Sequía: definiciones, tipologías y métodos de cuantificación. *Investigaciones Geográficas*, julio-dici(26), 59–80.
- Martin, K. C., y Ephrussi, A. (2009). mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell*, 136(4), 719–730.
- Meyers, B. C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D. P., Baulcombe, D., Bowman, J. L., Cao, X., et al. (2008). Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant cell*, 20(12), 3186–3190.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., y Kazuko, Y.-S. (2012). {AP2/ERF} family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(2), 86–96.
- Mukeshimana, G., Ma, Y., Walworth, A. E., Song, G., y Kelly, J. D. (2012). Factors influencing regeneration and Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnology Reports*.
- Mulekar, J., y Huq, E. (2013). Expanding roles of protein kinase {CK2} in regulating plant growth and development. *Journal of experimental botany*.
- Naqvi, A. R., Sarwat, M., Hasan, S., y Roychodhury, N. (2012). Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs. *Journal of cellular physiology*, 227(9), 3163–8.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., et al. (2014). JGI Genome Portal. *Nucleic Acids Res* 42(1).
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., y Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic acids research*, 27, 29–34.
- Oliver, M. J., Cushman, J. C., y Koster, K. L. (2010). Plant Stress Tolerance. (R. Sunkar, Ed.) *Methods in Molecular Biology*, 639.
- Omidbakhshfard, M. A., Proost, S., Fujikura, U., y Mueller-Roeber, B. (2015). Growth-Regulating Factors (GRFs): A Small Transcription Factor Family with Important Functions in Plant Biology. *Molecular Plant*, 8, 998–1010.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., y Tran, L. S. P. (2013). Sensing the environment: Key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 445–458.
- Overpeck, J. T. (2013). The challenge of hot drought. *Nature*, 503, 350, 351.
- Patakas, A. (2012). Abiotic Stress-Induced Morphological and Anatomical Changes in Plants. En P. Ahmad y M. N. V. Prasad (Eds.), *Abiotic Stress Response in Plants* (pp. 21–39).
- Pelaez, P., Trejo, M. S., Iñiguez, L. P., Estrada-Navarrete, G., Covarrubias, A. A., Reyes, J. L., y Sanche. (2012). Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 13(1), 83–100.
- Picard, K., Lee, R., Hellens, R., y Macknight, R. (2013). Legume Genomics, 1069, 215–226.
- Proctor, M. F. (2014). The Diversification of Bryophytes and Vascular Plants in Evolving Terrestrial Environments. En D. T. Hanson y S. K. Rice (Eds.), *Photosynthesis in Bryophytes and Early Land Plants SE - 4*, Advances in Photosynthesis and Respiration (Vol. 37, pp. 59–77).

- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., y Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*, 15(7), 395–401.
- Redondo-Gómez, S. (2013). Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants. En G. Ranjan Rout y A. Bandhu Das (Eds.), *Molecular Stress Physiology of Plants* (p. 440).
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., y Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development*, 16(13), 1616–26.
- Reyes, J. L., y Chua, N.-H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49(4), 592–606.
- Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D., y Palatnik, J. F. (2010). Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development*, 137(1), 103–112.
- Rogers, K., y Chen, X. (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant cell*, 1–18.
- Romero Perez, P. S. (2015). *Análisis de micrnas específicos de leguminosas de respuesta a déficit hídrico en Medicago truncatula*.
- Rosales Serna, R., Acosta Gallegos, J. A., Muruga Marínez, J. S., Hernández Casillas, J. M., Esquivel Esquivel, G., y Pérez Herrera, P. (2004). Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Ivestigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., y Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146(3), 353–358.
- Sánchez, V. I., Ibarra, P. F. J., Rosales, S. R., Singh, S. P., y Acosta, G. J. A. (2001). Pintillo Saltillo: nueva variedad de frijol para el Altiplano de México. *Agricultura Técnica en México*, 27(1), 73–75.
- Serna, R. R., Vallejo, P. R., Gallegos, J. A. A., y González, F. C. (2000). Rendimeinto de grano y tolerancia a la sequía del frijol común en condiciones de campo. *Agrociencia*, 34(2), 153–165.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquería. (2018). Estacionalidad de la producción: estacionalidad año calendario.
- Shamimuzzaman, M., y Vodkin, L. (2012). Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing. *BMC Genomics*, 13(1), 310–323.
- Silva, G. F. F. e, Silva, E. M., da Silva Azevedo, M., Guivin, M. A. C., Ramiro, D. A., Figueiredo, C. R., Carrer, H., et al. (2014). microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal*, 78(4), 604–618.
- Sosa-Valencia, G., Palomar, M., Covarrubias, A. A., y Reyes, J. L. (2017). The legume miR1514a modulates a NAC transcription factor transcript to trigger phasiRNA formation in response to drought. *Journal of Experimental Botany*.
- Sunkar, R., Li, Y.-F., y Jagadeeswaran, G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 17(4), 196–203.
- Szarzynska, B., Sobkowiak, L., Pant, B. D., Balazadeh, S., Scheible, W. R., Mueller-Roeber, B., Jarmolowski, A., et al. (2009). Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 37(9), 3083–3093.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2002). Fisiología del Estrés. En L. Taiz y E. Zeiger (Eds.), *Fisiología Vegetal* (pp. 1129–1196).
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (5ta ed.).
- Taylor, R., Tarver, J., Hiscock, S., y Donoghue, P. (2014). Evolutionary history of plant {microRNAs}. *Trends in plant science*.

- Tétreault, N., y De Guire, V. (2013). MiRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*.
- The UniProt Consortium. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D204-12.
- Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., et al. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*, 13, 2129–2141.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., y Goodall, G. J. (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 6845–6853.
- Tian, C., Zuo, Z., y Qiu, J.-L. (2015). Identification and Characterization of ABA-Responsive MicroRNAs in Rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(7), 393–402.
- Tromas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier, A.-L., Muller, P., Lechner, E., Genschik, P., et al. (2013). Auxin-Binding Protein 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway. *Nature Communications*, 4.
- Turner, M., Nizampatnam, N. R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S. P., et al. (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant physiology*, 162(4), 2042–55.
- Vieira, A., Talhinhos, P., Loureiro, A., Duplessis, S., Fernandez, D., Silva, M. do C., Paulo, O. S., et al. (2011). Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. *Fungal Biology*, 115(9), 891–901.
- Vlasova, A., Capella-Gutiérrez, S., Rendón-Anaya, M., Hernández-Oñate, M., Minoche, A. E., Erb, I., Câmara, F., 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(1), 32.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., y Zhang, W.-H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC genomics*, 12, 367.
- Wightman, B., Ha, I., y Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862.
- Yokota, A., Takahara, K., y Akashi, K. (2006). Water stress. En K. . Madhava Rao, A. S. Raghavendra, y K. Janardhan Reddy (Eds.), *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*.
- Zhang, K., Shi, X., Zhao, X., Ding, D., Tang, J., y Niu, J. (2015). Investigation of miR396 and growth-regulating factor regulatory network in maize grain filling. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 28.
- Zhang, S., Yue, Y., Sheng, L., Wu, Y., Fan, G., Li, A., Hu, X., et al. (2013). PASmiR: a literature-curated database for miRNA molecular regulation in plant response to abiotic stress. *BMC PLANT BIOLOGY*, 13.
- Zhang, Z., Yu, J., Li, D., Zhang, Z., Liu, F., Zhou, X., Wang, T., et al. (2010). PMRD: plant microRNA database. *Nucleic Acids Research*, 38(Database), D806–D813.
- Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y.-T., Duan, L., et al. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like 1. *Nature Structural & Molecular Biology*.