



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación de transcritos regulados por miRNov270 y
miRNov223 en el modelo *Phaseolus vulgaris* asociado
con *Rhizobium etli***

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JAVIER RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. DAMIEN FORMEY DE SAINT LOUVENT

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2021

AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM claves IA203218.

Con extenso aprecio, admiración y respeto a mi asesor el Dr. Damien Formey, por darme la oportunidad y confianza de formar parte de su grupo de investigación en el Programa de Genómica Funcional de Eucariontes, además de su paciencia, dedicación, consejos y apoyo constante desde el primer día que ingrese al laboratorio hasta la actualidad.

A los miembros del comité sinodal: el Dr. Ramón Suarez Rodríguez, Dra. María del Rayo Sánchez Carbente, Dr. Damien Formey, Dr. José Augusto Ramírez Trujillo y al Dr. Alexandre Tromas, por su disposición durante el desarrollo del proyecto y sus valiosas aportaciones.

A los Drs. Alexandre Tromas y Mario Serrano por el apoyo material y equipamiento prestados, pero principalmente por sus valiosos consejos y aportaciones al proyecto.

Agradecimiento especial al Dr. Israel Maruri por su apoyo en la técnica de agroinfiltración de biosensores en *Nicotiana benthamiana*.

A todo el personal técnico del laboratorio, por brindar siempre los insumos necesarios para el trabajo diario y por su valioso apoyo en algunos experimentos.

Al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM (CCG) y todas las personas que hacen posible su funcionamiento en todos los ámbitos.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas UAEM por sus enseñanzas.

DEDICATORIAS

Este logro va dedicado a mis padres, Javier Rodríguez García y Nancy Hernández Hernández, por su esfuerzo, confianza y apoyo brindado durante mi formación; a mi madre María del Carmen Rodríguez García, que siempre me cuido, acogió, apoyo y acompaño en cada momento como a un hijo propio, a mi padre el Dr. Gerardo Raúl Rodríguez García, por apoyarme, aconsejarme e instruirme para ser alguien en la vida. Gracias por ser mi fuente de inspiración para seguir adelante y seguir superándome cada día un poco más, espero algún día poderles devolver tanto.

A mi novia Dania Stephanie Brito Beltrán, por estar en los mejores momentos y en cada adversidad, por hasta la fecha hacerme tan feliz con solo brindarme su compañía, por ser tan paciente y levantarme cada que quería rendirme e inspirarme a mejorar día con día, por todos los desvelos y angustias compartidas. Gracias por estar siempre en los momentos más importantes de mi vida, sin ti hubiese sido un camino más difícil. Nos esperan muchos más logros.

A mis hermanos, Aiko Michelle Zarate Rodríguez y Jael Eduardo Zarate Rodríguez, por todas las risas y buenos momentos compartidos a lo largo de este camino, gracias por hacer más amena la vida.

A mis tías, Verónica Colín García y Rebeca Martínez, por su cariño, apoyo y abrirme las puertas de su hogar acogiéndome en el haciéndome parte de su familia.

A mis hermanas Yotzy y Alix Rodríguez Hernández, por su apoyo a la distancia y risas compartidas.

A mis fieles compañeros cuadrúpedos, Galleta, Pelusa, Bam bam, Copper y Oddi, por su leal compañía en cada noche de desvelo, ansiedad y estrés. No saben la gran alegría que traen a mi vida.

Y por último pero no menos importante, a mis hermanos que la vida me dio, Fernando Aranda Lozano y José Daniel Angeles Salazar, por todos los consejos, risas, excelentes momentos y desvelos compartidos en toda la carrera, esto no

hubiera sido lo mismo sin ustedes. Además del resto de mis amigos de la Facultad, Alberto, Clara, Crisset y Roxana, gracias por todas las grandes experiencias compartidas.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Importancia de las leguminosas	10
2.2. <i>Phaseolus vulgaris</i> y su importancia	10
2.3. Uso de fertilizantes nitrogenados y su impacto ambiental.....	11
2.4. Simbiosis Rizobios-Planta	12
2.4.1. Dialogo molecular entre leguminosas y rizobios	13
2.4.2. Organogénesis del nódulo en <i>Phaseolus vulgaris</i>	13
2.4.3. Fijación biológica del nitrógeno	14
2.5. Señalización genética de la simbiosis.....	15
2.5. ARN pequeños no codificantes en plantas.....	17
2.6. microARNs en plantas	18
2.7. Papel de los microARNs durante la simbiosis	21
2.8. mirNov223 y mirNov270	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES	25
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1. Estrategia experimental general	26
7.2. Predicción de blancos.....	27
7.3. Diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR	27
7.4. Material Biológico	29

7.5.	Extracción de ARN total.....	29
7.6.	Validación de blancos por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)	29
7.7.	Validación de blancos por RACE.....	31
7.7.1.	5'RACE	32
7.8.	Validación de blancos mediante el uso de biosensores.....	33
7.8.1.	Agroinfiltración.....	34
7.8.2	Visualización en el microscopio confocal.....	36
8.	RESULTADOS	36
8.1.	Predicción de blancos.....	36
8.2.	Extracción de ARN	38
8.3.	Nivel de acumulación diferencial de los microARNs (miRNov223 y miRNov270) y sus blancos en raíces no inoculadas, raíces inoculadas y nódulos.....	40
8.3.1.	Validación de muestras	40
8.3.2.	Acumulación diferencial del miRNov223 y sus posibles blancos	41
8.3.3	Acumulación diferencial del miRNov270 y sus posibles blancos.....	45
8.4	5'RACE	49
8.5.	Agroinfiltración.....	51
9.	Discusión	54
9.1.	miRNov270.....	54
9.2.	miRNov223	57
10.	Conclusión	58
11.	Perspectivas	59
12.	Anexos.....	59
10.1.	Anexo 1.....	59
10.2.	Anexo 2.....	61
10.3.	Anexo 3.....	63
10.4.	Anexo 4.....	64
11.	REFERENCIAS.....	66

RESUMEN

P. vulgaris lleva a cabo una simbiosis con la bacteria *Rhizobium*, la cual le ayuda a fijar el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera. Así mismo la bacteria será recompensada por la planta al proporcionarle de los nutrientes que necesita, dando como resultado la creación de un órgano específico llamado nódulo. El proceso de nodulación se lleva a cabo en parte gracias a la regulación génica. Aunque aún no se conocen todas estas regulaciones, se sabe que varias se realizan por microARN. Estas moléculas son pequeñas secuencias de ARN endógenas que no codifican para proteínas y que actúan como moléculas reguladoras de la transcripción génica mediante la degradación de ARN mensajero o la inhibición de la traducción de la síntesis de proteínas.

Derivado de un estudio en el cual, se realizó la producción y el análisis de redes de regulación basados en la expresión de estos microARN en varios tejidos y, principalmente, en nódulos, permitió la selección de candidatos probablemente involucrados en la regulación de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Dos de los candidatos prometedores son, el miRNov270 y miRNov223, esto basado en su perfil de expresión, sus blancos predichos y su biogénesis. Por ello en el siguiente trabajo se propuso el identificar posibles transcritos que estén siendo regulados por los microARNs anteriormente mencionados en el modelo *P. vulgaris* en simbiosis con *R. etli*.

Al realizar la predicción de posibles blancos para el miRNov223 y miRNov270 con el programa psRNATarget se seleccionaron 4 posibles blancos respectivamente. Al evaluar el nivel de acumulación relativa de estos posibles blancos mediante RT-qPCR, seleccionamos 3 de los 4 blancos predichos por el programa para el miRNov223 y en el caso del miRNov270 elegimos 2 de los 4 blancos predichos. Al evaluar mediante la técnica de 5'RACE cada posible blanco seleccionado, no logramos validar ningún blanco seleccionado para cada microARN, ya que, al realizar las amplificaciones no obtuvimos el producto de PCR esperado. Sin embargo, logramos implementar en el laboratorio correctamente un nuevo protocolo para la técnica de 5'RACE al mostrar resultados positivos con nuestro control AP2. Por otra parte, logramos validar un blanco para el

miRNov270, el cual codifica para una proteína NB-LRR, mediante la técnica de biosensores. Por último, en este trabajo, se tienen nuevos potenciales candidatos a blancos para analizar de cada microARN, lo cual podría contribuir al descubrimiento de nuevos genes involucrados en la nodulación.

1. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son un grupo de plantas angiospermas clasificadas como dicotiledóneas y agrupadas taxonómicamente en la familia Fabaceae. Así mismo, estas son agronómicamente importantes para el consumo humano y de forraje para animales. Un ejemplo es *Phaseolus vulgaris* la cual, es una de las leguminosas más producidas y consumidas en el mundo debido a que es una fuente rica en proteínas (Graham & Vance, 2014).

Debido al aumento demográfico en los últimos años, la producción de alimentos de origen vegetal también ha incrementado. Lo cual, ha propiciado el aumento en el uso de fertilizantes nitrogenados para mejorar el crecimiento de los cultivos. Por consiguiente, el uso excesivo de estos compuestos ha derivado un problema ambiental bastante grave, Ya que la alta concentración de nitratos en el suelo ocasiona la lixiviación de estos compuestos y por lo tanto se introducen hasta mantos acuíferos subterráneos. Así mismo, esto causa la contaminación de ríos que después desembocan en los océanos. Ocasionando, que haya una acumulación de nitrógeno en hábitats acuáticos provocando un fenómeno biológico llamado eutrofización. Dicho fenómeno resulta en la proliferación de ciertas algas, las cuales cubren la superficie del agua, limitando el paso de la luz solar para otros organismos fotosintéticos. De esta manera se impide el desarrollo de los demás seres vivos presentes en el cuerpo de agua (flora y fauna), disminuyendo así, la diversidad de especies (Martínez *et al.*, 2011; Varona *et al.*, 2014).

Una alternativa ante esta problemática es el mejoramiento de las especies vegetales cultivadas mediante el uso de la biotecnología. En particular, las

leguminosas son un modelo prometedor debido a su capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno. Gracias a que recientemente se tienen las secuencias que conforman el genoma del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Schmutz *et al.*, 2014) se ha podido estudiar genética y genómicamente a esta planta que se convirtió en un buen modelo para el estudio de la simbiosis entre las leguminosas y rizobios, proceso que les permite realizar la fijación biológica del nitrógeno.

En este proyecto, nos enfocamos principalmente a estudiar la regulación de este proceso por los ARN pequeños (secuencias reguladoras de la expresión de los genes). Mediante técnicas bioinformáticas se obtuvieron nuevos microARN (una categoría de los ARN pequeños) en *P. vulgaris*, de los cuales miRNov 270 y miRNov223 son posibles candidatos involucrados en la regulación de la simbiosis. (Formey *et al.*, 2015).

Por esta razón, este proyecto tuvo la finalidad de identificar los blancos que son regulados por estos microARNs para posteriormente caracterizar las funciones de estos transcritos. Para lograr dicho objetivo, se utilizaron 3 diferentes técnicas. Primero, se realizó una lista de posibles blancos para cada microARN mediante el uso del programa bioinformático psRNATarget. Posteriormente, se analizó mediante RT-qPCR el patrón de expresión de cada microARN en relación a sus blancos. De esa forma se realizó un escrutinio con los candidatos más probables según su perfil de expresión, para después, validar por probabilidad mediante la técnica de RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc por sus siglas en inglés) que estos candidatos sean blancos genuinos de sus respectivos microARNs. En el caso de no lograr la validación de los blancos por RACE se recurrió al uso de biosensores para lograrlo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia de las leguminosas

Las leguminosas son un grupo de plantas angiospermas clasificadas como dicotiledóneas y agrupadas taxonómicamente en la familia Fabaceae. Así mismo, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, y constituyen aproximadamente 630 géneros y 18,000 especies. Estas son importantes en diferentes sectores y algunos de ellos son en el ámbito ecológico y agronómico. Uno de los motivos por los que son agronómicamente importantes es que muchas son la base alimentaria de distintas poblaciones humanas. Su fruto en legumbre es consumido a diario por la mayoría de la población, aunado al hecho de que son usadas para la producción de diferentes alimentos. Este fenómeno ocurre sobre todo por la contaminación de los ríos (igual por lixiviación). (Graham & Vance, 2014).

Dentro de las leguminosas más cultivadas para la producción de alimento se encuentran *Arachis hypogaea* (cacahuete), *Cicer arietinum* (garbanzo), *Glycine max* (soja), *Lens culinaris* (lentejas), *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Vicia faba* (habas), entre otras. Las leguminosas, con pocas excepciones, también tienen la ventaja de no requerir de fuentes nitrogenadas. Esta característica se debe a que algunas leguminosas han logrado adaptarse a suelos en condiciones limitantes de nitrógeno, gracias a su capacidad para asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo (Graham & Vance, 2014).

2.2. *Phaseolus vulgaris* y su importancia

Phaseolus vulgaris (mejor conocido como “frijol común”), pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Fabales, familia Fabaceae. Así mismo, este es uno de los principales representantes de esta familia de plantas, debido a que es una de las leguminosas con mayor índice de consumo, pues son la principal fuente de proteína de más del 60% de la población del mundo (FIRA, 2014).

Por otra parte, *P. vulgaris* es una de las leguminosas que son capaces de fijar nitrógeno gracias al establecimiento de una simbiosis con bacterias llamadas

“rizobios”. El frijol común, se ha convertido en el modelo biológico ideal para estudiar este proceso, debido a diferentes motivos, como el hecho de que se trata de un organismo diploide por lo que es más sencillo estudiar su genoma en comparación con otras leguminosas (e.g. la soya es tetraploide). Aunado a esto, también está el hecho de que actualmente existe mucha información genética sobre este organismo. Por ejemplo, se conoce todo su genoma, su perfil transcriptómico y metabólico durante la simbiosis (Rourke *et al.*, 2014). Así mismo, gracias a esta información, también ha sido posible conocer y caracterizar su sARNoma (Formey *et al.*, 2015; Schmutz *et al.*, 2014). También, es posible transformar su sistema radical, lo cual facilita el estudiar el proceso de nodulación. Son por estas razones, que *P. vulgaris* es un buen modelo para caracterizar diferentes procesos moleculares referentes a la simbiosis con rizobios.

2.3. Uso de fertilizantes nitrogenados y su impacto ambiental

Tanto para las plantas como para cualquier otro ser vivo, el nitrógeno es un elemento indispensable, ya que este forma parte de moléculas como los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Sin embargo, la disponibilidad de nitrógeno en una forma asequible para las plantas es limitada, pues a pesar de que la atmosfera está compuesta de un 78.1% de nitrógeno gaseoso, las plantas son incapaces de asimilar el nitrógeno en esta forma. Es debido a esto, que el nitrógeno es uno de los principales nutrientes que limitan la producción agrícola, por lo cual, se ha recurrido a la utilización de fertilizantes químicos industriales con nitrógeno para aportar las cantidades necesarias para las plantas y, así, mejorar el rendimiento de los cultivos (Ferguson *et al.*, 2010).

Sin embargo, esto ha provocado el uso excesivo de estos fertilizantes, lo que ha generado un fuerte impacto en el ambiente pues ha generado distintos efectos dañinos para este (Martínez *et al.*, 2011). Uno de los efectos más evidentes es la erosión de los diferentes suelos que lleva a su infertilidad y la desertificación, debido a que las altas concentraciones de nitrógeno alteran las condiciones biogeoquímicas. Además, está el hecho de que estos fertilizantes nitrogenados propician la emisión de gases de efecto invernadero, como el óxido nitroso (N₂O) (Martínez *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, existe un problema ambiental aún más grave, ya que, la alta concentración de nitratos en el suelo ocasiona la lixiviación de estos hasta mantos acuíferos subterráneos y/o la contaminación de ríos que desembocan en los océanos. Así mismo, la acumulación elevada de nitrógeno en hábitats acuáticos provoca otro fenómeno biológico llamado eutrofización. Dicho fenómeno resulta en la proliferación de ciertas algas, las cuales cubren la superficie del agua, limitando el paso de la luz solar para otros organismos fotosintéticos, lo que impide el desarrollo de otros seres vivos presentes en el cuerpo de agua (flora y fauna), disminuyendo así, la diversidad de especies (Martínez *et al.*, 2011; Varona *et al.*, 2014).

2.4. Simbiosis Rizobios-Planta

Muchas especies de plantas tienden a formar asociaciones con una amplia gama de microorganismos y en algunos casos, estas pueden resultar en interacciones beneficiosas o no para ambas partes; a las cuales se les ha denominado en general como simbiosis. Una característica común de esas asociaciones simbióticas mutualistas es la habilidad que presentan los microorganismos para capturar nutrientes del ambiente que la planta no puede obtener tan fácilmente y, por lo tanto, suelen limitar el crecimiento de la planta. Los microorganismos intercambian estos nutrientes con la planta por fuentes de carbono que deriven de su fotosíntesis (Oldroyd, 2013; Simon *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2015).

Una de las interacciones simbióticas más estudiadas en la actualidad es aquella dada entre leguminosas y bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno como los rizobios. Este mutualismo propicia la formación de un nuevo órgano en la planta llamado "nódulo". En esta nueva estructura los microsimbiontes convierten el nitrógeno atmosférico en amonio, pues al convertirlo en esta forma biológica, las plantas pueden asimilarlo directamente. Este proceso, que se conoce como nodulación se lleva a cabo en 3 fases principales. La primera, sería la comunicación entre la planta y el rizobio, la segunda es la organogénesis del nódulo y por último la fijación biológica del nitrógeno, (D. Wang *et al.*, 2012). Se

conoce que cada paso puede regularse microRNAs (Simon *et al.*, 2009), moléculas que serán descritas más adelante.

2.4.1. Diálogo molecular entre leguminosas y rizobios

La simbiosis entre las leguminosas y rizobios inicia cuando, en respuesta a una falta de nitrógeno en el suelo, la planta exuda de sus raíces unos compuestos llamados flavonoides. Estas moléculas son detectadas por la bacteria lo cual propicia que esta active la expresión de sus genes nod (necesarios para el proceso de nodulación). Este evento conlleva a la producción y secreción de lipito-oligosacáridos por parte de la bacteria; estos elementos son conocidos también como factores nod (FN, Los FN son reconocidos por receptores tipo cinasa, los cuales están localizados en la membrana plasmática de los pelos radicales de la planta (Liang *et al.*, 2014; Venkateshwaran *et al.*, 2013). Este diálogo molecular permite la identificación correcta entre ambos individuos, para después propiciar la formación del nódulo (véase figura 1).

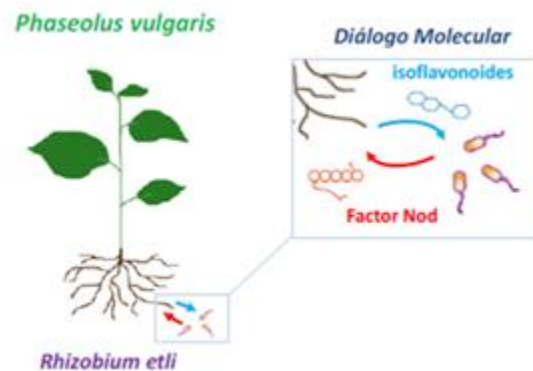


Figura 1. Diálogo molecular entre planta y bacteria para la fijación biológica del nitrógeno (Figura tomada de Castaigants, 2018).

2.4.2. Organogénesis del nódulo en *Phaseolus vulgaris*

Una vez establecida la comunicación molecular entre los simbioses (véase figura 2A), los pelos radicales empezaran a encorvase para envolver cierta cantidad de bacterias y permitirles a estas entrar a la raíz (véase figura 2B). Por lo tanto, la infección comienza en la punta de los pelos radicales emergentes, esto debido a que sus paredes celulares son más delgadas y menos reticuladas. Lo cual, permite un reordenamiento del citoesqueleto, que a su vez, propiciara la

generación de un túnel que inicie en las células epidérmicas y termina en las células corticales de la raíz. A este “túnel” se le conoce como hilo de infección, por el cual viajara la bacteria y al mismo tiempo se ira dividiendo continuamente (Clúa *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2010; vease figura 2C). Según Wang y colaboradores (2012), mientras la bacteria va penetrando la raíz, las células hospederas readquieren la propiedad de totipotencialidad, lo cual, después de la diferenciación, da origen a una nueva población de células que formaran un nuevo órgano llamado nódulo (véase figura 2D). Cuando las bacterias llegan a las células del nódulo, son internalizadas a un proceso parecido a una endosimbiosis, debido a que, cada bacteria estará rodeada por una membrana, dentro de la cual se diferenciaran en orgánelos llamados simbiosomas. Los que realizarán la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (Clúa *et al.*, 2018).

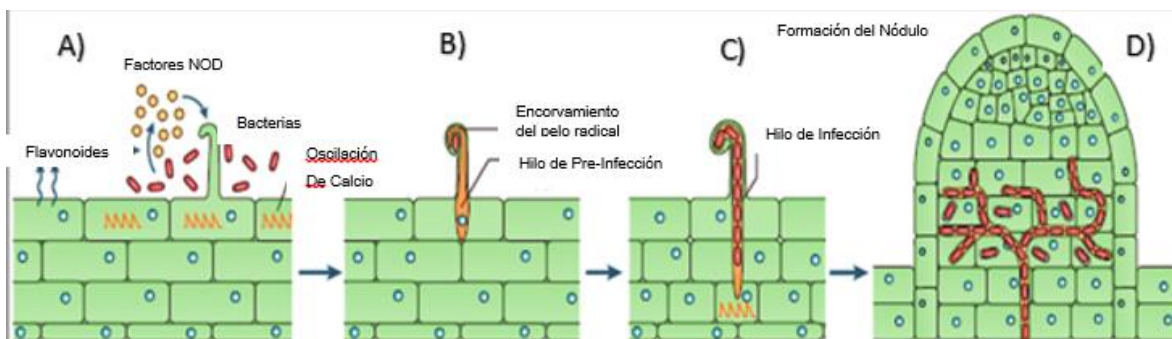


Figura 2. Esquema ilustrativo que muestra el proceso de nodulación desde el reconocimiento molecular entre ambos organismos hasta la formación del nódulo. (Figura recuperada de Oldroyd, 2013).

2.4.3. Fijación biológica del nitrógeno

Como mencionamos anteriormente, los simbiosomas que conforman este nuevo órgano son los que se encargan de realizar la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2). Dicho proceso consiste en reducir el N_2 en amonio, lo cual realiza la bacteria con ayuda de una enzima llamada nitrogenasa. La enzima cataliza esta reacción en 3 pasos. Primero la nitrogenasa se une a una molécula de N_2 , posteriormente por medio de un agente reductor presente en ella (por ejemplo, una ferredoxina) le transfiere sucesivamente 3 pares de átomos de hidrogeno al N_2 . De esta manera cada átomo de nitrógeno se queda con 3 átomos de hidrogeno, siendo así nuestro producto final 2 moléculas de amonio (Ferguson *et al.*, 2010; véase figura 3).

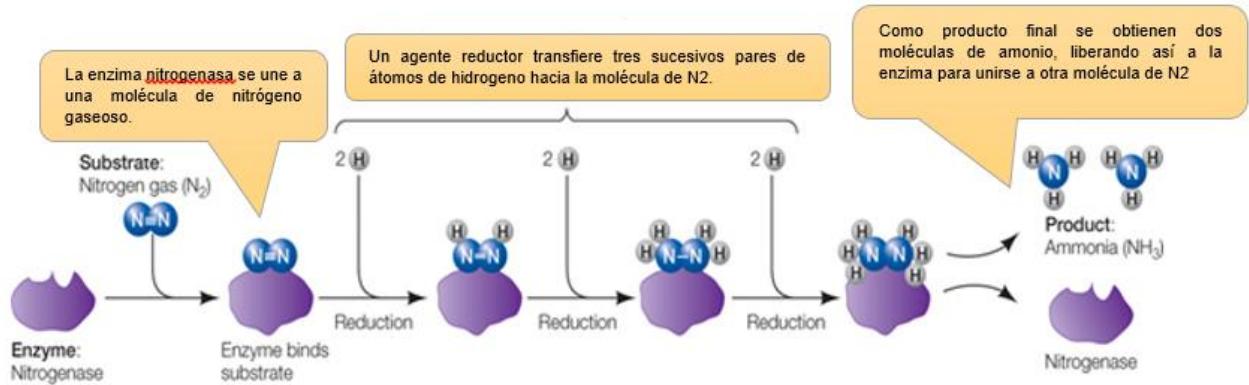


Figura 3. Esquema descriptivo de la reducción de N_2 a NH_3 catalizada por la enzima nitrogenasa (Figura recuperada de Hillis *et al*, 2014).

Así mismo el amonio obtenido de la reacción anterior por la planta, será convertido a glutamina (Gln), por medio de una enzima llamada glutamina sintasa. Consecuentemente se realizará la síntesis de asparagina (Asn) en el citoplasma de la célula infectada, para finalmente ser transportado a células no infectadas hasta el xilema. De esta manera, productos como Gln, Asn y otros aminoácidos ya pueden ser utilizados como nutrientes para el crecimiento y desarrollo de la planta (Vease figura 4). A cambio de proporcionarle a la planta estos nutrientes, las bacterias obtienen productos derivados de la fotosíntesis como los carbohidratos, los cuales serán principales fuentes de carbono y energía para las bacterias presentes en el nódulo (Tegeder, 2014).

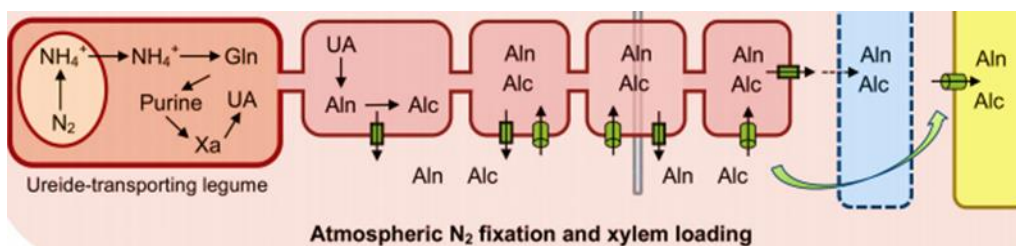


Figura 4. Ejemplo de algunas reacciones químicas realizadas en el nódulo para transformar el N_2 en nutrientes funcionales para la planta (Figura recuperada y modificada de Tegeder, 2014).

2.5. Señalización genética de la simbiosis

Hoy en día, se sabe que la simbiosis entre leguminosas y rizobios está regulada por diversos genes que codifican para varias proteínas. Inclusive, gracias

a varios estudios realizados, se conocen a la mayoría de estos genes aunado a su respectiva función en este proceso. Esta regulación está dada principalmente durante el reconocimiento entre estos dos organismos. El proceso sucede de la siguiente manera: los factores nod son reconocidos por receptores presentes en la membrana plasmática. Al reconocerlos, estos receptores (estos son proteínas transmembranales codificadas por genes llamados NFPs), generan una cascada de señalización, que originara la producción de un segundo mensajero (el cual aún se desconoce). Este segundo mensajero se encarga de llevar la señal a la membrana nuclear y provoca la despolarización de la membrana nuclear mediante la apertura de los canales iónicos presentes en esta membrana. Este evento, propicia una oscilación de calcio dentro del núcleo, la cual a su vez, es decodificada por una cinasa dependiente de calcio (esta codificada por el gen DM13), que posteriormente, se une a diversos factores de transcripción que se encargan de dar inicio a la expresión de los genes encargados de la nodulación (Venkateshwaran *et al.*, 2013; vease figura 5).

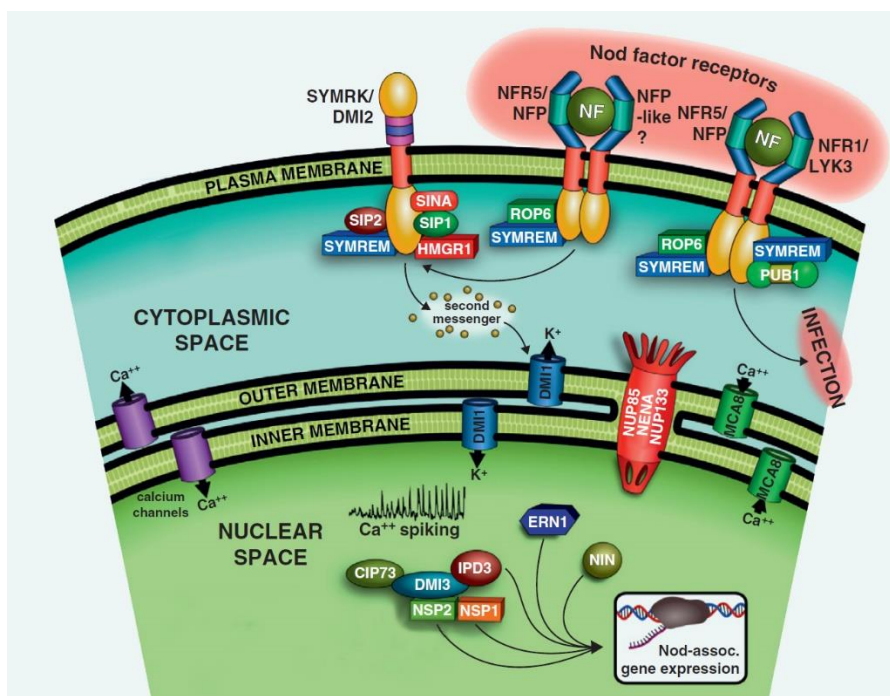


Figura 5. Representación gráfica de la cascada de señalización genética de la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Imagen tomada de Venkateshwaran *et al.*, 2013).

2.5. ARN pequeños no codificantes en plantas

Actualmente sabemos que los ARN pequeños no codificantes (sRNAs por sus siglas en inglés) son clave en la regulación génica de diversos procesos biológicos de las plantas, tales como, la reproducción, el desarrollo y la reprogramación génica de esta misma. Además, se propone que debido a la gran variedad de vías de regulación realizadas por los sRNAs, estos contribuyan a la plasticidad fenotípica de las plantas. En la actualidad se han clasificado a los sRNAs en varias clases importantes; los hp-siARNs (ARN pequeños de interferencia derivados de una horquilla), natsiARNs (ARN pequeños antisentido naturales de interferencia), hetsiARNs (ARN pequeños heterocromáticos de interferencia) y por último pero no menos importantes, los microARNs (Borges *et al.*, 2015).

En general, los sRNAs en plantas, son secuencias producidas por la actividad de proteínas DICER (DCLs) con una longitud promedio de entre 21 y 24 nucleótidos. Siendo más específicos, para que DICER pueda procesar estos transcritos, primero debe haber un ARN de doble cadena (dcARN). Este puede ser sintetizado por una ARN polimerasa dependiente de ARN, tomando como templado un ARN de cadena sencilla o pueden producirse por un solapamiento de transcritos sentido y antisentido. Cualquiera que sea la vía de producción del dcARN, una vez formado, DICER realizará la función antes mencionada gracias a su actividad de ARN endonucleasa. Posteriormente, estos fragmentos de dcARN serán cargados en alguna proteína Argonauta (AGO) la cual identificará la cadena reguladora y la guiará hacia su ARN blanco codificante, para que se una a este por complementariedad de secuencia. Dependiendo de la naturaleza del transcrito blanco y del tipo de proteína AGO involucrada, se procederá a la degradación del ARN diana o simplemente reprimirá la traducción del transcrito por impedimento translocacional del ribosoma (Borges *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2009).

Según Borges y colaboradores (2015), recientemente es un tanto aceptada la teoría de que estos mecanismos probablemente surgieron y evolucionaron primero como un método de defensa celular contra ARN virales y elementos transponibles, siendo posteriormente adaptados para regular la expresión de

genes endógenos. Así mismo, Borges y colaboradores (2015) justifican que dicha suposición podría ser correcta debido a que, concuerda con el hecho de que a varias clases de sRNAs, se les ha datado un rol en respuestas de defensas.

2.6. microARNs en plantas

Hoy en día, es bien conocido que los microARNs son los principales transcritos no codificantes que regulan de manera negativa la expresión de genes endógenos. Por esto se les considera reguladores post-transcripcionales. Estas moléculas son transcritos no codificantes de cadena simple con una longitud promedio que va de 20 a 23 nucleótidos (Baulcombe, 2004; Rogers & Chen, 2013).

En plantas, la biogénesis de los microARNs tiene lugar en el núcleo y comienza a partir de la expresión de los genes MIR. Estos genes, suelen ser unidades transcripcionales independientes y están principalmente localizados en regiones intergenicas del genoma. Seguido a lo antes mencionado, la ARN polimerasa tipo II, producirá un microARN primario (pri-microARN), el cual, es un transcrito inicial con una estructura de tallo-asa que contiene la secuencia del microARN maduro (véase figura 6A). Este pri-microARN será reconocido por un complejo enzimático conformado por, DCL1 (Dicer Like 1), DDL (DAWDLY), SER y HYL y puede ser cortado por DCL1 tanto en la región del tallo o bien en la del bucle, produciendo así un precursor de microARN (pre-microARN, véase figura 6B). Por lo tanto, según en qué región corte DCL1, el pre-microARN podrá tener una conformación de tallo-bucle más pequeña o un tallo grande. Posteriormente, este pre-microARN es cortado nuevamente por DCL1, produciendo una secuencia madura de 20 a 23 nucleótidos de doble cadena. Este dúplex será metilado antes de ser exportado al citoplasma por una exportina llamada HASTY (véase figura 6C). Una vez en el citoplasma, una proteína AGO identificará y seleccionará a una de las dos cadenas, por lo que una de ellas será posiblemente degradada. Es importante mencionar, que la unión de la proteína AGO con su secuencia de microARN es conocido como, complejo de silenciamiento inducido por ARN o RISC (del inglés RNA Induced Silencing Complex). AGO será la encargada de guiar al microARN con su ARNm blanco, al cual se unirá por complementariedad

de secuencia. Dependiendo del nivel de complementariedad que este tenga con su blanco, el microARN regulará su traducción de dos formas, degradando el transcrito o impidiendo el paso del ribosoma (Rogers & Chen, 2013; Yu, *et al.*, 2017).

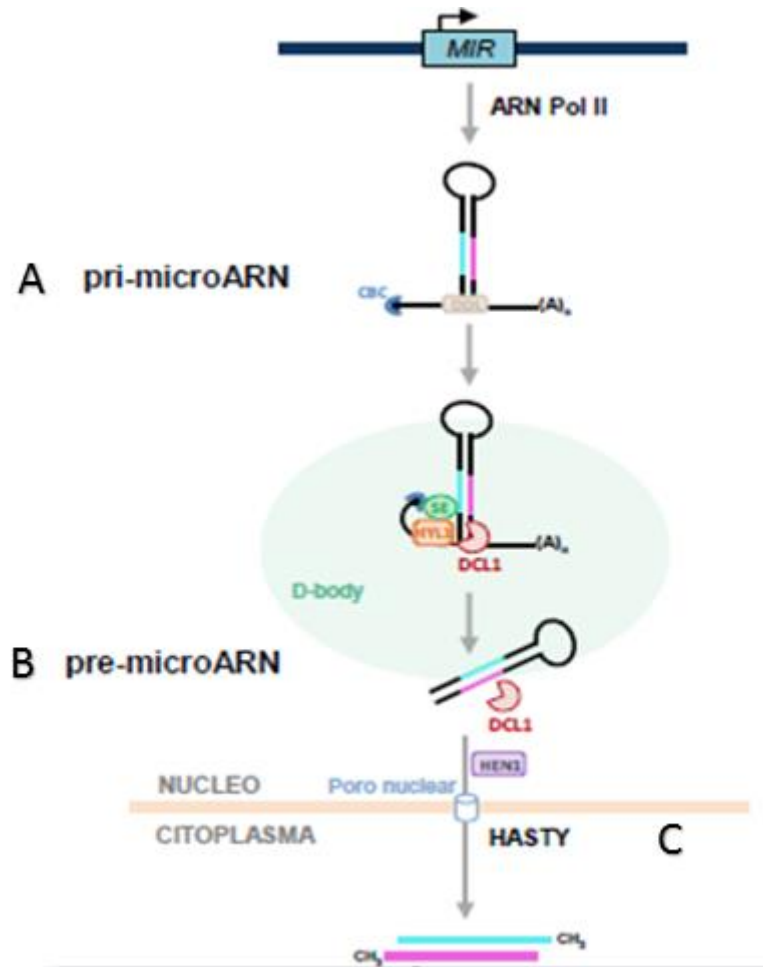


Figura 6. Esquema ilustrativo de la biogénesis de los microARNs en plantas (Figura recuperada de Castaigants, 2018).

En plantas, es mayormente común que el microARN regule a su ARNm blanco por degradación. Para realizar esta acción, el microARN se unirá, preferencialmente a la región 3' UTR de su ARNm blanco o bien en el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés) o en la región UTR 5' del mismo. Si esta unión es altamente complementaria entre secuencias, se inducirá un corte en la parte central del sitio de unión entre el microARN y su transcrito blanco. Dicho sitio de corte generalmente suele encontrarse entre las posiciones 10 y 11 a partir

del extremo 5' del microARN. El corte se llevará a cabo por el dominio PIWI presente en las proteínas AGO, el cual forma un plegamiento parecido a RNAsa-H y cuenta con actividad endonucleasa (véase figura 7). Posteriormente, los fragmentos residuales 5' y 3' son subsecuentemente degradados mecánicamente por exonucleasas en el citoplasma (Iwakawa & Tomari, 2015; Yu *et al.*, 2017).

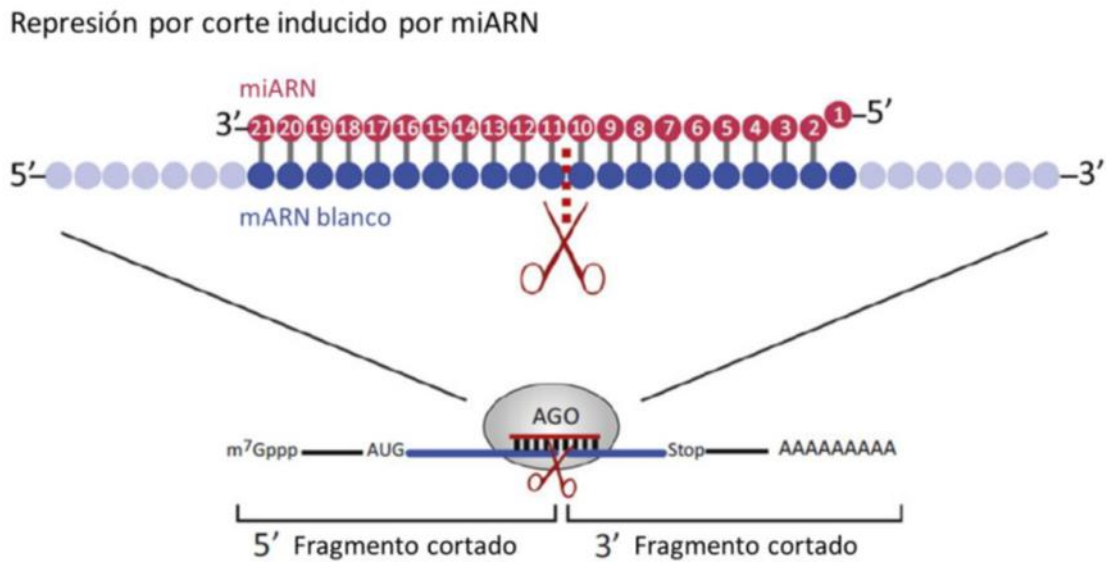


Figura 7. Esquema representativo de represión post-transcripcional de un mRNA blanco por corte inducido por miRNA (Figura modificada de Iwakawa & Tomari, 2015).

Por otra parte, el mecanismo molecular de la regulación por represión de la traducción mediada por los microARNs no es del todo. Hasta hoy, solo se sabe que algunos factores involucrados en este evento son; la enzima de corte de microtúbulos KATANIN 1 (KTN1), el componente VARICOSE (VCS) del cuerpo de procesamiento (P body), la proteína SUO con repeticiones GW y la proteína de membrana del retículo endoplásmico rugoso ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (Yu *et al.*, 2017). Se han propuesto algunos mecanismos sobre la represión de la traducción. Uno de estos mecanismos es que los miARN podrían inhibir la iniciación de la traducción por un secuestro del ARNm blanco hacia el compartimiento celular traduccional inactivo. En contraste, un número significativo de miARN está asociado con el polisoma, implicando entonces, que

probablemente su función se encuentra en un paso posterior a la iniciación de la traducción (Iwakawa & Tomari, 2015; Liu *et al.*, 2014).

2.7. Papel de los microARNs durante la simbiosis

Como se ha mencionado, los microARNs se encargan de regular múltiples procesos en las plantas. En el caso de la nodulación, podemos ubicar a los microARN como reguladores genéticos importantes de la simbiosis entre estos dos organismos. Ya que se ha comprobado la participación de varios microARNs en puntos clave de este proceso. Un ejemplo de esto es el miR171, el cual está presente en todos los grupos de Embryophytas (plantas terrestres) y particularmente fue identificado en las leguminosas, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* y *Phaseolus vulgaris*. Este microARN realiza su acción en el proceso de nodulación, regulando la expresión del factor de transcripción NSP2 (Nodule Signaling Pathway 2), el cual está involucrado en la organogénesis del nódulo y el mantenimiento del meristemo. De igual manera varios microARNs se encargan de regular otros genes importantes para que esta interacción se establezca, generando interconexiones con otros microARNs y los diferentes genes implicados en toda la simbiosis (Lelandais-Brière *et al.*, 2016; véase figura 8).

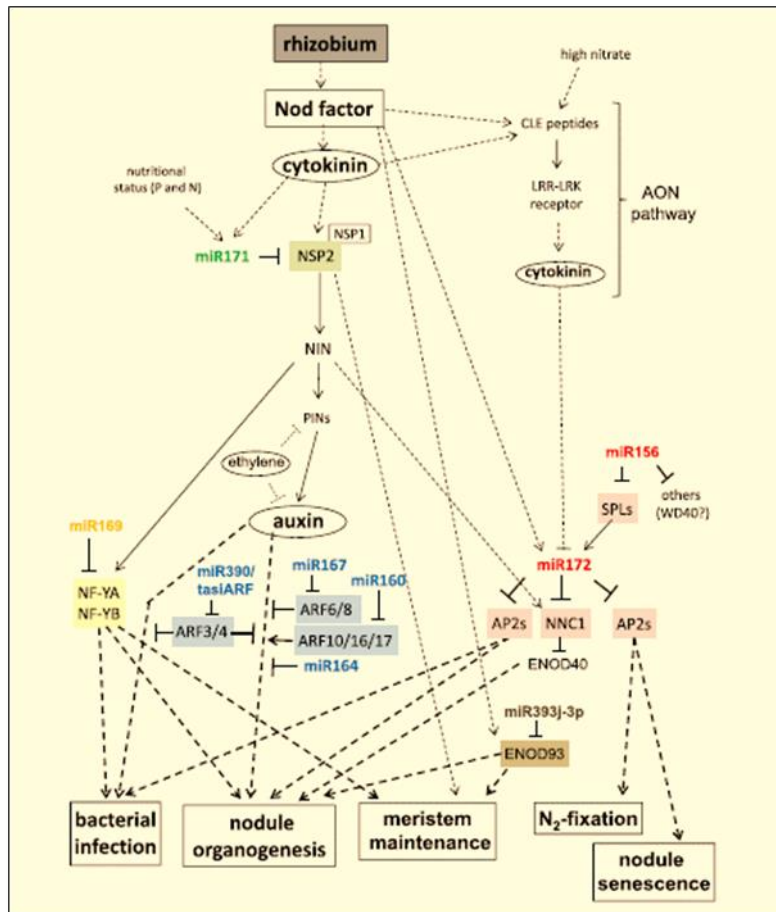


Figura 8. Representación esquemática de las interconexiones entre microARNs y señalización de factores de transcripción (TF) y regulación de hormonas durante la simbiosis (Figura recuperada de Lelandais-Brière, Moreau, Hartmann, & Crespi, 2016).

2.8. mirNov223 y mirNov270

En 2015, Formey y colaboradores identificaron un grupo de microARNs en el genoma de *P. vulgaris* y algunos posibles transcritos blanco de estos microARNs. Para dicho trabajo, utilizaron la reciente base de datos del genoma del frijol común y 5 librerías de sRNAs obtenidas de 5 tejidos pertenecientes a esta planta. Estos tejidos fueron, flores, hojas, plántulas, raíces y de nódulos que fueron generados de la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium tropici*.

Para realizar la identificación de los microARNs, utilizaron la herramienta pipeline miRDeep-P (una herramienta computacional para identificar los microARNs del transcriptoma y/o genoma de plantas). De este modo, identificaron un conjunto de 185 microARNs maduros codificados por 307 precursores

distribuidos en 98 familias. Así mismo, mediante degradoma (una técnica que identifica los cortes inducidos por el microARN) descubrieron un total de 181 posibles blancos para estos microARNs. Posteriormente, con el fin de dilucidar cuales microARNs son diferencialmente acumulados en los nódulos, realizaron un análisis de patrones de expresión y distribución en los 5 diferentes tejidos antes mencionados. En dicho análisis, encontraron microARNs altamente conservados, nuevas isoformas de microARNs conservados y algunos nuevos microARNs nunca antes reportados. Dentro de estos nuevos microARNs reportados, se encuentran los miRNov223 y miRNov270, quienes, según su patrón de expresión en raíces y nódulos, podrían estar regulando algún gen que interviene en el proceso de nodulación (Formey *et al.*, 2015).

Al analizar el patrón de expresión del miRNov223 en raíz se detectaron 86 lecturas de secuenciación masiva contra 0 en el nódulo. La ausencia de este microARN en nódulos indica, que probablemente el miRNov223 tenga algún papel en el proceso de regulación de la nodulación. Así mismo, se especula que el miRNov270 también tiene un rol en este proceso, ya que, presenta un perfil de expresión parecido. En su caso en raíz se dataron 14 lecturas contra 1 en nódulo (Formey *et al.*, 2015). Es por eso, que identificar los ARNm diana de estos microARNs es importante para caracterizar la función de estos en el proceso de nodulación. Por lo tanto, en este trabajo, realizamos la predicción de posibles blancos que puedan ser regulados por estos microARNs e implementamos diferentes metodologías para comprobar los blancos que se predijeron.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados para mejorar el crecimiento en cultivos de diferentes alimentos de origen vegetal se ha vuelto muy recurrente, lo cual, ha provocado un aumento en el nivel de contaminación de suelos en donde son vertidos. Estos compuestos altamente nitrogenados, son arrastrados con las lluvias a diferentes cuerpos de agua que a su vez desembocan en el océano. Se ha reportado en la actualidad una zona en la que, debido a las altas concentraciones de nitrógeno, el crecimiento de algas a aumento al grado de cubrir gran superficie del agua impidiendo el paso de luz solar y oxígeno. De esta manera impide el desarrollo de los demás seres vivos presentes en el cuerpo de agua (flora y fauna), disminuyendo así, la diversidad de especies.

Por esto, el presente proyecto se llevará a cabo con el fin de profundizar en los conocimientos base de la regulación genética de la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno. Ya que, aunque varios genes y microARN han sido identificados como actores de las diferentes etapas de la nodulación, los análisis de las regulaciones genéticas no han permitido descubrir por completo la vía de señalización del establecimiento de esta simbiosis a través de estos elementos de regulación. Por lo tanto, al identificar los blancos de estos microARNs se generarán más conocimientos básicos sobre la acción de estas moléculas y permitirá identificar la regulación de los genes involucrados en la simbiosis entre estos dos organismos. Para que posteriormente, estos conocimientos puedan facilitar la producción de biotecnología aplicada para mejorar los cultivos tanto del frijol como de otras plantas de interés agronómico incapaces de realizar la simbiosis con rizobios, transfiriendo así la capacidad de establecer la nodulación, y con esto disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados.

4. HIPÓTESIS

Los microARNs miRNov270 y miRNov223 regulan de manera diferencial transcritos en *Phaseolus vulgaris* durante la simbiosis con *Rhizobium etli*.

5. OBJETIVO GENERAL

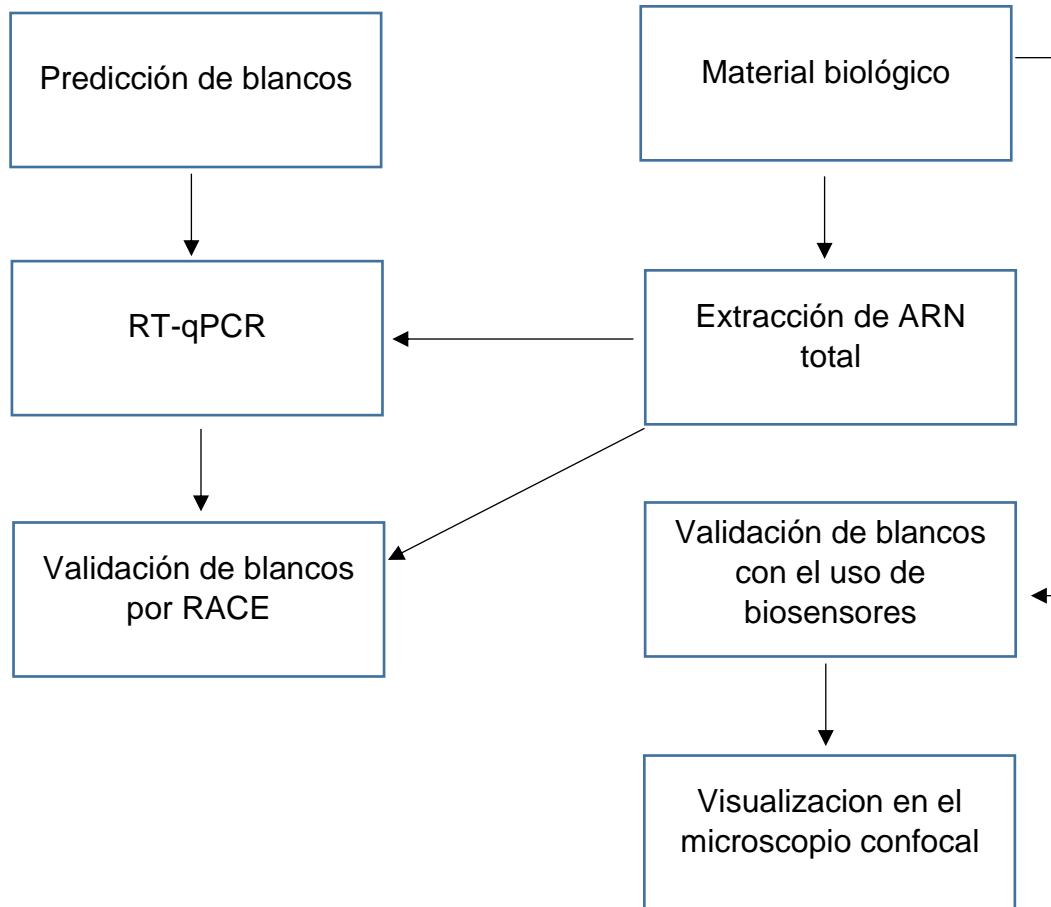
Utilizar técnicas y herramientas adecuadas para identificar los transcritos diana de los microARNs miRNov270 y miRNov223.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la lista de los posibles blancos de miRNov270 y miRNov223.
- Determinar vía qPCR la acumulación de los blancos predichos del miRNov223 y miRNov270 en condiciones donde estos microARN están diferencialmente acumulados.
- Evaluar la probabilidad de que los blancos predichos para miRNov223 y miRNov270 sean genuinos mediante la técnica de RACE y la utilización de biosensores fluorescentes de microARNs.

7. METODOLOGÍA

7.1. Estrategia experimental general



7.2. Predicción de blancos

Se utilizaron 2 programas para la predicción bioinformática de posibles blancos de los microARNs miRNov270 y miRNov223. El primer programa fue psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis>; Dai *et al.*, 2018), en el cual se predijeron blancos a partir de la versión 2.1 de base de datos de transcritos pertenecientes al genoma de *P. vulgaris*. Así mismo, se utilizaron los parámetros predeterminados por el programa y solo se eligieron los blancos que tengan un valor de expectación menor a 5, dicho valor es la puntuación dada para cada blanco según la cantidad de desapareamientos. La segunda herramienta que se utilizó fue, WMD3 versión 3.1 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), la cual también realiza la búsqueda basada en la misma versión de base de datos antes mencionada. De igual manera, se seleccionaron como posibles blancos a aquellos que, según el programa tuvieran un mayor porcentaje de hibridación. Una vez realizado esto, comparamos la lista de blancos obtenida con cada programa y solo se seleccionaron como candidatos aquellos que se encontraron presentes en ambas listas y que, además, tienen reportada alguna información de funcionalidad en la base de datos de Phytozome v12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Además aunado a la búsqueda de nuevos blancos para ambos microARNs, también se realizó el análisis de blancos anteriormente predichos para el miRNov270 por Elizondo en 2018.

7.3. Diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR

Una vez obtenida la lista de blancos, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar y cuantificar los genes candidatos seleccionados. Para tres de los candidatos predichos, no se realizó el diseño de oligonucleótidos debido a que el grupo de investigación ya contaba con estos. Para la mayoría de blancos se procuró que los primers se diseñaran al rededor del el sitio de hibridación entre el microARN y su posible blanco. Además, se seleccionaron aquellos cuyo amplicon no excediera los 200 nucleótidos. Para el cálculo de la eficiencia de amplificación de estos primers primero se realizó una muestra del ADNc de las 9 muestras (correspondiente a las 3 repeticiones biológicas de cada condición). Esta mezcla

se diluyó 1/40, así mismo, se realizaron 3 puntos de dilución más, estos fueron; 1/400, 1/4000, 1/40000. De esta forma realizamos una curva de dilución (estas graficas se encuentran en el Anexo 5) para comprobar la eficiencia de estos primers por qPCR. Por último, para verificar la eficiencia, se utilizó el programa qPCR Efficiency Calculator de Thermofisher.

	Blanco	Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Eficiencia
miRNov223	002G012200.1	q2G012200F	GGAAATGGAAGGCAAGTAACAG	166	80% >
		q2G012200R	TGGAAGGGTGAGATTCCAAG		
	004G153201.1	q4G153201F	AAGCTCAACAGCAGCACAGA	182	80% >
		q4G153201R	TCAGCCAACTGAGCATACG		

Tabla 1. Lista de primers diseñados para la amplificación por RT-qPCR de algunos probables blancos predichos para el miRNov223.

	Blanco	Primers	Secuencia 5'-3'	Tamaño del amplicón (pb)	Eficiencia
miRNov270	011G115200.1	q11G115200F	AAGTGCAACTAGCGCAGGA	191	80% >
		q11G115200R	GGATGTAGGGACGCAACAG		
	002G124500.1	q2G124500F	GCAGACAAGTACCTGCGACT	153	80% >
		q2G124500R	TCCGAGTTGTGTTTGAAT		
	008G227000.1	q8G227000F	GAGGAGGAGCAGTTTTGTG	156	80% >
		q8G227000R	CCAGCATGGCTACTTTGACA		

Tabla 2. Lista de primers diseñados para la amplificación por qRT-PCR de algunos probables blancos predichos para el miRNov270.

7.4. Material Biológico

Las muestras de ARN que fueron utilizadas para la técnica de RACE y qRT-PCR, se obtuvieron de nódulos y raíces de *Phaseolus vulgaris* L. var. G19833 a 21 dpi con *Rhizobium etli*. Cabe mencionar, que se realizaron 3 repeticiones biológicas en distintos tiempos para así tener un control del perfil transcriptómico de cada muestra extraída de lote de plantas. Al realizar lo antes mencionado, pudimos verificar si dicho perfil varía y así percibir si hubo un error humano o algún factor ambiental que modificara la cantidad de genes transcritos al momento de extraer las muestras.

Para la comprobación por biosensores se utilizaron construcciones antes realizadas en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Así mismo, se efectuó la agroinfiltración en plantas de *Nicotiana benthamiana* de 6 semanas de edad.

7.5. Extracción de ARN total

Antes de realizar de las técnicas de RT-qPCR y RACE se hizo una extracción de ARN total. Esta es una técnica que nos permite aislar moléculas de ARN de tejidos y células. Dicha extracción, se llevó a cabo con el uso del kit mirVana™ miRNA Isolation Kit de Ambion (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; Anexo 1), a partir de 100 mg de cada muestra de raíces y nódulos de *P. vulgaris* var. G19833. Al finalizar la extracción se cuantificó el ARN por nanodrop y mediante un gel de agarosa se observó la integridad del ARN. Cabe mencionar que este método de aislamiento de ARN se utilizó tanto para la técnica de RACE como para la de qRT-PCR.

7.6. Validación de blancos por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

Se realizó la técnica de Stem-loop RT-qPCR para comparar la acumulación de los microARNs miRNov270 y miRNov223 con sus respectivos blancos. Previo a realizar qPCR, primero sintetizamos el ADNc de cada una de nuestras muestras, tanto de los ARNm como de los microARNs. Sin embargo, para lograr sintetizar el ADNc es necesario un templado inicial para que la retrotranscriptasa pueda hacer su función, lo cual es una complicación, ya que los microARNs solo tienen de 20 a

22 nt. Por ello se utilizó la técnica Stem-loop RT-qPCR la cual permite retrotranscribir microARNs y ARNm en una misma reacción. En esta técnica se usó un primer diseñado (RT primer) el cual tiene una longitud óptima para la posterior amplificación y tiene 6 nt complementarios al miARN (Figura 9A). En este sitio se unió la enzima transcriptasa reversa e inicio a sintetizar el ADNc del miARN (Figura 9B). El oligonucleótido RT puede formar un tallo-bucle lo que le da la ventaja de desplegarse y ser templado del oligonucleótido universal reverse durante la qRT-PCR. Por lo tanto, el primer forward es el oligonucleótido que permite la amplificación específica del miARN deseado y es específico de la parte correspondiente del ADNc del microARN maduro (Figura 9C) (Kramer, 2011). Por otra parte, en la misma reacción de retrotranscripción (RT) se agregó oligo dT para retrotranscribir al mismo tiempo a los ARNm.

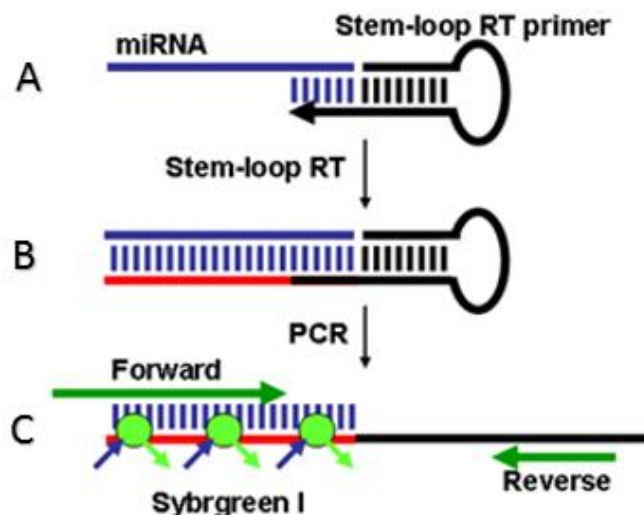


Figura 9. Método Stem-loop RT-qPCR de los microARNs.

El siguiente paso fue amplificar por RT-qPCR el microARN maduro y sus blancos seleccionados. Esto para comparar la expresión de uno con respecto al otro, esperando que el nivel de acumulación relativa del microARN maduro sea inverso a su respectivo blanco. En la amplificación por RT-qPCR se utilizó el fluoróforo SYBR Green de Thermo Scientific que emite fluorescencia cuando se intercala en el ADN de doble cadena, de esta manera a medida que se amplifica el ADNc en la PCR, incrementa la emisión de fluorescencia. Con el propósito de

normalizar los datos de acumulación de los genes, se utilizaron controles internos, estos fueron genes de referencia cuyos perfiles de acumulación son conocidos y no cambian. En el caso de los microARNs maduros se utilizó el U6 snARN (U6 small nucleolar ARN), ya que, es un ARN pequeño no codificante de plantas que cuenta con todas las características requeridas de un buen gen de referencia. Algunas de estas características es que son genes que siempre se encuentran expresados y sus niveles de expresión son constantes. Esto permite tener un punto de referencia al cual comparar el nivel de expresión de nuestros genes de interés. Para los transcritos blanco se usaron los siguientes 3 genes de referencia; UBC (Ubiquitina C), MDH (Malato deshidrogenasa), HSP (Proteínas de choque térmico por sus siglas en inglés). Así mismo, con el fin de validar la confiabilidad de nuestras muestras analizamos mediante qPCR la acumulación relativa de los genes marcadores de la nodulación NIN2 y ENOD40.

Al finalizar la qRT-PCR, se obtuvieron los datos de amplificación y posteriormente se realizó un cálculo de la expresión utilizando el método comparativo de los Ct (límite de ciclos por sus siglas en ingles). Dicho método, consiste en la comparación directa de los Ct de la secuencia de interés y los Ct de los genes de referencia correspondientes a cada muestra (Schmittgen & Livak, 2008). De esta manera, logramos conocer el nivel de la acumulación relativa de los miARN y sus posibles transcritos blancos. Así mismo, se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, la cual sirve para realizar comparaciones múltiples con un intervalo de confianza del 95%. Esto permitió evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las medias de los experimentos que se realizaron. Una vez obtenidos, los perfiles de expresión de los microARNs y sus posibles blancos, se analizaron y, con ayuda de esto, nuevamente seleccionamos como posibles candidatos aquellos que tuvieron un perfil de acumulación relativa que indicaba una probable regulación por su respectivo microARN.

7.7. Validación de blancos por RACE

Posterior a realizar el escrutinio de los blancos por qRT-PCR, se procedió a validar estos blancos mediante la técnica de 5'RACE. Originalmente la RACE está diseñada para conocer los extremos de un ARN mensajero. Gracias a algunas

modificaciones, es posible identificar y comprobar los cortes inducidos por los microARN a sus respectivos ARNm blancos. Así mismo, esta técnica presenta dos variantes, la 5´ RACE y la 3´RACE. Dependiendo del extremo en donde se vaya a trabajar será la variante que se implementara (Wang & Fang, 2015). Dicha elección se hizo según el sitio de corte del microARN, sin embargo, preferencialmente implementamos la 5´RACE.

7.7.1. 5´RACE

Para esta técnica se siguió el protocolo de 5´RACE FirstChoice RLM-RACE Kit de Ambion (Anexo 3). En esta variante se trabajó en el extremo 5´ de la parte 3´ del ARNm escindido por el microARN. Este extremo carece del “cap”, por lo tanto, se le pudo ligar un adaptador en el fosfato libre en 5´ con ayuda de una ligasa. Después, usando un primer poli “T”, se realizó una retrotranscripción. Consecuentemente, este ADNc del extremo 5´ se amplificó con la técnica de PCR anidada (técnica que requiere de dos oligos, externo e interno). Para este paso, primero se agregó un oligonucleótido forward externo el cual se unió al adaptador universal anteriormente ligado al extremo. A la par se agregó también un oligonucleótido reverse externo diseñado en base a la secuencia del ARNm. Ya realizada la primera amplificación, se procedió a realizar la segunda, en esta ocasión se agregó un oligo forward interno que se unirá a una región más interna y específica del adaptador. De igual manera, se agregó también el oligo reverse interno que se diseñó para unirse también a una región más específica del ARNm.

Posteriormente los amplicones que se produjeron, se ligaron al vector pJET 1.2/blunt Cloning Vector siguiendo el protocolo del kit Clone JET PCR Cloning Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). Seguidamente, estas construcciones fueron clonadas en *E. coli* TOP10 para esparcirlos y cultivarlos en cajas Petri con agar LB y ampicilina a una concentración de 100 µg/mL (antibiótico al cual la bacteria se volverá resistente una vez que integre el plásmido). Estos cultivos, se mantuvieron en una incubadora por 18 horas a una temperatura de 37°C para después, seleccionar clonas al azar y hacer un escrutinio de estas por PCR. Posteriormente estas construcciones (vector + inserto) se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología,

UNAM. Por último, realizamos un análisis de la presencia significativa de secuencias que correspondan al corte específico inducido por su respectivo microARN. De esta forma, esperamos validar por probabilidad si los respectivos microARNs efectivamente son quienes produjeron estos fragmentos.

7.8. Validación de blancos mediante el uso de biosensores

La técnica de biosensores de microARN nos permite observar la posible regulación, incluyendo la traduccional (sin corte), de un microARN sobre un blanco. Esta técnica está basada en la co-expresión de una construcción que generará al microARN de interés con una proteína reportera (dTomato, proteína ya presente en el plásmido) con otra construcción que expresará un transcrito codificante de otra proteína reportera (CFP (Cyan Fluorescent Protein) en nuestro caso) fusionado con el sitio de unión al microARN del blanco para el cual queremos evaluar la regulación. De esta forma, al expresarse ambas construcciones, si el microARN regula a su blanco, al unirse a este sitio de unión, inhibirá la expresión de la proteína CFP. Por lo tanto, al analizar la fluorescencia veremos una disminución de la intensidad de la coloración Cyan/azul y una mayor intensidad de la coloración roja correspondiente a la proteína dTomato.

Para realizar esta co-expresión, usamos la técnica de agroinfiltración de construcciones de sobreexpresión, basado en el plásmido pTDTO, en hojas de tabaco.

Esta técnica funciona gracias a los diferentes elementos que componen al plásmido (Figura 10, pTDTO; Aparicio-Fabre et al., 2013). Por ejemplo, los sitios limítrofes LB y RB son regiones de reconocimiento para endonucleasas de *A. tumefaciens*. De esta forma, todo lo que se encuentre dentro de estas regiones denominadas T-DNA, se introduce al genoma de la planta cuando se realice la infección por *A. tumefaciens*, para posteriormente ser expresado por la planta. Esta región contiene varios sitios de corte para diferentes enzimas de restricción y de esta forma podemos digerir el plásmido e insertar nuestra secuencia de interés a expresar, en este caso el precursor del respectivo microARN. Cabe señalar que las construcciones que analizaremos del miRNov270, junto con sus respectivos

blancos, ya fueron realizadas y serán proporcionadas por el Grupo de Genómica Funcional de Eucariontes (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM).

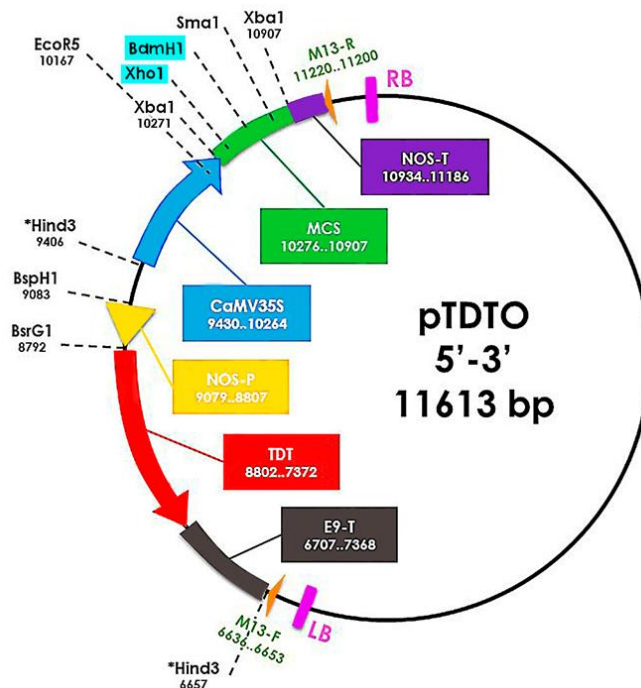


Figura 10. Mapa del vector pTDTO. Este vector contiene al promotor NOS (un promotor constitutivo, lo cual significa que tiene una expresión constante), que controla la transcripción del gen codificante para la proteína reportera dTomato (TDT). Así mismo, el plásmido contiene otro cassette de expresión controlado por el promotor CaMV35S (también un promotor constitutivo fuerte), que contiene un sitio de multiclonación.

7.8.1. Agroinfiltración

La agroinfiltración se llevó a cabo según el protocolo propuesto por Leuzinger y colaboradores (2013). Debido a que las construcciones estaban ya en la cepa de *A. tumefaciens* GV3101, se realizó un pre-cultivo a partir de una colonia transformada. Cada colonia se cultivó en 5 mL de medio líquido LB, con 50 µg/mL de espectinomicina (antibiótico de selección del plásmido). Este cultivo, se dejó incubar por 18 horas a 30°C en agitación de 250 rpm. Posteriormente, se midió la densidad óptica del cultivo en una longitud de onda de 600nm. A partir de esta lectura se hicieron cálculos con base a la siguiente fórmula para conocer el volumen necesario de pre-cultivo para realizar un subcultivo de 10mL con una OD₆₀₀ de 0.025.

$$V_{sub} = \frac{(10 \text{ mL})(0.025)}{OD_{600}}$$

Después, estos subcultivos, se incubaron a 30°C con agitación 250 rpm durante 18 horas. Luego de este tiempo, se comenzó con la preparación de cepas para la infiltración. Para esto, se midió la OD₆₀₀ del subcultivo y se hicieron los cálculos pertinentes del volumen necesario para tener una OD₆₀₀ de 0.12 de las cepas en 50 mL de buffer de infiltración (10 mM MES, pH 5.5; 10 mM MgSO₄; 10 µM acetosiringona). La fórmula que se utilizó para los respectivos cálculos fue la siguiente:

$$V_{inf} = \frac{(50 \text{ mL})(0.12)}{OD_{600}}$$

Se procedió a realizar la infiltración con una jeringa sin aguja en el envés de las hojas de *Nicotiana benthamiana*. La infiltración se realizó según patrón de infección basado en sobreponer los halos de infiltración (al estilo de un diagrama de Venn, véase figura 11) con las cepas transformadas del sensor y su respectiva sobreexpresión del microARN (Leuzinger *et al.*, 2013).

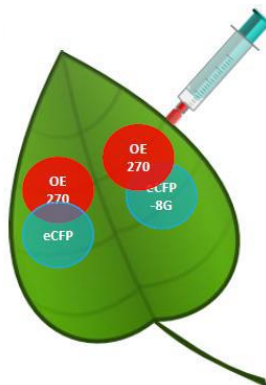


Figura 11. Esquema representativo de la estrategia de agroinfiltración y comprobación del sensor con sus respectivos miRNAs (imagen tomada de Elizondo, 2018). Los círculos rojos representa la construcción de sobreexpresión del microARN con el cassette de expresión del gen que codifica para la proteína reportera dTomato. Los círculos azules representan tanto a la construcción que solo tiene el cassette de expresión de la proteína eCFP como a la construcción que contiene al mismo cassette de expresión fusionado al sitio de unión del microARN.

7.8.2 Visualización en el microscopio confocal

Las hojas coinfiltradas fueron visualizadas en el microscopio confocal Olympus FV100 Invertido del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA). Para dicha visualización se utilizó un aumento de 20X utilizando las líneas laser de 405 nm y 543 para excitar a las proteínas reporteras eCFP y dTomato respectivamente.

8. RESULTADOS

8.1. Predicción de blancos

Se realizó la predicción de blancos con los programas bioinformáticos psRNATarget y WMD3 (véase en metodología). En el caso de psRNATarget se seleccionaron para analizar por RT-qPCR solo a los blancos que tuvieran un puntaje de penalización de 3.5 (puntaje otorgado por el programa por desapareamientos) como máximo y que presentaran un perfil de expresión cercano a lo esperado (más acumulados en nódulos que en raíces) según los datos de expresión revisados en el “Gene Atlas” y la base de datos “Phytozome”. Sin embargo, al hacer el análisis con el programa WMD3, no se obtuvieron candidatos para miRNov270 y, aunque para el miRNov223 se encontraron blancos, estos no fueron seleccionados debido a que, al momento de consultar los datos de expresión en ambas bases de dato ya antes mencionadas, no se encontró que tuvieran un perfil de expresión al esperado (mayormente acumulados en nódulos que en raíces).

A continuación se mencionan los candidatos obtenidos para ambos microARNs en el psRNATarget:

Para el miRNov223 se obtuvieron como posibles candidatos de blancos los siguientes transcritos: el primero en la lista es el gen codificante para una proteína

con función desconocida con ID en Phytozome de Phvul.004G153201.1, el cual, a pesar de no presentar un perfil de expresión esperado, fue seleccionado debido a que su puntuación de penalización fue de 2.5. El transcrito Phvul.002G012200.1 codificante para una proteína con dominio LOB se eligió como un posible candidato debido tanto a su puntuación de penalización (3.0) como a su perfil de expresión. Al comparar los datos de expresión de raíces de plantas inoculadas o no (RE y RF, respectivamente) contra los datos de expresión de nódulos correspondiente (NE), y a su vez los datos de phytozome, pudimos observar que cumplen con el perfil de expresión esperado (más acumulados en nódulos que en raíces; Tabla 3). Para el transcrito Phvul.004G129200.1 codificante para un factor de splicing, a pesar de no haber encontrado datos de expresión en el “Gene Atlas”, en la base de datos de Phytozome se encontró que está ligeramente más acumulado en nódulos que en raíces. Además, este transcrito tiene un puntaje de penalización de 3.0 en la predicción por psRNATarget, lo cual lo hace un probable candidato. Por último, el transcrito Phvul.003G256500.1, que codifica para una hidroxilasa, fue principalmente seleccionado como posible blanco debido a su puntaje de penalización y a que ya anteriormente se había analizado su expresión por RT-qPCR en el grupo de investigación. Sin embargo, se decidió analizar su expresión en nuestras condiciones.

Tabla 3. Blancos predichos por psRNA Target para el miRNov223 con sus respectivas descripciones, puntuaciones de penalización y sus datos de expresión en ambas bases de datos.

GeneID	Descripción	psRNATarget	Gene Atlas (FPKM)						Phytozome (FPKM)	
			N5	NE	NI	RF	RE	RI	Nódulos	Raíces
Phvul.004G153201.1	Ninguna	2.5							0.0	0
Phvul.002G012200.1	Proteína con dominio LOB	3.0	183	241	54	118	78	45	24.139	13.244
Phvul.004G129200.1	Factor de Splicing	3.0	0	0	0	0	0	0	0.042	0
Phvul.003G256500.1	Hidroxilasa	3.5							2.655	6.745

Abreviaciones: N5, Nódulos efectivos colectados 5 días post-inoculación; NE, nódulos efectivos colectados 21 días post-inoculación; NI, nódulos no efectivos colectados 21 días post-inoculación; RF, Raíces de plantas fertilizadas colectadas al mismo tiempo que en RE y RI; RE, Raíces separadas de nódulos eficientes colectadas a 21 días post-inoculación; RI, Raíces separadas de nódulos ineficientes colectadas a 21 días post-inoculación; FPKM, fragmentos por kilobases por millón.

En el caso del miRNov270, se obtuvieron como candidatos a blancos los siguientes genes: el transcrito Phvul.011G115200.1 que codifica para una proteína con función desconocida, con un su puntaje de penalización de 2.0 en psRNATarget al igual que en el caso del transcrito Phvul.008G075700.1 que tuvo un puntaje de 2.5. Así mismo, el transcrito Phvul.002G124500.1, que codifica para una nodulina, no tiene una acumulación diferencial en raíces y nódulos, según los datos del gene atlas y Phytozome, sin embargo, este fue considerado dado que su puntaje de penalización de predicción de blanco fue de 3.0. Por último, el transcrito Phvul.008G227000.2, que codifica para una proteína fosfatasa/fosfomonoesterasa, se encuentra diferencialmente expresado en nódulos y raíces, según ambas bases de datos, además de que tener un puntaje de penalización de predicción de blanco de 3.0, por lo cual, lo hace un posible candidato (véase tabla 4).

Tabla 4 Blancos predichos por psRNA Target para el miRNov270 con sus respectivas descripciones, puntuaciones de penalización y sus datos de expresión en ambas bases de datos

GeneID	Descripción	psRNATarget	Gene Atlas (FPKM)						Phytozome (FPKM)	
			N5	NE	NI	RF	RE	RI	Nódulos	Raíces
Phvul.011G115200.1	Ninguna	2.0	0	1	3	0	2	1	0.217	0.376
Phvul.008G075700.1	Ninguna	2.5	7	3	11	35	22	50	0.862	1.056
Phvul.002G124500.1	Nodulina	3.0	2	1	7	2	2	3	2.37	3.99
Phvul.008G227000.2	Fostasa/Fosfomonoesterasa	3.0	7	8	39	13	11	8	11.27	4

Abreviaciones: N5, Nódulos efectivos colectados 5 días post-inoculación; NE, nódulos efectivos colectados 21 días post-inoculación; NI, nódulos no efectivos colectados 21 días post-inoculación; RF, Raíces de plantas fertilizadas colectadas al mismo tiempo que en RE y RI; RE, Raíces separadas de nódulos eficientes colectadas a 21 días post-inoculación; RI, Raíces separadas de nódulos ineficientes colectadas a 21 días post-inoculación FPKM, fragmentos por kilobases por millón.

8.2. Extracción de ARN

Se realizó la extracción del ARN total de tejido nodular y radical, correspondiente a las 3 repeticiones biológicas de cada condición. Estas condiciones fueron; raíces no inoculadas (el cual fue nuestro control), raíces inoculadas y nódulos de estas raíces inoculadas, colectados a 21 dpi. Cada condición se repitió 3 veces lo cual nos da un total de 9 muestras a analizar. En la

tabla 5 se muestran las cantidades obtenidas por espectrofotometría. Como podemos ver en la tabla, siempre se obtuvo una mayor concentración de ARN en nódulos que en raíces, lo cual concuerda con lo esperado, pues es bien sabido que en ellos siempre hay mayor concentración de transcritos (Formey *et al.*, 2015).

Tabla 5. Concentraciones de ARN total obtenidas en cada repetición biológica de las condiciones analizadas.

Muestra	Concentración de ARN (ng/μl)	Relación 260/280	Relación 260/230
RI 1	370.4	1.93	0.81
RNI 1	442.0	1.94	1.22
N1	674.1	1.89	0.83
RI2	224.1	1.86	0.91
RNI2	372.5	1.93	1.11
N2	1416.9	1.98	1.35
RI3	263.5	1.88	0.91
RNI3	364.7	1.93	1.38
N3	1956.9	2.01	1.48

Se muestra la relación que hay entre cada absorbancia, indicando el nivel de pureza de las muestras. Abreviaciones; RI, raíces inoculadas; RNI, raíces no inoculadas; N, nódulos y el numero al lado indica la repetición a la que corresponde.

Mediante electroforesis y la visualización del gel de agarosa se confirmó la integridad del ARN de cada muestra. Como podemos observar en la figura 12, se aprecian claramente dos bandas que corresponden a las subunidades 25S y 18S del ribosoma. De esta forma, podemos confirmar, que el ARN no se encuentra degradado en ninguna de las muestras. Por lo tanto, las muestras fueron adecuadas para realizar la retrotranscripción y obtener el ADN complementario de las muestras.

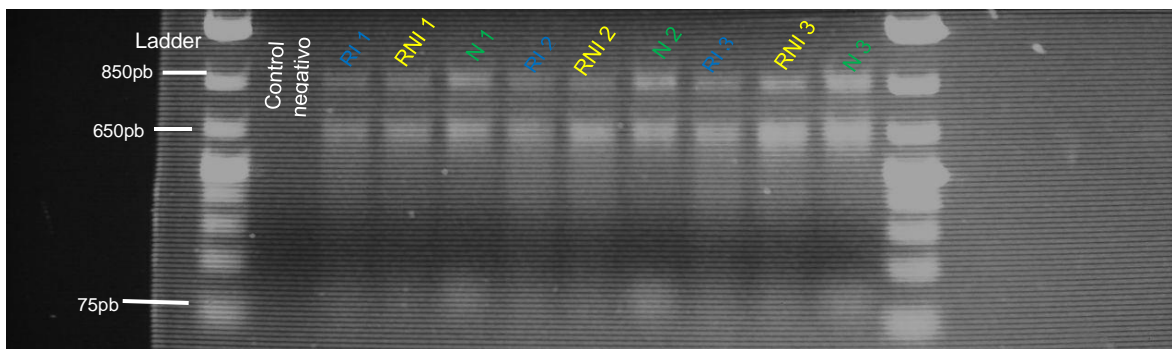


Figura 12. Determinación de la integridad del ARN total en un gel de agarosa a 1%. Abreviaciones; RI, raíces inoculadas; RNI, raíces no inoculadas; N, nódulos. Al lado de las abreviaciones también se indica el número de repetición biológica al que corresponde el carril.

8.3. Nivel de acumulación diferencial de los microARNs (miRNov223 y miRNov270) y sus blancos en raíces no inoculadas, raíces inoculadas y nódulos.

La RT-qPCR nos permite definir el perfil de acumulación en nuestras muestras de los transcritos blancos seleccionados. Basado en estos perfiles, haremos una nueva selección de posibles blancos de cada microARN. Solo se considerarán como candidatos fuertes a aquellos que tengan un perfil de acumulación relativa mayor en nódulos que en raíces, el perfil contrario al de los miRNov223 y miRNov270, los cuales están más acumulados en raíces que en nódulos.

8.3.1. Validación de muestras

Con el fin de validar la confiabilidad de nuestras muestras decidimos analizar mediante qPCR la acumulación relativa de los genes marcadores de la nodulación NIN2 y ENOD40. Se conoce que estos genes se acumulan en mayor proporción en los nódulos que en raíces, ya que, están involucrados en la regulación del establecimiento de estos. Como resultado de dicho análisis, se obtuvo que la acumulación (acumulación relativa a los genes de referencia, UBC, HSP, MDH) de ambos genes marcadores de la nodulación es mayor en nódulos que en raíces y según la prueba estadística aplicada esta diferencia es significativa (Figuras 13 y 14).

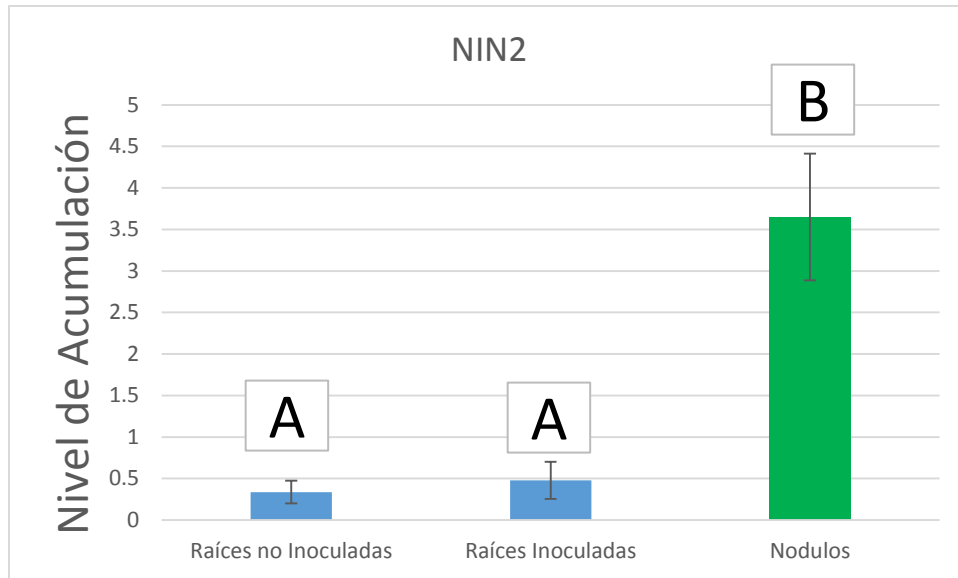


Figura 13. Acumulación relativa del gen marcador de la nodulación NIN2. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

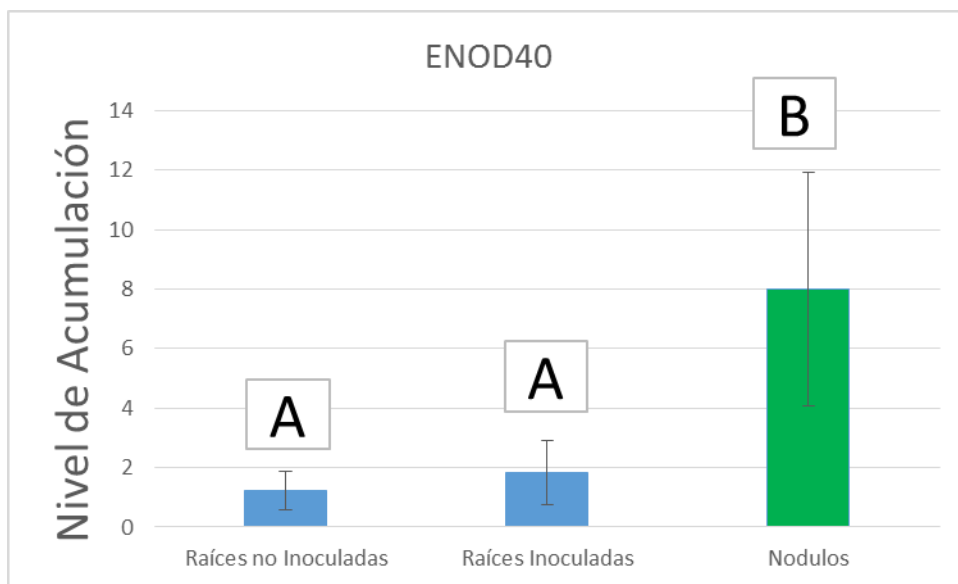


Figura 14. Nivel de acumulación relativa del gen marcador de la nodulación ENOD40. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

8.3.2. Acumulación diferencial del miRNov223 y sus posibles blancos

Los resultados del nivel de acumulación del precursor del miRNov223 y del miRNov223 maduro denotan que hay una mayor acumulación en las raíces tanto inoculadas como no inoculadas comparado a los nódulos. Estas diferencias son

significativas según la prueba estadística de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis (Figura 15 y 16).

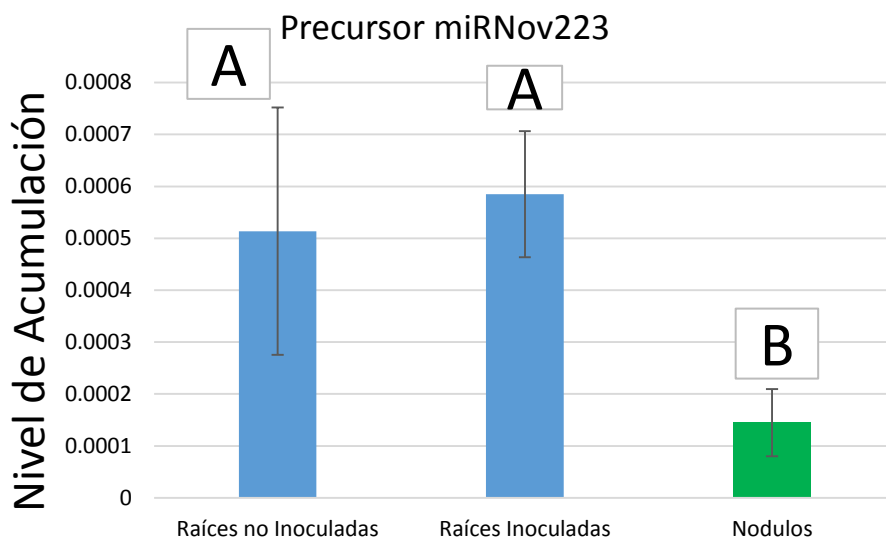


Figura 15. Acumulación relativa del precursor del miRNov223. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

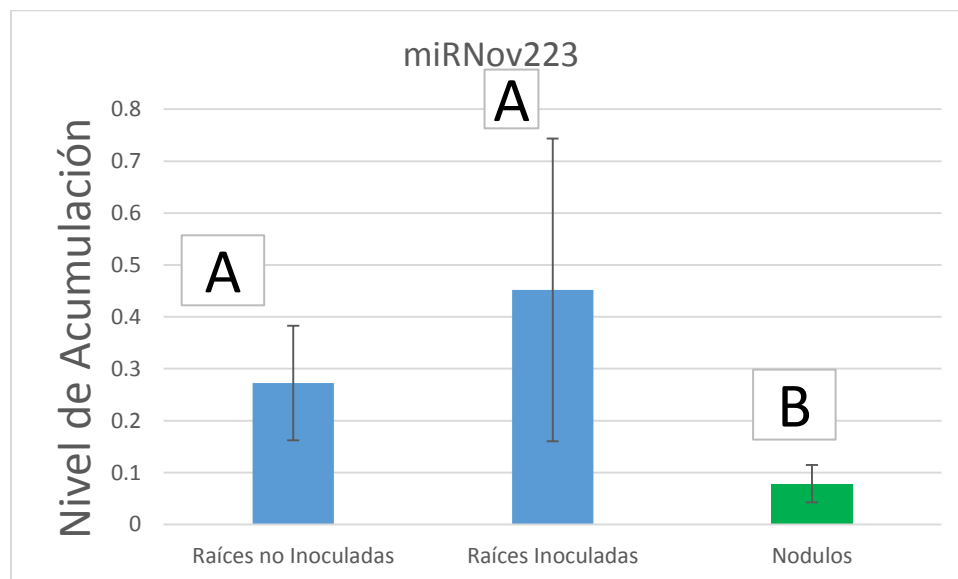


Figura 16. Nivel de acumulación relativa del miRNov223. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Como se puede apreciar en las figuras 17, 18 y 19 correspondientes a los blancos Phvul.004G153201.1, Phvul.002G012200.1 y Phvul.004G129200.1, según

la prueba de comparaciones múltiples, dichos blancos tienen una acumulación diferencial significativamente mayor en nódulos que en raíces inoculadas, lo cual cumple con el perfil esperado para considerarlos potenciales blancos del miRNov223.

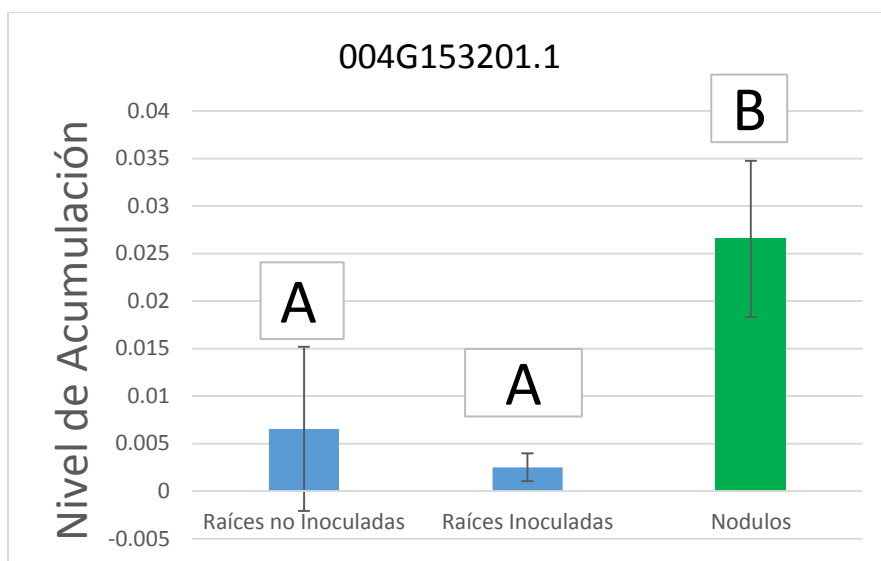


Figura 17. Acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov223 004G153201.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

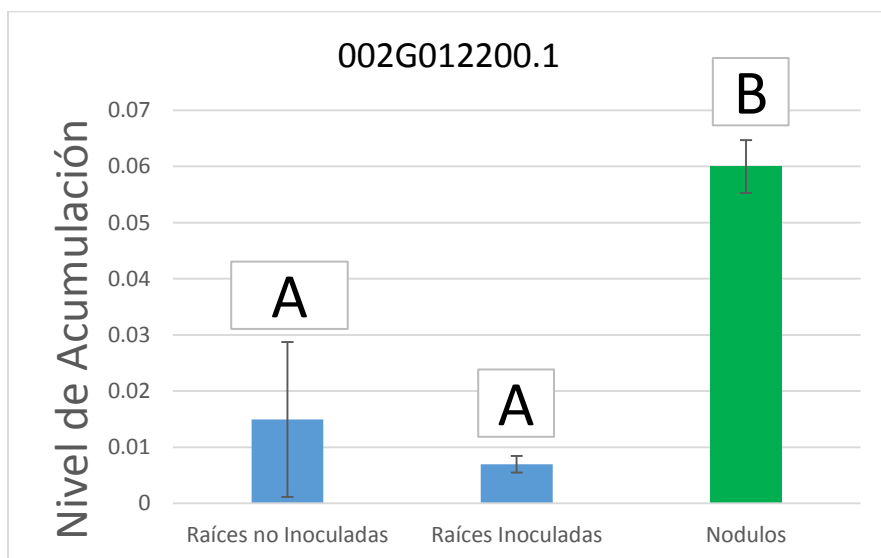


Figura 18. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov223 002G012200.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

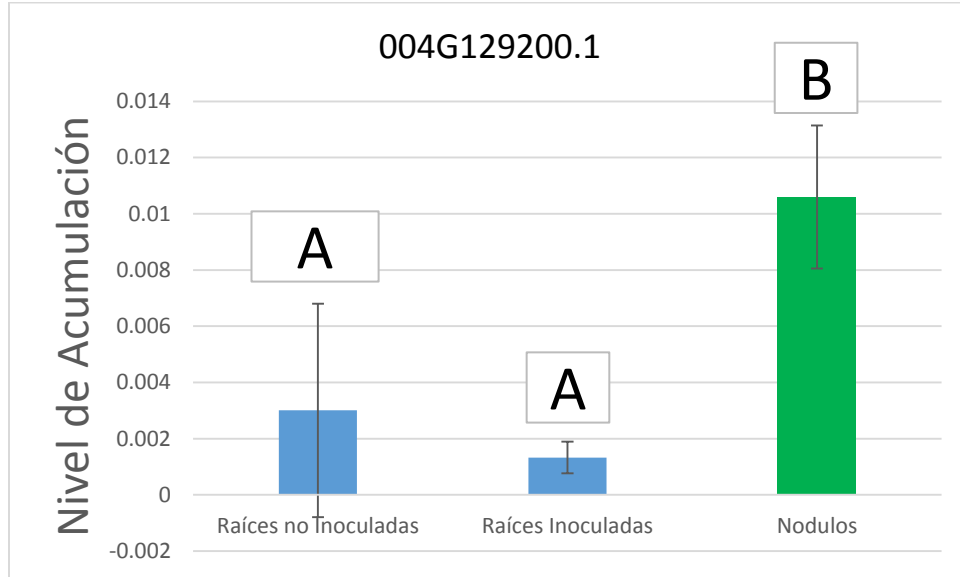


Figura 19. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov223 004G129200.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Por último, si observamos la figura 20, correspondiente al blanco candidato Phvul.003G256500.1, se puede apreciar que hay una acumulación mayor en raíces que en nódulos. Sin embargo, este perfil de acumulación, al contrario de los anteriormente analizados, es opuesto al patrón que esperamos.

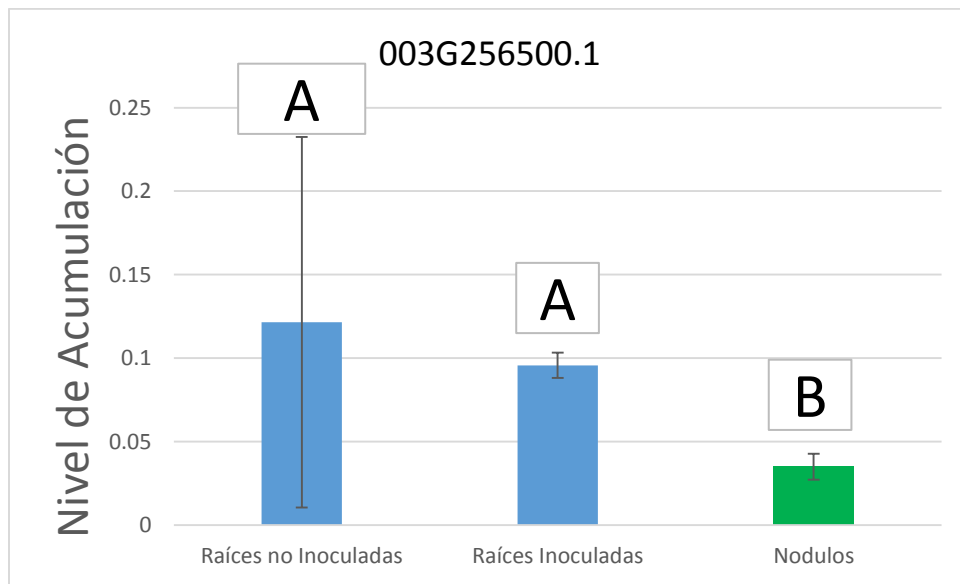


Figura 20. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov223 003G256500.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

8.3.3 Acumulación diferencial del miRNov270 y sus posibles blancos

Los resultados del nivel de acumulación del precursor del miRNov270, en las 3 diferentes condiciones, denotan que hay una diferencia significativa con mayor acumulación en las raíces tanto inoculadas como no inoculadas comparado a los nódulos según la prueba estadística de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis (Figura 21). Por otra parte, el nivel de acumulación relativa encontrado del miRNov270 maduro, muestran que, aunque hay ligeras diferencias entre las 3 diferentes muestras, estas no son significativas según la prueba estadística de comparaciones múltiples (Figura 22). Además, este nivel de acumulación relativa no es el esperado, ya que, se sabe que este microARN está más acumulado en raíces que en nódulos.

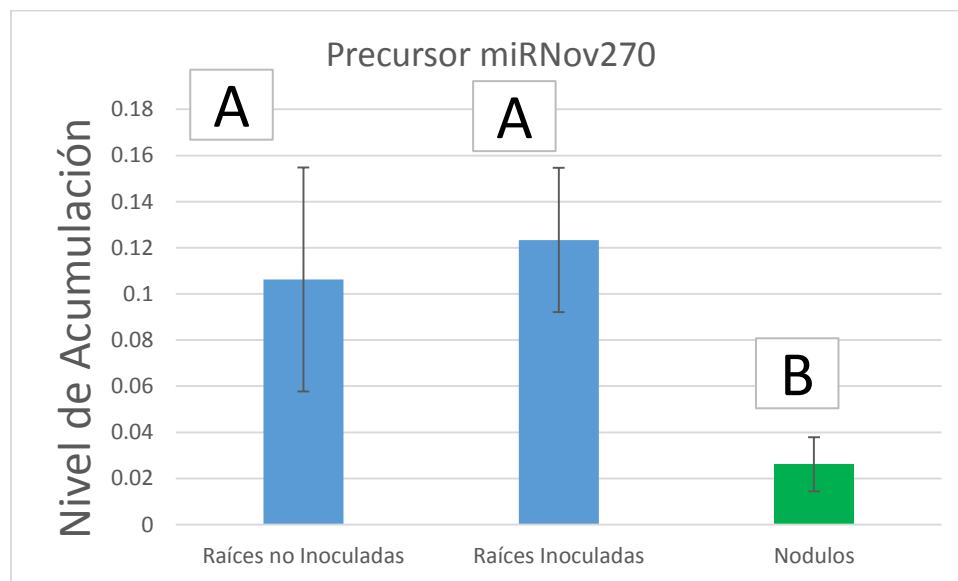


Figura 21. Nivel de acumulación relativa del precursor del miRNov270. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

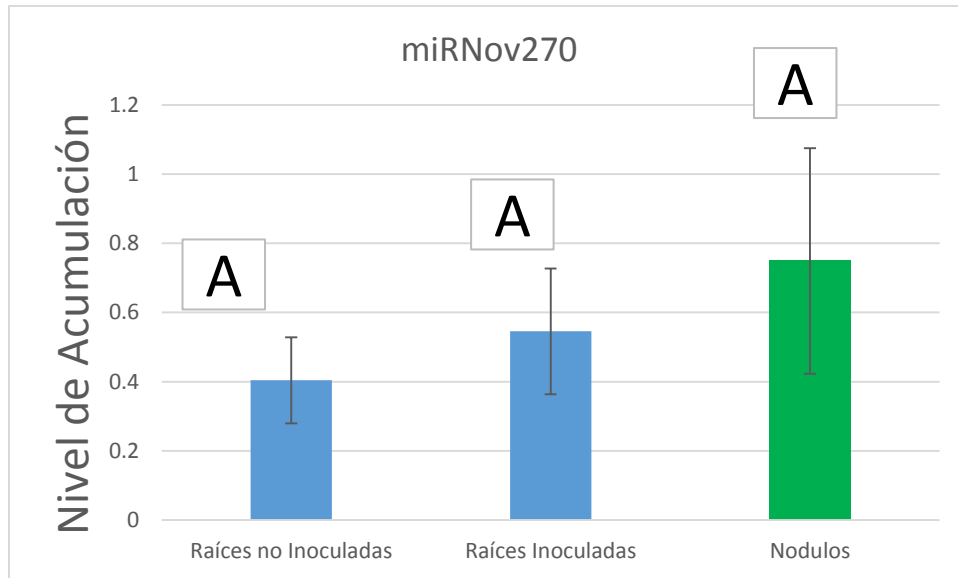


Figura 22. Nivel de acumulación relativa del miRNov270. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Por otro lado, si observamos los resultados representados en las figuras 23 y 24, correspondientes a los posibles blancos Phvul.011G115200.1 y Phvul.002G124500.1, respectivamente, podemos ver que, aunque se pudieran notar niveles de acumulación relativa diferentes, e inclusive el gen Phvul.011G115200 pudiera denotar un perfil parecido al esperado, esta diferencia no es significativa según la agrupación por la prueba estadística Kruskal-Wallis. Debido a esto, podemos eliminar como candidatos prioritarios a blancos ambos genes.

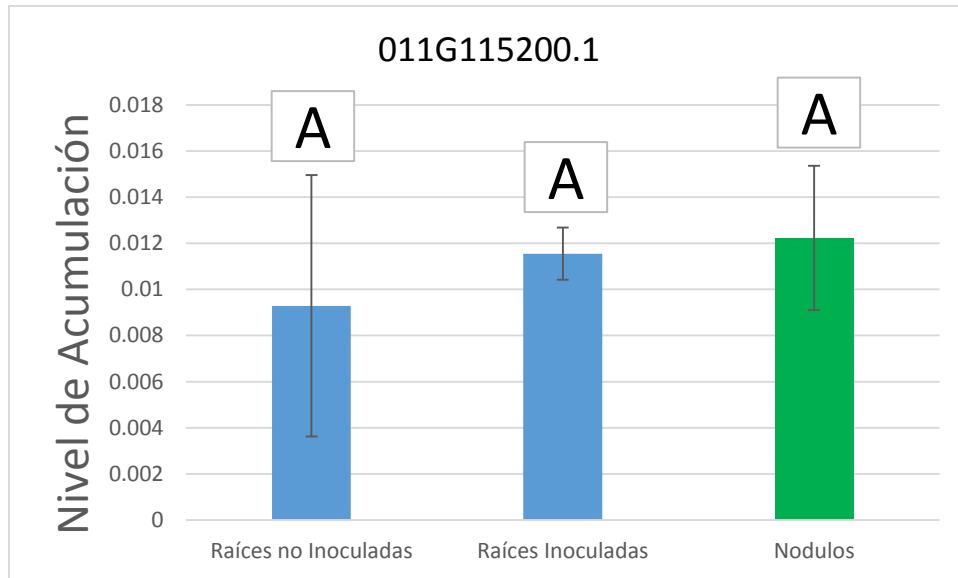


Figura 23. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov270 011G115200.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).



Figura 24. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov270 002G124500.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

Caso contrario, son los resultados que se observan en las figuras 25 y 26, correspondientes a los genes, Phvul.008G075700.1 y Phvul.008G227000.2, respectivamente. Se puede apreciar claramente que ambos transcritos tienen un nivel de acumulación relativa significativamente mayor en nódulos que en raíces.

Lo cual, cumple con el perfil esperado para considerarlos potenciales blancos del miRNov270.

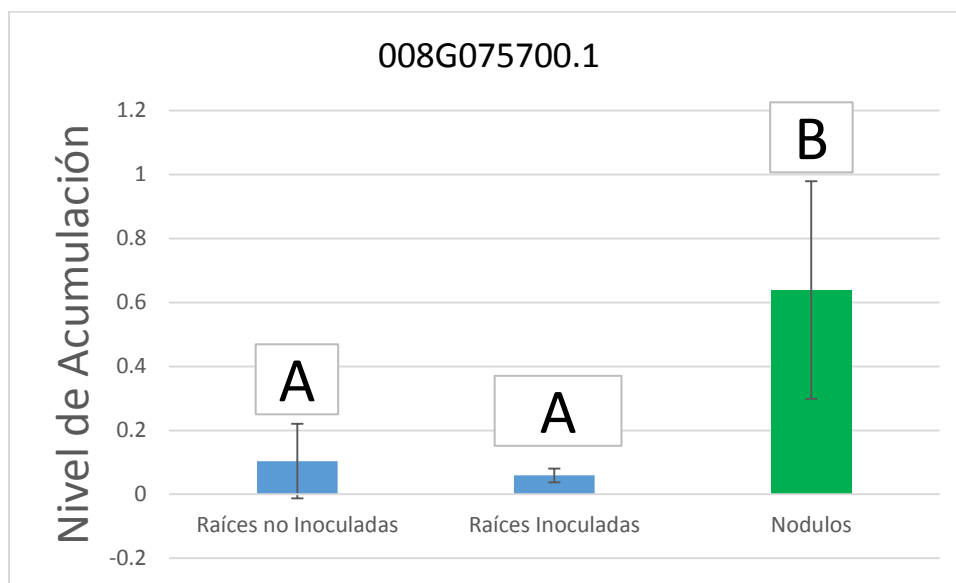


Figura 25. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov270 008G075700.1. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

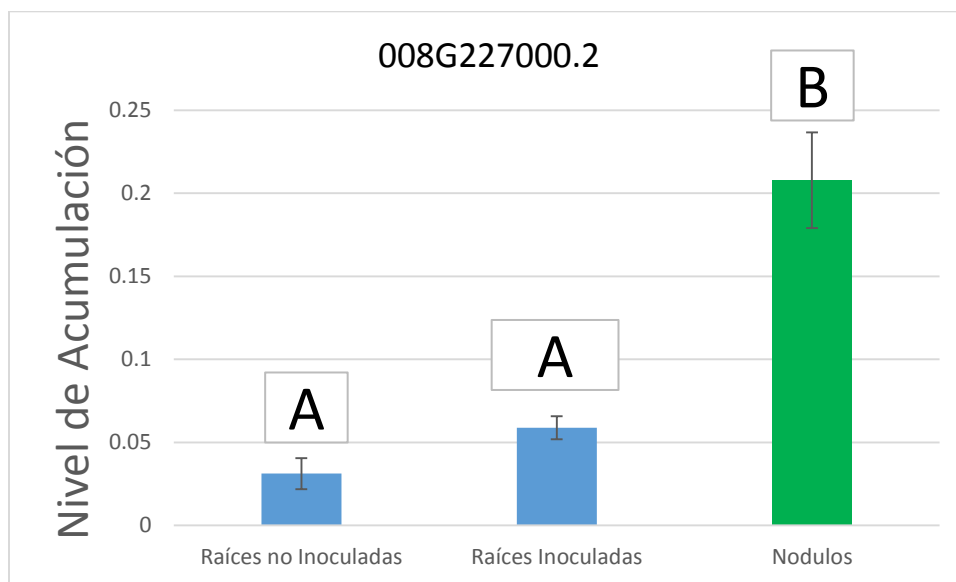


Figura 26. Nivel de acumulación relativa del candidato a blanco del miRNov270 008G227000.2. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Las diferentes letras arriba de los histogramas representan los grupos asignados según la prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$).

8.4 5'RACE

Se realizó la 5'RACE de los posibles blancos del miRNov223 Phvul.004G153201.1 (sin alguna descripción), Phvul.002G012200.1 (Proteína con dominio LOB) y el Phvul.004G129200.1 (Factor de Splicing). También de los posibles blancos pertenecientes al microARN miRNov270, Phvul.008G227000.2 (Fostasa/Fosfomonoesterasa) y el Phvul.008G075700.1 (ninguna de descripción). Así mismo, para validar la librería de RNA+adaptador generada con esta técnica en muestras de raíces de *Phaseolus vulgaris* G19833, se utilizó como control positivo el blanco APETALA2 (AP2), ya que, se ha reportado que este blanco es escindido por el microARN miR172 (Nova-Franco et al., 2015).

En las reacciones de PCR anidada realizadas, se logró amplificar un producto de aproximadamente 201 pb, lo cual concuerda con el tamaño esperado del amplicón final producto de la PCR anidada del control positivo AP2 (Figura 27). Este producto de PCR se clonó en el vector pJET 1.2 y posteriormente se secuenció para confirmar que se detecta el producto de degradación de AP2 inducido por el miRNov172. Derivado de esta secuenciación, las 3 secuencias enviadas presentaban la secuencia específica del sitio del corte que induce este microARN justo después de la secuencia del adaptador tal como se esperaba (figura 28). Por lo tanto, podemos confiar en que la técnica funcionó con nuestra librería.

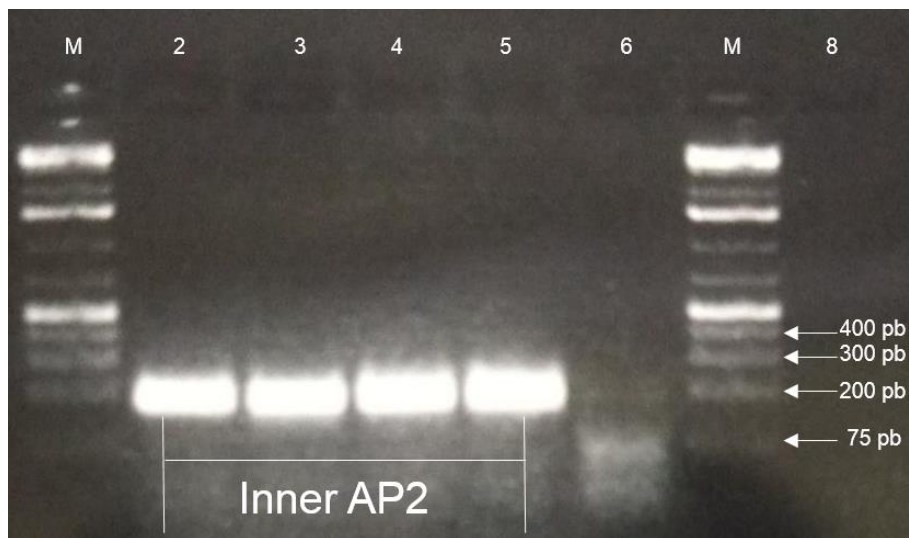


Figura 27. Visualización de los productos de amplificación inner de la 5'RACE del control positivo AP2. Carriles 2-5 amplificación inner de AP2 en gradiente de Tm 55°C, 57°C, 59°C, 61°C respectivamente; carril 6 control negativo. Carril M marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

Phvul.L000308.1 / APETALA 2

3/3



1465 5'- TTCTCTACTGCAGCATCATCAGGATTCTCAATTCAGCTACCTTT - 3' 1512
*| | | | | | | | | | | | | | | | *| | | | | |
UACGUCGUAGUAGUUCUAAGA

Figura 28. Sitios de corte encontrados (flecha) para el control positivo AP2. La interacción blanco-miRNA está ilustrada en la región amarilla, las hibridaciones complementarias entre bases están representadas por una línea mientras que los mismatches y gaps se muestran con estrellas. La acotación 3/3 significa el número total de clonas

Por otra parte, al realizar la PCR anidada del transcrito Phvul.002G012200.1 candidato blanco del miRNNov223, no se obtuvo el amplicón. Mientras que para los transcritos Phvul.004G129200.1 y Phvul.004G153201.1 se lograron obtener amplicones de aproximadamente 107 y 90 pb respectivamente (Figura 29). Esto concuerda con el tamaño esperado, por lo cual también los clonamos y enviamos a secuenciar. Sin embargo, no resultaron ser las secuencias amplificadas predichas del corte del miRNNov223.

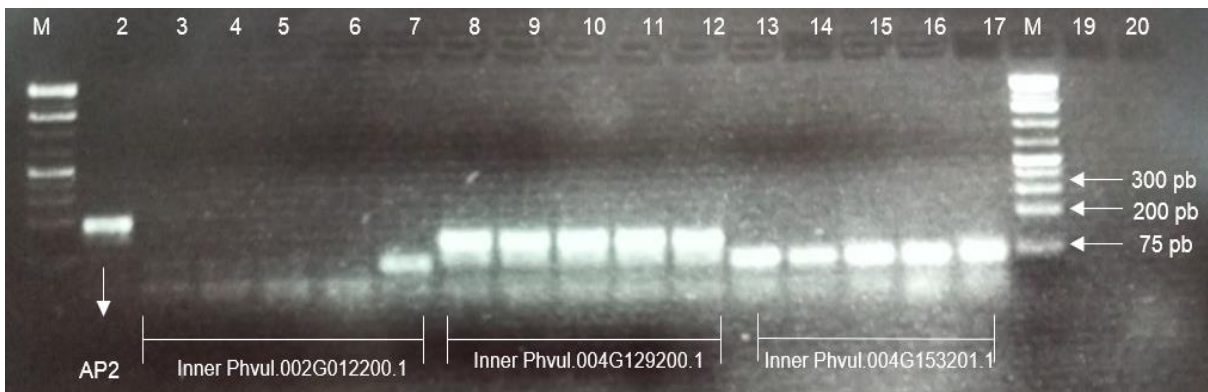


Figura 29. Visualización de los productos de amplificación inner de la 5'RACE de los blancos del miRNNov223. Carril 2 amplificación inner control positivo AP2. Carriles 3-7 amplificación inner de Phvul.002G012200.1; carriles 8-12 amplificación inner de Phvul.004G129200.1 y carriles 13-17 amplificación inner de Phvul.004G153201.1, todos en gradiente de Tm 55°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C respectivamente. Carril M marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

En el caso de la PCR anidada de los posibles blancos del miRNov270, no se lograron obtener amplicones (Figura 30) por lo cual no fue posible enviar a secuenciar ninguna muestra.

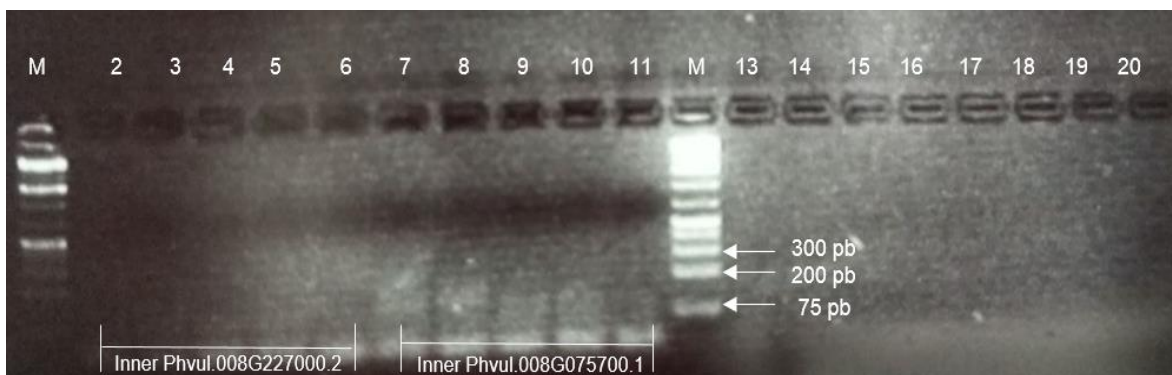


Figura 30. Visualización de los productos de la amplificación interno de la 5'RACE de los blancos del miRNov270. Carriles 2-6 amplificación interno de Phvul.008G227000.2; carriles 7-11 amplificación interno Phvul.008G075700.1; todos en gradiente de Tm 55°C, 57°C, 59°C, 61°C y 63°C respectivamente. Carril M marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

8.5. Agroinfiltración

Realizamos co-infiltraciones con las construcciones: con el fin de analizar el efecto del microARN sobre los transcritos blanco y de una construcción sobre la otra. Se espera que al co-infiltrar las construcciones haya una disminución de la expresión de la eCFP que se refleja en la disminución de la fluorescencia por la carencia de la proteína en las plantas coinfectadas con *Agrobacterium tumefaciens* transformada con la sobreexpresión del miRNov270 debido a la acción de represión de los mismos contra el sitio de unión de su blanco fusionado al mRNA de la proteína reportera.

Tabla 6. Elementos que conforman las construcciones

Construcción	Contenido de la construcción
EV	Es solamente el plásmido pTDTO vacío (véase figura 10).
OEmiRNov270	Construcción diseñada para sobreexpresar al microARN miRNov270. Contiene al plásmido pTDTO + precursor del miRNov270 y la proteína reportera dTOMATO.
ECFP	Construcción diseñada para

	<p>sobreexpresar al transcrito codificante de la proteína reportera ECFP.</p> <p>Contiene el plásmido pTDTO + transcrito codificante de la proteína ECFP y la proteína reportera dTOMATO.</p>
ECFP8G	<p>Construcción diseñada para sobreexpresar al transcrito codificante de la proteína reportera ECFP fusionado al sitio de unión del miRNov270 perteneciente al gen Phvul.8G070800.0.</p> <p>Contiene el plásmido pTDTO fusionado al sitio de unión del miRNov270 perteneciente al gen Phvul.8G070800.0 y la proteína dTOMATO.</p>

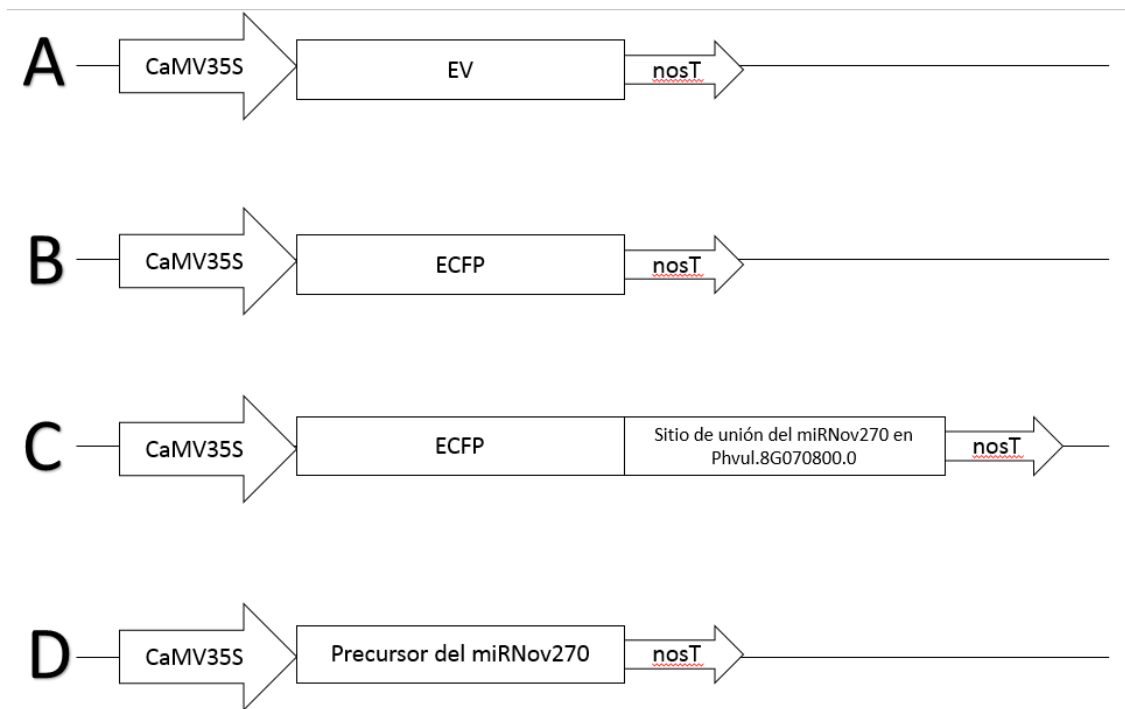


Figura 31. Representación esquemática de las diferentes construcciones usadas para la agroinfiltración, todas tienen río abajo un cassette de expresión del gen que codifica para la proteína dTomato (proteína reportera). Solo las construcciones B y C contienen una proteína reportera más llamada ECFP (cyan fluorescent protein). La construcción A es el vector vacío sin sitio de unión al microARN, ni la secuencia del precursor del microARN. La construcción B tiene solo ambas proteínas fluorescentes. La construcción C tiene ambas

proteínas más el sitio de unión del miRNov270 perteneciente al gen Phvul.8G070800.0. La construcción D (OEmiRNov270) tiene solo la proteína dTOMATO y el precursor del miRNov270. Todas las construcciones cuentan con el promotor fuerte CaMV35s y el terminador nosT.

Se transformaron 4 hojas de *Nicotiana benthamiana*, en 3 plantas, cada una con una co-infiltración diferente además de un control negativo el cual era una planta sin transformar. Esto permitió evaluar por triplicado el resultado de cada co-infiltración. Estas co-infiltraciones fueron las siguientes; EV (empty vector) + ECFP con el sitio de unión del microARN en Phvul.8G070800.0 (ECFP8G), OEmiRNov270 + ECFP sin sitio de unión del microARN y OEmiRNov270 + ECFP con el sitio de unión del microARN en Phvul.8G070800.0 (figura 31). Al excitar ambas proteínas reporteras (dTOMATO y eCFP), en sus respectivas longitudes de onda, en el control negativo (planta no infiltrada), no obtenemos señal alguna (Figura 32 A). Basado en este control, podemos dilucidar que al co-infiltrar las construcciones EV + ECFP8G y OEmiRNov270 + ECFP no hay efecto de una sobre la otra, pues se puede ver que el nivel de fluorescencia de las proteínas reporteras es el mismo (figuras 32 B y C). Al co-infiltrar las construcciones OEmiRNov270 + ECFP8G (la construcción que contiene el sitio de unión del miRNov270 en Phvul.8G070800.0), se observa un descenso en la intensidad de la fluorescencia de la proteína reportera eCFP en comparación a la de la proteína dTOMATO presente en la construcción OEmiRNov270 que contiene el precursor del microARN antes mencionado (Figura 32 D). Este resultado concuerda con lo esperado y significa que es probable que el miRNov270 este regulando a ECFP8G, ya que, este tiene afinidad por el sitio de unión perteneciente a Phvul.8G070800.0.

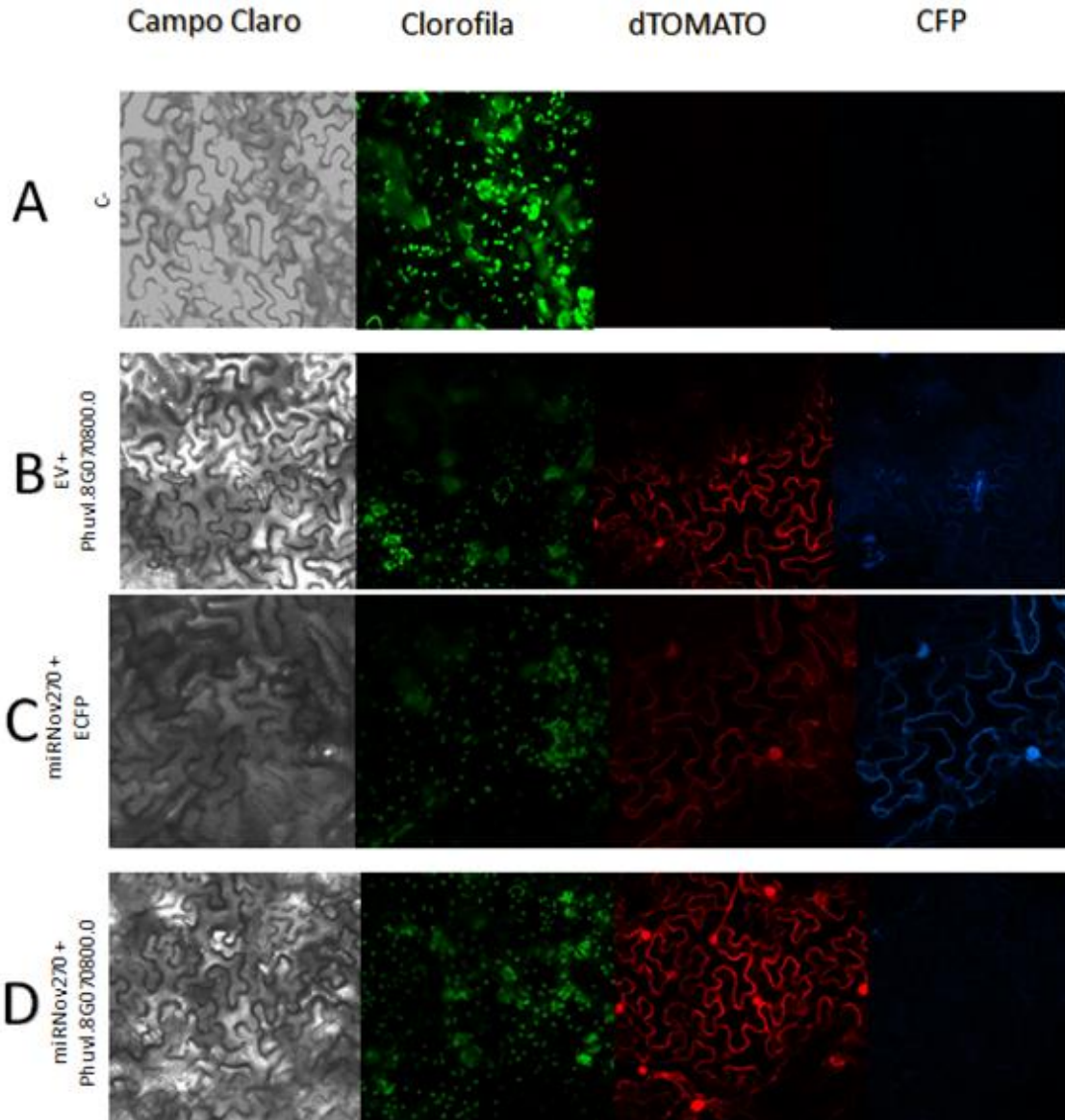


Figura 32. Análisis de la diferencia de fluorescencia entre eCFP y dTOMATO en las diferentes coinfiltraciones. Panel A; visualización del control negativo. Panel B; visualización de la coinfiltración de las construcciones EV + ECFP8G que solo contienen las proteínas reporteras. Panel C; visualización de la coinfiltración de las construcciones OEmiRNov270 + ECFP que solo contienen las proteínas reporteras. Panel D; visualización de la coinfiltración de las construcciones OEmiRNov270 + ECFP8G (la construcción que contiene el sitio de unión del miRNov270 en Phvul.8G070800.0).

9. Discusión

9.1. miRNov270

Antes de interpretar los resultados, nos aseguramos que podemos confiar en ellos gracias a que validamos nuestras muestras analizando la acumulación de genes marcadores de la nodulación como NIN2 y ENOD40 (grafica 1 y 2). Este perfil de

acumulación fue que están mayormente acumulados en nódulos que en raíces, lo que coincide con datos anteriormente reportados y nos indica que la respuesta transcriptómica en la nodulación ocurrió como se esperaba.

Después de esta confirmación, uno de los objetivos en este trabajo fue evaluar mediante qPCR la acumulación relativa de algunos posibles blancos del miRNov270, en condiciones donde este microARN se encuentre diferencialmente acumulado. Dicho objetivo se cumplió, ya que, aunque no logramos observar el perfil de acumulación esperado del miRNov270 maduro (mayormente acumulado en raíces que en nódulos), sí logramos observar la acumulación del precursor (grafica 9). Este resultado es igual de válido, ya que, se había observado que la acumulación de este precursor es idéntico al de su microARN. Gracias a estos resultados, confirmamos que se pueden cuantificar los ARNm en estas las muestras. De otro lado, es probable que haya un problema técnico para lograr una correcta amplificación de los ARN pequeños. Este problema puede deberse a diversos factores como, por ejemplo, que los ARN pequeños no precipitan bien y se requiera más tiempo de precipitación al momento de realizar la extracción de ARN total, o que la impureza de las muestras no permitiera la correcta función de la retrotranscriptasa. Suponemos también que el resultado de la RT-qPCR de los microARNs haya sido una amplificación de un artefacto formado entre los primers de la amplificación, ya que, en los datos de la qPCR, observamos que los CT correspondientes a los controles negativos estaban en el mismo rango que los CT de cada muestra.

Así mismo, al evaluar el perfil de acumulación de los cuatro blancos predichos para el miRNov270, observamos que los genes Phvul.008G227000.2 y Phvul.008G075700.1 cumplían con el nivel de acumulación esperado. Este perfil de acumulación fue que están mayormente acumulados en nódulos que en raíces, lo que es inverso al nivel de acumulación del miRNov270, el cual está mayormente acumulado en raíces que en nódulos. Esto nos permite validarlos como potenciales candidatos a blancos del miRNov270 y por lo tanto seleccionarlos para evaluarlos mediante la técnica de 5'RACE. Sin embargo, a causa de que no hay una descripción funcional para los posibles blancos, Phvul.008G227000.2 y Phvul.008G075700.1, no podemos extrapolar una hipótesis sobre el papel que estos transcritos podrían desarrollar durante la nodulación.

Al evaluar los potenciales candidatos a blancos predichos para el miRNov270 mediante la técnica de 5'RACE, no logramos obtener un amplicón por lo que no se pudo seguir con la metodología para obtener un resultado de secuenciación. Es importante

resaltar que para evaluar estos blancos también se utilizó la misma librería de ARN+Adaptador, en la cual si se logró amplificar y confirmar mediante secuenciación el sitio de corte del microARN miR172 en el control positivo AP2. Por lo tanto, suponemos que este resultado negativo puede deberse a que no funcionen los primers que diseñamos para cada candidato o que se requieran diferentes temperaturas de hibridación a las que fueron utilizadas (59°C y 61°C). También, está la posibilidad de que este microARN no regule estos transcritos mediante el mecanismo de degradación sino que simplemente se una e impida el paso del ribosoma siendo así que mediante la técnica de 5'RACE no podamos validarlo. Aunado a estas hipótesis, existe la probabilidad de que el miRNov270 no regula a estos blancos, por lo cual, no podremos visualizar productos de degradación.

Por otra parte, al evaluar los biosensores mediante la agroinfiltración, es altamente probable que el miRNov270 este regulando al posible blanco Phvul.8G070800. Mientras que en los controles no se observó una alteración de la acumulación de la proteína reportera eCFP, si observamos un descenso en la fluorescencia cuando el transcrito correspondiente estuvo fusionado al sitio de unión del miRNov270. Con este resultado, podemos fortalecer la hipótesis de que el miRNov270 este regulando al gen Phvul.8G070800. Este gen codifica para una proteína de tipo NB-LRR que son parte de una familia de proteínas de resistencia a patógenos ricas en leucinas y que contienen sitios de unión a nucleótidos. Se ha datado que estas proteínas están implicadas en procesos de defensa en plantas, además de un posible papel en la nodulación (Park & Shin, 2015). Aunado a esto, se tiene registro de que los transcritos codificantes por estas proteínas tienen regiones altamente conservadas que son sitios blancos de diversos microARN. Un ejemplo de esto es el miR482 que se une a estos transcritos para producir otro tipo de ARN pequeños secundarios y así regular el establecimiento de la nodulación, gracias a la regulación de la respuesta de defensa en leguminosas como *Medicago* o soya (Park & Shin, 2015; Zhai *et al.*, 2011). De igual forma, en *Phaseolus vulgaris*, el miRNov270 podría unirse al transcrito Phvul.8G070800 que codifica para una NB-LRR, produciendo o no otro tipo de ARN pequeños secundarios. Esto impediría la acumulación de la proteína y daría como consecuencia la disminución de la respuesta de defensa de la planta. Así mismo, una posible hipótesis de la función que podría llevar a cabo el miR270 en los nódulos, vía el control de la proteína NB-LRR, es que está regulando la respuesta de defensa de la planta contra la proliferación de los rizobios, para que no se vuelva una invasión, o contra otras bacterias que trataran de infectar el nódulo.

9.2. miRNov223

Uno de los objetivos en este trabajo fue evaluar mediante qPCR la acumulación relativa de algunos posibles blancos del miRNov223, en condiciones donde este microARN se encuentre diferencialmente acumulado. Los resultados nos permitieron obtener el perfil de acumulación esperado (más en raíces que en nódulos) tanto para el precursor como para el maduro del miRNov223 (grafica 3 y 4). Sin embargo, respecto al perfil observado para el microARN maduro, y basado en los problemas de cuantificación que ocurrieron con el miRNov270, es debatible que realmente observamos variaciones debidas a un fenómeno biológico, ya que en los datos de qPCR obtenidos para el miRNov223, también observamos que los CT correspondientes a los controles negativos estaban en el mismo rango que los CT de cada muestra. Por lo cual, no descartamos la posibilidad de que la amplificación del miRNov223 que hubo en nuestras muestras haya sido de un artefacto formado entre los primers de la amplificación. Sin embargo, podemos confiar en el perfil de acumulación observado para el precursor de este microARN, ya que, las muestras utilizadas para la RT-qPCR fueron las que logramos validar mediante la amplificación de los genes marcadores de la nodulación NIN2 y ENOD40.

Al evaluar el perfil de acumulación de los blancos predichos para el miRNov223 observamos que los genes Phvul.002G012200.1, Phvul.004G153201.1 y Phvul.004G129200.1 cumplían con el nivel de acumulación esperado en los nódulos y menor en las raíces, lo que es inverso al nivel de acumulación del miRNov223 en raíces que en nódulos. Esto nos permite validarlos como potenciales candidatos a blancos del miRNov223 y por lo tanto seleccionarlos para evaluarlos mediante la técnica de 5'RACE.

Por otra parte, al evaluar mediante la técnica de 5'RACE los posibles blancos seleccionados para el miRNov223, no fue posible lograr obtener un producto de PCR final para el gen Phvul.002G012200.1 (Proteína con dominio LOB). Sin embargo, se lograron obtener amplicones para los genes Phvul.004G153201.1 (sin función descrita) y Phvul.004G129200.1 (Factor de Splicing). Desafortunadamente, al analizar las secuencias de estos productos de PCR, no se obtuvo la validación del corte del miRNov223 en la secuencia. Este resultado puede deberse a distintos factores, uno de ellos puede deberse a que los primers diseñados no funcionen o que requieran de diferentes temperaturas de hibridación a las utilizadas (59°C y 61°C). También, los microARNs pueden regular a su blanco de dos maneras, por degradación o simplemente impidiendo que pase el ribosoma. De esta manera, como la tecnica de 5'RACE se basa

en intentar observar el producto de degradación, si el microARN no regula a su blanco mediante la escisión de este, no será posible verlo mediante esta técnica y por lo tanto nunca lograremos obtener un producto de PCR. Así mismo, es importante resaltar que sabemos que la técnica utilizada y la librería de ARN+Adaptador generada funcionan, ya que antes de analizar los posibles blancos en las muestras, se utilizó como control positivo, el transcrito del gen AP2, el cual se logró amplificar y secuenciar, confirmando así que estos productos de degradación son generados por el corte de su microARN regulador, el miR172.

Aunque los resultados obtenidos de la técnica 5'RACE no brindaron información relevante acerca de los posibles candidatos antes mencionados del miRNov223. No podemos descartarlos como candidatos prioritarios, pues el perfil de acumulación y la descripción funcional de algunos de estos candidatos los hace interesantes. Tal es el caso del gen Phvul.002G012200.1, el cual codifica para una proteína LOB. Estas proteínas son reguladoras del crecimiento de órganos laterales en las plantas (Xu *et al.*, 2016). Se ha datado que estas proteínas LOB están implicadas en el desarrollo inicial del nódulo que es un órgano lateral (Godiard *et al.*, 2011; Schiessl *et al.*, 2019). Por lo tanto, tendría sentido que dicho transcrito este siendo regulado por el miRNov223 de manera en que la acumulación del miRNov223 baja en los nódulos y, como consecuencia, la acumulación del transcrito que codifica para la proteína LOB aumenta en este mismo tejido. La presencia de esta proteína pudiera entonces promover el crecimiento del nódulo, lo que permitirá tener un órgano donde resguardar a las bacterias con las mejores condiciones.

10. Conclusión

En el presente trabajo, logramos establecer una lista de posibles blancos para cada microARN (miRNov223 y miRNov270). Para ambos microARNs se seleccionaron 4 posibles blancos. También, logré evaluar mediante RT-qPCR el nivel de acumulación relativa de los blancos predichos del miRNov223 y miRNov270 en condiciones donde estos microARN están diferencialmente acumulados. De los resultados obtenidos de este análisis, realicé un escrutinio y seleccione como potenciales candidatos a blancos, los genes presentaran el perfil de acumulación esperado (más en raíces que en nódulos). Derivado de este escrutinio seleccioné para el miRNov223 tres de los cuatro genes analizados. En el caso del miRNov270 seleccioné los dos de los cuatro transcritos analizados. Así mismo, ya realizada la selección de blancos para cada microARN según el perfil de acumulación que presento cada posible blanco, logré evaluar mediante la

técnica de 5'RACE cada blanco. Como resultado, no logramos validar ningún blanco seleccionado para cada microARN. Sin embargo, logré implementar en el laboratorio correctamente un nuevo protocolo para la técnica de 5'RACE al mostrar resultados positivos con nuestro control AP2. Al final, logré validar un blanco para el miRNov270, el cual codifica para una proteína NB-LRR, mediante la técnica de biosensores. Gracias a este trabajo, se tienen nuevos potenciales candidatos a blancos para analizar de cada microARN, lo cual podría contribuir al descubrimiento de nuevos genes involucrados en la nodulación.

11. Perspectivas

- Diseñar y realizar biosensores tanto para los posibles blancos (Phvul.004G153201.1, Phvul.002G012200. y 1 Phvul.004G129200.1) del miRNov223 como para los del miRNov270 (Phvul.008G227000.2 y Phvul.008G075700.1).
- Analizar funcionalmente el papel del miRNov223 y la proteína LOB en la regulación de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli* y evaluar la probabilidad de que el transcrito Phvul.002G012200.1 sea un blanco genuino de este microARN.

12. Anexos

10.1. Anexo 1

Ambion

Nota:

- a. No dejar que la columna se seque.
- b. No tocar la membrana del filtro.
- c. Guardar los tubos en hielo hasta el paso de fenol/cloroformo.
- d. Usar 100mg de tejido molido (usar más de 100mg podría saturar la columna) en un tubo de 2 ml.
- e. Realizar todas las centrifugaciones a 10.000 g a temperatura ambiente.

1. Pre-calentar RNase-free water o Elution Solution a 95°C. Dejar a temperatura ambiente el EtOH 100%, la Wash Solution 1 y Wash solution 2/3. Revisar que las soluciones Wash Solution 1 y Wash solution 2/3 no tengan cristales y agitar para homogenizar la solución.
2. Poner 900µl de Lysis/Binding Buffer y 90 µl miRNA Homogenate Additive dentro del tubo que contiene el tejido molido (raíz y nódulos).
3. Vortexear para homogenizar la mezcla e incubar 10 minutos en hielo.
4. Añadir 900µl de acid-Phenol Cloroformo frío (pipetear la fase inferior) y vortexear por 30 o 60 segundos.
5. Centrifugar 5 min y checar si la interfase esta compacta. Si esto no ocurre, repetir la centrifugación.
6. Transferir 800µl de la fase superior sin perturbar la interfase dentro de un tubo nuevo de 2 ml.
7. Añadir 1.25 de volumen de etanol 100% a temperatura ambiente (1ml) y mezclar pipeteando cuidadosamente.
8. Por cada muestra, poner una columna sobre uno de los tubos suministrados por el kit y transferir 650µl de la mezcla. (hasta 700µl. El total de mezcla pasa en tres aplicaciones).
9. Centrifugar por 15 segundos y descartar el sobrenadante. Repetir hasta que toda la mezcla pase a través del filtro de la columna.
10. Aplicar 700µl de Wash Solution 1 y centrifugar 5-10 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilizar el mismo tubo.
11. Aplicar 500µl de Wash Solution 2/3 y centrifugar 5-10 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilizar el mismo tubo.
12. Repetir el paso 11.
13. Descartar el sobrenadante, reutilizar la columna en el mismo tubo y centrifugar por 1 minuto para remover los fluidos residuales del filtro.
14. Transferir la columna sobre un tubo nuevo del kit. Aplicar 100µl Nuclease Free Water pre-calentado (95°C) en el centro del filtro y cerrar bien el tubo. Centrifugar por 20-30 segundos.
15. Recoger la muestra (la cual contiene el ARN) y almacenar a 20°C.

16. Cuantificación por nanodrop: Alrededor 200-300 ng/μl de tejido de raíz y alrededor de 300-500 ng/μl de tejido de nódulos.

1. Agregar 500 μl de Wash Solution. Centrifugar por 60 segundos, y descartar sobrenadante.
2. Repetir el paso anterior.
3. Precalentar 50μl agua milli Q a 70° en el termoblock.
4. Centrifugar 1 min al vacío para quitar residuos.
5. Pasar la columna a un nuevo tubo de 1.5ml.
6. Agregar 50 μl de agua mQ.
7. Medir concentración de ADN al nanodrop.
8. Almacenar a -20°.

10.2. Anexo 2

Quick Start Protocol QIAGEN

Antes de comenzar:

1. Es recomendable tener 125-250ng de ARN total por muestra.
2. Preparar la reacción de ligación a temperatura ambiente.
3. Preparar la reacción de retrotranscripción en hielo
4. Transferir exactamente 4μl del producto de ligación en la reacción de retrotranscripción.
5. No vortexear el templado de ARN ni ningún otro componente del kit.

Protocolo

1. Descongelar el templado de RNA en hielo. Descongelar RNase free Water, 10X miScript Ligation Buffer, 10X miScript Plant Adaptor, y 2x miScript Ligation Activator a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar brevemente cada tubo.

Nota: Retirar miScript Plant RNA Ligase del congelador justo antes de usar, y colocar en hielo.

2. Preparar la reacción de ligación a temperatura ambiente de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 7. Componentes de la reacción de ligación.

Componente	Volumen
10x miScript Ligation Buffer	2µl
10x miScript Plant Adaptor	2µl
RNase-Free Water	Variable
miScript Plant RNA Ligase	1µl
RNA Template (añadir en el paso 3)	Variable
2x miScript Ligation Activator (Añadir en el paso 4)	10µl
Volumen final	20µl

3. Añadir apropiadamente la cantidad de ARN total.
4. Despacio añadir 2x miScript Ligation Activator. Mezclar toda la reacción realizando pipeteo hacia arriba y hacia abajo 12 veces y centrifugar brevemente.
5. Incubar por 1 hora a 16°C, después 20 minutos a 65°C, finalmente a 4°C.
6. Descongelar el 5X miScript Plant RT Buffer y el 10x miScript Plant RT Nucleics a temperatura ambiente. Centrifugar brevemente.
Nota: Retire miScript Plant Reverse Transcriptase del congelador justo antes de usar, y colocar en hielo.
7. Dejar la reacción de ligación a temperatura ambiente por 2 minutos. Pipetear hacia arriba y hacia abajo 12 veces y centrifugar brevemente.
8. Preparar la reacción de retrotranscripción en hielo de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la reacción de retrotranscripción.

Componente	Volumen
5x miScript Plant TR Buffer	4µl
10x miScript Plant RT Nucleics	2µl
RNase Free Water	9µl
miScript Plants Reverse Transcriptase	1µl
Ligation Product (añadir en el paso 9)	4µl
Volumen final	20µl

9. Añadir 4µl del producto de ligación del paso 7 a cada tubo que contenga el mix de la reacción de retrotranscripción. Mezclar toda la reacción realizando pipeteo hacia arriba y hacia abajo 8 veces y centrifugar brevemente. No añadir más de 4µl del producto de ligación.
10. Incubar por 2 horas a 37°C, después 5 minutos a 95°C, finalmente a 4°C.
11. Diluir el ADN complementario a 1:40.

10.3. Anexo 3

Ambion

Antes de iniciar realizar una extracción de ARN total con las muestras de raíces con nódulos (Anexo 17).

Realizar el protocolo desde la ligación, evitando los pasos CIP y TAP.

1. Realizar la ligación con los siguientes componentes.

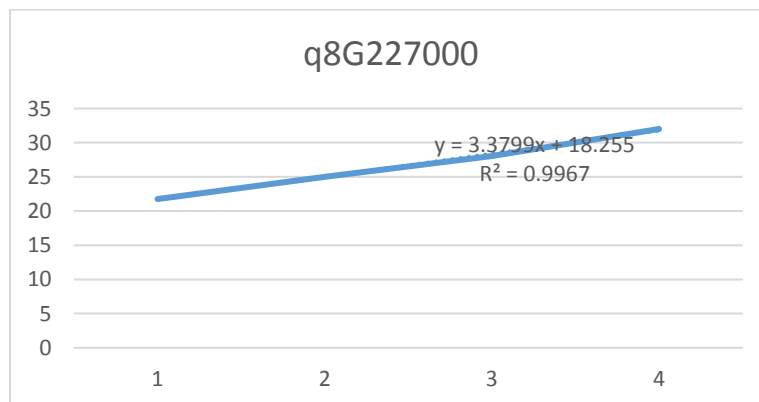
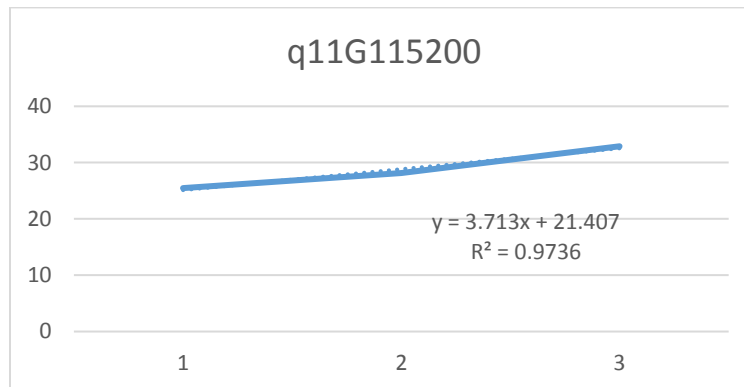
Componente	Volumen
RNA	6µl
5'RACE adapter	1µl
10X RNA ligase Buffer	1µl
T4 RNA ligase	2µl
Volumen final	10µl

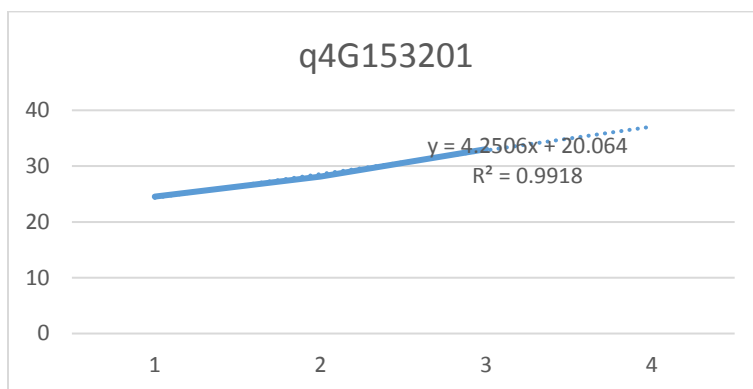
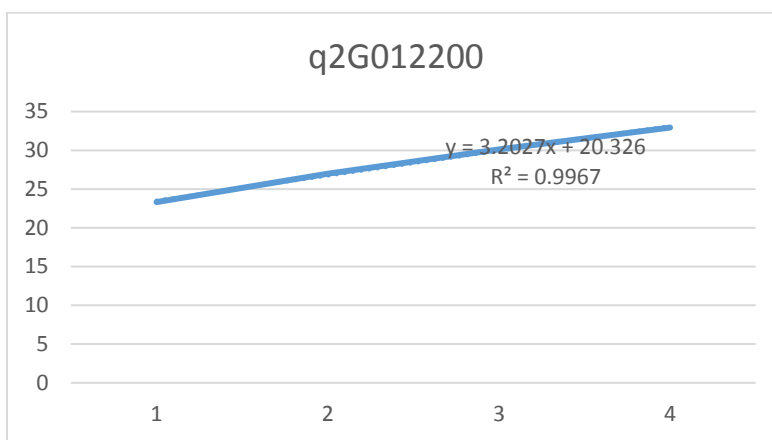
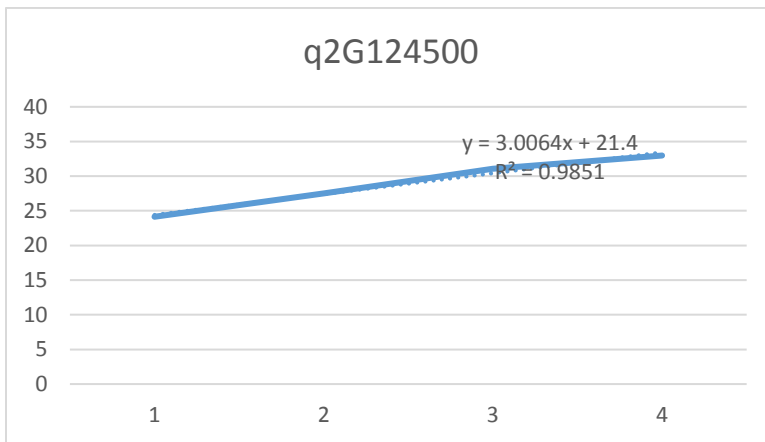
2. Incubar a 37°C por una hora.
3. Después realizar el paso de retrotranscripción.

Componente	Volumen
Ligated RNA	2µl
dNTP Mix	4µl
Random decamers	2µl
10xRTbuffer	2µl
RNase inhibitor	1µl
M.MLV	1µl
Free water nuclease	8µl
Volumen final	20µl

4. Incubar a 42°C por una hora.
5. Realizar PCR de los primers externo, utilizando el forward del kit 5' RACE Externo Primer y el reverse específico. Se utiliza el ADNc obtenido de la reacción de retrotranscripción.
6. Despues realizar PCR de los primers interno, utilizando el forward del kit 5' RACE Interno Primer y el reverse específico. Se utiliza como templado el producto de PCR del externo.
7. Realizar electroforesis de los productos de PCR externo e interno y verificar mediante un gel de agarosa el tamaño de las amplificaciones.
8. Realizar clonación (Anexo 4).

10.4. Anexo 4





Aquí podemos observar, todas las curvas de dilución correspondiente a cada pareja de oligonucleótidos diseñada. Así mismo, en la gráfica podemos observar la pendiente, valor necesario para calcular la eficiencia de los oligonucleótidos.

11. REFERENCIAS

- Aparicio-Fabre, R., Guillén, G., Loredó, M., Arellano, J., Valdés-López, O., Ramírez, M., ... Hernández, G. (2013). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) PvTIFY orchestrates global changes in transcript profile response to jasmonate and phosphorus deficiency. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-26>
- Baulcombe, D. (2004). Baulcombe 2004 nature miRNAs, 431(September).
- Borges, F., Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
- Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x>
- Formey, D., Iñiguez, L. P., Peláez, P., Li, Y. F., Sunkar, R., Sánchez, F., ... Hernández, G. (2015). Genome-wide identification of the *Phaseolus vulgaris* sRNAome using small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics*,

16(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1639-5>

Godiard, L., Lepage, A., Moreau, S., Laporte, D., Verdenaud, M., Timmers, T., & Gamas, P. (2011). MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in medicago truncatula nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges. *New Phytologist*, 191(2), 391–404. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03718.x>

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2014). Update on Legume Utilization Legumes : Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131(March), 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004.872>

Iwakawa, H. oki, & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 651–665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>

Lelandais-Brière, C., Moreau, J., Hartmann, C., & Crespi, M. (2016). Noncoding RNAs, Emerging Regulators in Root Endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(3), 170–180. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0240-FI>

Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. (2013). Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, (77), 1–9. <https://doi.org/10.3791/50521>

Liang, Y., Tóth, K., Cao, Y., Tanaka, K., Espinoza, C., & Stacey, G. (2014). Lipochitooligosaccharide recognition: an ancient story. *The New Phytologist*, 204(2), 289–296. <https://doi.org/10.1111/nph.12898>

Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J. (2014). Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a Nicotiana benthamiana Quantitative Transient Assay. *The Plant Cell*, 26(2), 741–753. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120972>

Martínez, F., Ojeda, D., Hernández, A., Martínez, J., & De la O, G. (2011). El exceso de nitratos: un problema actual en la agricultura. *Universidad*

Autónoma de Chihuahua, 11–16. Retrieved from
http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2011/08/18/el_exceso_de_nitratos_un_problema_actual_en_la_agricultura.pdf

Nova-Franco, B., Íñiguez, L. P., Valdés-López, O., Alvarado-Affantranger, X., Leija, A., Fuentes, S. I., ... Hernández, G. (2015). The Micro-RNA172c-APETALA2-1 Node as a Key Regulator of the Common Bean- *Rhizobium etli* Nitrogen Fixation Symbiosis. *Plant Physiology*, *168*(1), 273–291.

<https://doi.org/10.1104/pp.114.255547>

Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

Park, J. H., & Shin, C. (2015). The role of plant small RNAs in NB-LRR regulation. *Briefings in Functional Genomics*, *14*(4), 268–274.

<https://doi.org/10.1093/bfgp/elv006>

Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, *25*(7), 2383–2399.

<https://doi.org/10.1105/tpc.113.113159>

Rourke, O., Rourke, J. A. O., Iniguez, L. P., Fu, F., Bucciarelli, B., Miller, S. S., ... Vance, C. P. (2014). An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean, *15*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866>

Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., ... Oldroyd, G. E. D. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Current Biology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.005>

Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., ... Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, *46*(7), 707–713.

<https://doi.org/10.1038/ng.3008>

- Simon, S. A., Meyers, B. C., & Sherrier, D. J. (2009). MicroRNAs in the Rhizobia Legume Symbiosis. *Plant Physiology*, 151(3), 1002–1008. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144345>
- Tegeder, M. (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1865–1878. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru012>
- Varona, M. M., Estrada, D. P., Rancaño, C., Novo, M. F., & Cotarelo, N. (2014). Determinación del ciclo de nitrógeno en diferentes aguas utilizadas para el consumo humano DETERMINATION OF THE NITROGEN CYCLE IN DIFFERENT WATERS USED FOR, 14(3), 1213–1217.
- Venkateshwaran, M., Volkening, J. D., Sussman, M. R., & Ané, J. M. (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.11.007>
- Wang, C., & Fang, J. (2015). Small Non-Coding RNAs, 1296. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2547-6>
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology*, 14(3), 334–342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- Werner, G. D. A., Cornwell, W. K., Cornelissen, J. H. C., & Kiers, E. T. (2015). Evolutionary signals of symbiotic persistence in the legume–rhizobia mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10262–10269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424030112>
- Xu, C., Luo, F., & Hochholdinger, F. (2016). LOB Domain Proteins: Beyond Lateral Organ Boundaries. *Trends in Plant Science*, 21(2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.010>
- Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytologist*, 216(4), 1002–1017. <https://doi.org/10.1111/nph.14834>
- Zhai, J., Jeong, D. H., de Paoli, E., Park, S., Rosen, B. D., Li, Y., ... Meyers, B. C.

(2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes and Development*, 25(23), 2540–2553. <https://doi.org/10.1101/gad.177527.111>



Cuernavaca, Morelos a 5 de febrero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Javier Rodríguez Hernández**, con el título del trabajo: **IDENTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS REGULADOS POR miRNov270 y miRNov223 EN EL MODELO *Phaseolus vulgaris* ASOCIADO CON *Rhizobium etli*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

VOCAL: DR. DAMIEN FORMEY DE SAINT LOUVENT

SUPLENTE: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

SUPLENTE: DR. ALEXANDRE TROMAS



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAMIEN JEAN RENÉ FORMEY DE SAINT LOUVENT | Fecha:2021-02-05 11:52:21 | Firmante
 TW7+MzTdVfKbadmqL+8K3AEaJd9vlyYFh+xcAnisoNkEp7hCAf9diA4rFee4FdTd1JWXJLsivYkPvEYUuhFqg3bq6q4Th7oOhw54+K67RNEntCGE6dD3UMI5dBCLCIXop/B
 LYLfubhn3QdeDDIESE4uxuBJ4NoG1hzJB8O9r3W2Dw9+QKNCdtcQXU97T2jx+PM6HTXQ1gNidAabUBETXUxMn2DlwT1CIBAvRj5Ue4+0o95ida7a4FR1fQvrg68BAqu5yl/
 kZjdnWc9MxADQVvyCXIsvQDEke0L39wYK3mdyKPUJ9EQaCAMWj16BG4guOtyUUA==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2021-02-05 12:24:52 | Firmante
 f4XnL54GDu+GIE1FNeUGwPckbbo594axO9[bVtE4GAH8SyPq251UIG9kgUelpP6PzypUEQZi59dM5fJZenJrUwpfjq2P6kPoQMdqPEeXNFK3YgOleDzySuGMWb5XhMD]1HJ
 4aCPpEGg92nM3HO4t2bnzb4TrA1cys3uhhKjlpLpuFrshw1Vx1tn8DZ4jn48Yv+DqydXRW794PEQF1G+IWC0AEzZieIQ20JvJwvhexK6G4PmRnrvfygzx5r+xOmTIBLhX69o
 sdvW9DZXUia8dB2vLG3RvctLBHsiQL2Iwgt9WbefUpWrwqKaNDme8nwCdt3MMQ==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-02-05 12:38:20 | Firmante
 EdZmF9pFavOWdn5wAFomRi6HqjFT3bDGyYmVu2J4kVwq1U4uvodqAPBzbxAJJ2C9KAoFOWuZCB1H8LIKJfDqROPV878TuFGmbyLs1OdOIFQeMvlgVsv/KC7YvZE3ePJ
 GdzEAnXTBUB8KVAFDkGjgefA5r3pJUMjSjXpguO58VvYXYNYUP8VNMe++89X33MK3vI0zvlAnBn2Pg+Q99oQ2YwL7RJ9O6vMj7W5eBtL4caeE2fAD8n8oWmid1v9hvcAQD
 hJbTy8NR9GhhjFV114992HxLBfipUnj3OqcsT0siDh6bNRqOUw6QH5xbJkyccgCryR9vPQ==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2021-02-08 16:58:14 | Firmante
 bq7UoAIDEODzczhLqDLFCk6aU0Hu1qWl2g9Ncg3PyLITRY8juFjIlyKHheBNL4PyY00x9xPWvdaRZlpSorkxBkUaFaryAit7MhVXoHEDtoRH34fHBBbza7AJLBKYANhGkq+
 BzUOxmMUPHNhVpNuWVWESR9GzoQ5mZTUSdE7yQFRIGSPQEU NdpLZstVm6wA7ev8XFEvFRFKoZLYUg34IABO3im1CIP2wRcmXUoeEtlwzo6UCsWwaqPEVWUeIE3v
 QjUJGzqMKLxQda593vb9Mmas5PFLKtI680mNae75QYTM71J9WxnB4dVFFXGkHZ9OGPg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
 escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zLVTvs

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/04H880TZN9Zz1WES0YmF8Q2TuOGIqjV>