

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



B02008327

Identificación de microRNAs improntados genómicamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ARLET YAJAIRA ESTEVEZ SALCEDO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Marzo 2012



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-059/2012

**C. ARLET YAJAIRA ESTEVEZ SALCEDO
PRESENTE**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **Tesis**, con el título "**Identificación de microRNAs improntados genómicamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana***", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dr. Iain Searle** y asesor a la **Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac. Zapopan, Jal., 02 de marzo, del 2012.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis con el título: "Identificación de microRNAs improntados genómicamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*" que realizó la pasante Arlet Yajaira Estevez Salcedo con número de código B02008327, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

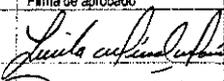
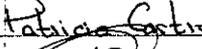
Atentamente
 Zapopan, Jalisco, 06 de marzo de 2012



Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre
 Asesora

I S E

Dr. Iain Searle
 Director del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Lucila Méndez Morán		7 Mayo 2012
Dra. Luz Patricia Castro Félix		7 Mayo 2012
Dr. Ramón Reynoso Orozco		7/May/2012
Supl. Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre		7 /03/2012


 7/03/2012

Dedicatoria:

A mi padre.

Es usted:

... mis días de trabajo en días feriados

... mis regresos a la lucha cuando yo ya había claudicado

... los experimento hechos a las 2 de la mañana

... lo que me mantiene despierta cuando el café ya no es suficiente

... lo que me hace repetir un experimento una vez tras otra, hasta que salga

... lo que haya de extraordinario en mí.

A mi madre.

Todo lo conseguido y por conseguir, todo lo soñado, todo lo vivido, todo lo gozado, toda la cerveza del universo, todos los cuentos de Oscar Wilde, todas las tortillas de harina, ante usted todo se convierte en nada todo se convierte en nada, sin usted yo no quiero nada.

A ambos:

De entre todas las recompensas que existen, ni las becas, ni mi ego crecido, ni tantos sueños alcanzados, ni los viajes por el mundo, se pueden comparar a lo que provocan en mí las sonrisas que les cuelgo.

“Como te puedo pagar todo lo que haces por mí,
Todo lo feliz que soy y todo este grande amor”

Agradecimientos:

Al Dr. Iain Searle por la confianza para darme éste proyecto, por su apoyo, por su paciencia, por ser un amigo a la par de un director de trabajo, pero más que nada por aguantar todas mis fallas burocráticas , que no es cualquier cosa y lo sabe quien me conoce.

A la Australian National University por todo el apoyo recibido, por su excelencia académica, por todos mis nuevos amigos y nuevas oportunidades que me brindó.

A mi asesora interna Dra. Anne Santerre: por el respaldo, por el tiempo, por el gran esfuerzo, no fue fácil y lo tengo muy presente.

A mis sinodales Dra. Paty Castro, Dra. Lucila Méndez y Dr. Ramón Reynoso: corregir una tesis traducida no es una labor sencilla, no en sencillo hacerlo tampoco en premura de tiempos.

A la Universidad de Guadalajara: a pesar de los altibajos burocráticos, el día más importante en mi vida académica fue cuando fui aceptada en ésta institución, y en sus pasillos quedaron los mejores años de mi vida, yo solo critico lo que amo, Leona negra toda la vida.

Muchas gracias.

¿Pues qué es lo que amas, extraordinario extranjero?
-¡Amo las nubes. . ., las nubes que pasan.. allá lejos... las maravillosas nubes!
Baudelaire

Principales Abreviaturas

2n	Diploide
4n	Tetraploide
sRNAs	RNAs pequeños
p4-siRNAs	siRNAs dependientes de Pol-IV
H3K27me3	Trimetilación del grupo Polycomb de la histona 3 de la lisina 27
DME	DEMETER
MEA	MEDEA
FWA	FLOWERING WAGENINGEN
FIS2	FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2
RBR1/MSI	Vías del Retinoblastoma related1 en interacción con el supresor multicopia IRA1
PHE1	PHERES
PcG	Polycomb
RNAi	RNA de interferencia
dsRNA	RNA de doble cadena
DCL	Dicer Like
AGO	Argonauta
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RDR	Polimerasas de RNA dependientes de RNA
miRNAs	MicroRNAs
ta-siRNA	RNA transactivadores de tamaño pequeño
nat-siRNA	RNA de interferencia naturales
hc-siRNAs	siRNAs heterocromaticos
ra-siRNAs	siRNAs asociados a repeticiones

HEN 1	HUA HENCER 1
HST	HASTY
GFP	Green Fluorescent Protein
LB	Medio Luria-Bertani
ng	Nanogramo
μL	Microlitro
DNA	Ácido desoxiribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
ER	Endonucleasas de restricción

CONTENIDO

Resumen.....	11
Introducción.....	12
Planteamiento del problema.....	22
Justificación.....	22
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares.....	23
Materiales y métodos.....	24
Resultados.....	33
Discusión.....	47
Conclusiones.....	51
Perspectivas.....	52
Bibliografía.....	53

Apendice 1.....	57
Apendice 2.....	60
Apendice 3.....	67

RESUMEN

La impronta genómica es un fenómeno epigenético que acontece en plantas y mamíferos en el cuál los alelos son expresados diferencialmente dependiendo del origen parental. La impronta genómica ocurre en embrión y en tejidos extraembrionicos, placenta en caso de mamíferos y endosperma en angiospermas. En plantas, se han identificado improntados una clase completa de genes no codificantes: los siRNAs dependientes de Pol-IV (P4-siRNAs). En mamíferos, varios sRNAs (pequeños RNAs) de distintas clases han sido identificados, entre ellos los microRNAs (miRNAs). A pesar de que los miRNAs junto con los P4-siRNAs son los sRNAs más abundantes en angiospermas no hay registro alguno de miRNAs improntados. Para identificar miRNAs improntados genómicamente se identificaron los miRNAs expresados en semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, se diseñaron cebadores correspondientes específicos y se amplificaron sus regiones promotoras. Se clonaron las regiones amplificadas a un vector de entrada y mediante tecnología TA a un vector de expresión (portador de GFP). Estos vectores se utilizaron para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y *Arabidopsis thaliana* sucesivamente.

El presente trabajo permitió la identificación de 57 miRNAs presentes en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*; se construyeron vectores reporteros para 38 de ellos y se crearon 22 líneas transgénicas de *Arabidopsis*, las cuales expresaron GFP en los tejidos donde está presente cada miRNA específico.

Este material permitirá la subsiguiente realización de cruza recíprocas para determinar si los miRNA se encuentran improntados genómicamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*.

1 INTRODUCCION.

1.1 *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una angiosperma miembro de la familia Brassiaceae (Pang, 1987). Su tamaño pequeño, rápido ciclo de vida y el genoma totalmente secuenciado hacen de esta planta un modelo experimental ideal para estudios de biología molecular (Hays 2002; Zhang, 2006).

1.2 Doble fecundación en plantas angiospermas.

Las angiospermas presentan características que las distinguen; entre ellas: la estructura floral, el carpelo (órgano femenino) y el estigma (órgano masculino) encerrados en la misma flor y su doble fecundación (Friis, 1987). El gametofito femenino, también conocido como saco embrionario o megagametofito contiene dos gametos: la célula central (binucleada) y la ovocélula (uninucleada) (Sott, 2006). El gameto masculino, también conocido como grano de polen o microgametofito contiene dos espermatozoides: uno de ellos fertiliza a la ovocélula, y produce el embrión, y el segundo se fusiona con la célula central del megagametofito convirtiéndose en el endosperma (Yadgari, 2004). Endosperma y embrión son idénticos en su composición genética, pero difiere su nivel de ploidía y función (Figura 1.1). El endosperma es un tejido triploide, ya que tiene un genoma materno extra, mientras que el embrión es diploide (Ghering, 2004). La función del endosperma consiste en importar nutrientes del tejido materno, a su vez el embrión absorberá al endosperma nutritivo y germinará para convertirse en esporofito.

1.3 Impronta genómica.

La impronta genómica o marcaje genómico es un proceso biológico por el cual un gen o dominio genómico se encuentra marcado bioquímicamente que resulta en la expresión diferencial de alelos de manera dependiente del padre de origen (Kholer, 2009). La impronta genómica fue descubierta por primera vez en plantas, específicamente en el maíz (Kermicle, 1970), y luego se identificó en mamíferos. En plantas y en mamíferos la impronta genómica ocurre tanto en el embrión como en los tejidos anexos: la placenta y el endosperma. Se ha propuesto que este fenómeno evolucionó como consecuencia de un conflicto de distribución de los nutrientes de la madre hacia los hijos (Kinoshita, 2008).

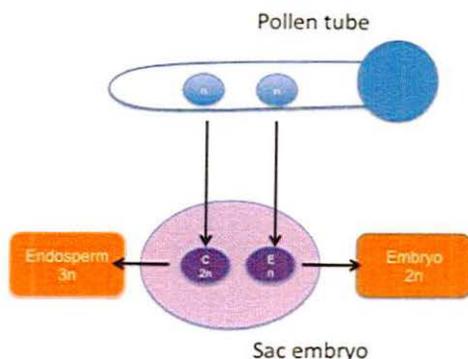


Figura 1.1: Fecundación doble en plantas angiospermas. El polen contiene dos gametos idénticos, uno de ellos fertiliza la célula cigota formando un embrión diploide y el otro se fusiona con la célula central formando el endosperma triploide.

1.3.1 Impronta genómica y regulación del tamaño de semillas.

La impronta genómica afecta el tamaño de las semillas, esto ha sido claramente demostrado por cruza interploides. Cruzar una madre diploide ($2n$) con un padre tetraploide ($4n$) resulta en semillas viables más grandes que las semillas silvestres. En contraste, si se cruzan hembras $4n$ con donadores de polen $2n$ se generan semillas viables más pequeñas que las silvestres (el nivel de ploidia de la madre siempre se escribe primero; por ejemplo 4×2 significa una cruce donde la madre es tetraploide y el padre es diploide) (Scott, 1998). Aunado a esto, en mamíferos y en plantas se ha descubierto que muchos genes improntados o marcados afectan la demanda y el abastecimiento de nutrientes, de la placenta o del endosperma, hacia el embrión (Berger, 2009). Estos resultados apoyan la hipótesis del conflicto genómico, la cual postula que cuando existe reproducción sexual, ambos genomas parentales comparten un conflicto de interés: si la hembra tiene hijos de diferentes padres, cada macho intentará dirigir nutrientes de la madre hacia los cigotos que él haya fertilizado; opuestamente la madre regularizará negativamente la interferencia genética del padre para asegurar una distribución equitativa de los nutrientes a sus hijos, lo cual es ventajoso para la hembra pues ella está emparentada genéticamente con todos ellos (Haig, 1991).

1.3.2 Genes improntados en plantas y mamíferos

Hasta la fecha aproximadamente 80 genes codificantes han sido identificados como improntados en mamíferos y solo 18 en plantas; esencialmente en maíz y

Arabidopsis (Cuadro 1.1). En contraste a los mamíferos donde el marcaje genético ocurre tanto en el embrión como en la placenta, en plantas este sólo ocurre en el endosperma, con la única excepción de *mee 1*, gen improntado en el embrión de el maíz (Lin, 2007; Jahnke, 2009). En plantas los genes codificantes improntados se encuentran dispersos en el genoma, mientras que en mamíferos se encuentran agrupados; dentro de estos grupos existen secuencias que producen distintas clases de RNAs pequeños (sRNAs) no codificantes. En plantas la única clase de sRNAs identificados como improntados son los RNA de interferencia pequeños-dependientes de la RNA Polimerasa IV (p4-siRNAs) (Roy, 2008; Mosher, 2009).

1.3.3 Mecanismo de la impronta genómica en plantas

La expresión de un alelo en función de su origen parental se lleva a cabo por modificaciones específicas en el genoma. Típicamente se define como gen improntado maternalmente al silenciamiento del alelo materno y la expresión del paterno. Inversamente, improntado paternalmente significa la expresión del alelo materno y la represión del paterno.

Los dos principales mecanismos de modificaciones epigenéticas en plantas y mamíferos son: la metilación del DNA y la trimetilación del grupo Polycomb de la histona 3 (H3K27me3). En plantas, la eliminación del grupo metilo de la 5-metilcitosina por la glicosilasa DEMETER (DME) conlleva a una metilación diferencial entre los alelos parentales en el endosperma de *Arabidopsis* (Figura 1.2). La proteína DME es expresada en la célula central del gametofito femenino, lo que resulta en la remoción de las citocinas metiladas de los alelos maternos correspondientes a los genes improntados codificantes: *MEDEA (MEA)*, *FLOWERING WAGENINGEN (FWA)* y de *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)*. De esta forma los alelos maternos son expresados en el endosperma, mientras que los alelos paternos permanecen silenciados, pues se encuentran metilados (Chinnusamy, 2009; Ikeda, 2008).

Adicionalmente las vías metabólicas del Retinoblastoma related 1 en interacción con el supresor multicopia de IRA1 (RBR1/MSI) disminuyen la expresión de la DNA metiltransferasa MET1 mediada por la represión de la transcripción durante la gametogénesis femenina, formando DNA hemi-metilado, el cual es blanco preferencial de la DME. Así, RBR1/MSI1 activa los genes expresados maternalmente FIS2 y FWA debido a que reprime a MET1 en la célula central (Jullien, 2008). La metilación del DNA en los elementos *cis* en las regiones

promotoras de los genes *MPC*, *FWA* y *FIS2* es necesaria para la represión. En contraste el silenciamiento del alelo materno del *PHERES* (*PHE1*) y de los alelos paternos de *MEA* y *ARABIDOPSIS FORMIN HOMOLOGUE 5* son llevados a cabo por la metilación de la histona H3K27me3 (marca represiva) establecida por las proteínas del grupo Polycomb (Fis PcG). La importancia del complejo Fis PcG es demostrada en las mutantes *fis* las cuales son estériles, las semillas son abortadas. Las plantas mutantes *fis* son asociadas con el incremento de la expresión de *PHE1/AGL 37* (factor de transcripción de la caja MAD) y otros genes en el endosperma que son esenciales para el desarrollo de la semilla, estos defectos son asociados con el incremento de la expresión de *PHE1* (Jullien, 2009).

1.3.4 Demetilación sistemática en el endosperma en *Arabidopsis*

Como se describió previamente, la metilación de las citosinas ya sea del alelo paterno o materno lleva a la impronta genómica. Recientemente se comparó la metilación entre el endosperma y el embrión y se descubrió una demetilación general de el primero en las citosinas del DNA. La reducción de la metilación en el endosperma ocurre principalmente en transposones, elementos repetitivos, así como en genes codificantes de proteínas. Este hallazgo incremento el número de genes improntados de cinco a once, *HDG3*, *HDG8*, *HGD9*, *ATMYB3R2* y *AT5G62110* son los nuevos genes identificados, todos ellos están flanqueados o contienen transposones. Los transposones son elementos considerados parásitos genómicos y a su vez una fuente de variación genética en el hospedero. Es posible que la impronta genómica se haya derivado del esfuerzo del hospedero para silenciar a los transposones invasores ajenos. Los genes improntados conocidos hasta el momento, tienen una metilación menor en el endosperma que en el embrión, por lo tanto genes con metilación reducida y expresión incrementada en el endosperma en relación al embrión son candidatos para estar improntados genómicamente (Ghering, 2009; Hsieh, 2009).

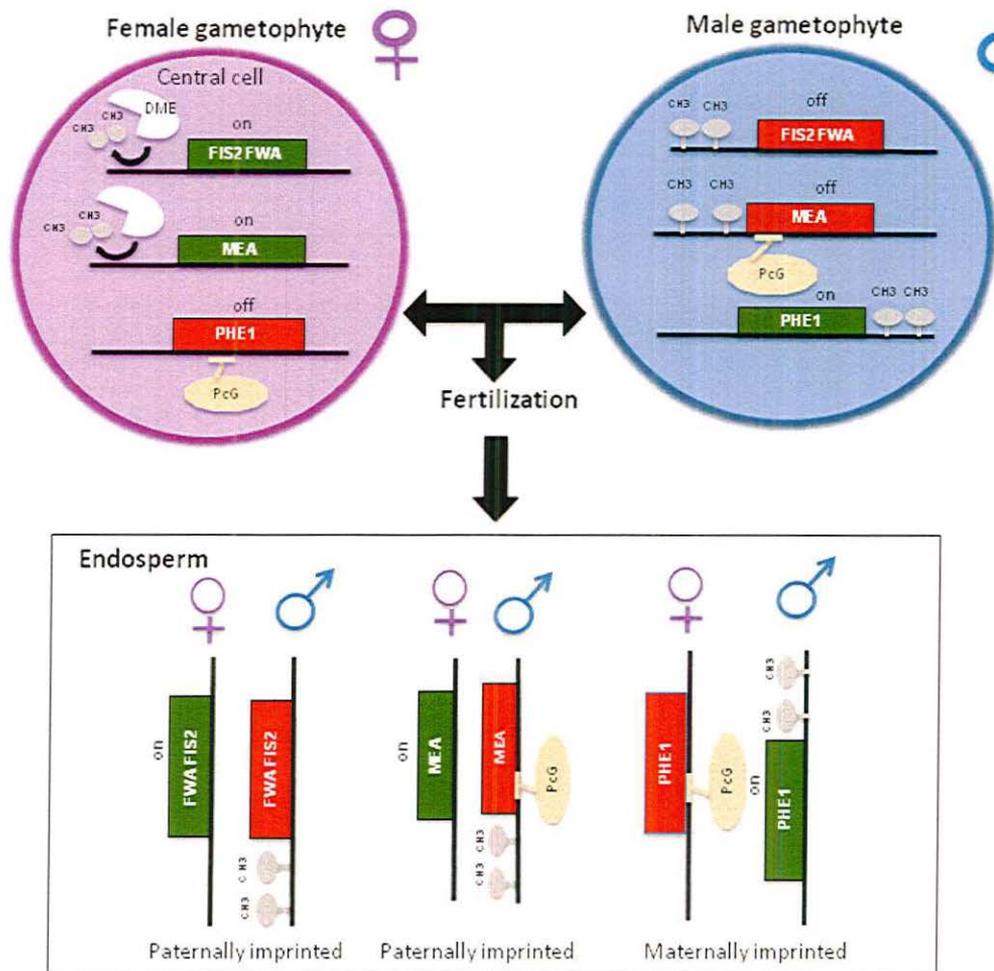


Figura 1.2 Ejemplos de genes maternos y paternos impresos en *Arabidopsis*. En la célula central la enzima DME remueve los grupos metilo de las citosinas de *FWA*, *FIS2* y *MEA*, induciendo su expresión mientras que en el gametofito masculino, la ausencia de DME y la presencia del complejo PcG mantiene la represión (improntados paternalmente). En contraste *PHE1* es suprimido en la célula central por el complejo PcG (improntado maternalmente).

Especie	Gen Codificante	Impronta parental	Tejido improntado
Maiz (<i>Zea mays</i>)	<i>R</i> (solo ciertos alelos)	Paternal	Endosperma
	Alelo <i>MO17</i> del locus <i>DZR1</i>	Paternal	Endosperma
	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM 1 (FIE1)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>NO APICAL MERISTEM RELATED PROTEIN 1 (NRP1)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>MAIZE ENHANCER OF ZESTE1 (MEZ1)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>MATERNALLY EXPRESSED GENE1 (MEG1)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>MATERNALLY EXPRESSED IN EMBRYO 1 (MEE1)</i>	Paternal	Endosperma y embrión
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>MEDEA (MEA)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>FLOWERING WAGENINGEN (FWA)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>PHERES1 (PHE1)</i>	Maternal	Endosperma
	<i>FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>MATERNALLY EXPRESSED PAB C-TERMINAL (MPC) 43</i>	Paternal	Endosperma
	<i>ARABIDOPSIS FORMIN HOMOLOGUE 5 (AtFH5)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>HD-ZIP GENE9 (HDG9)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>HD-ZIP GENE8 (HDG8)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>HD-ZIP GENE3 (HDG3)</i>	Paternal	Endosperma
	<i>ATMYBR2</i>	Paternal	Endosperma
	<i>AT5G62110</i>	Paternal	Endosperma
	<i>P4-siRNAs*</i>	Paternal	Endosperma

Cuadro 1.1. Genes improntados en Maiz y *Arabidopsis*. La mayoría de los genes están improntados paternalmente en el endosperma; con las excepciones de *Mee1* improntado en el endosperma y en el embrión y de *PHE1* improntado maternalmente. Los únicos genes no codificantes identificados en plantas como improntados son los *p4-siRNAs*.

1.4 RNA de interferencia

El silenciamiento genómico, también conocido como RNA de interferencia (RNAi), fue descubierto más no entendido, a principios de los 90's en plantas, cuando la expresión del gen endógeno *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* fue reducida post-transcripcionalmente debido a la introducción de su gen homólogo transgénico (*chs*) (Napoli, 1990). Después de este hallazgo en plantas de tabaco, se describió, que la infección viral induce la destrucción de RNA homólogo, no solamente de virus invasores sino también de virus pertenecientes a la misma familia (Lindbo, 1993). Basándose en esos descubrimientos, se propuso que la degradación de secuencias específicas de RNA era generada por los transgenes cuyos blancos son secuencias homólogas (Prins, 2008). Esta hipótesis fue sustentada por dos hallazgos: el RNA de doble cadena (dsRNA) que silencia la expresión de secuencias homólogas en *Caenorhabditis elegans* (Fire, 1998) y los sRNAs derivados de transgenes que pasan por un proceso de silenciamiento post-transcripcional (Hamilton, 1999). Estos hallazgos proporcionaron los fundamentos para el descubrimiento del RNAi: dsRNAs (RNA de doble cadena) que son procesados en pequeños RNAs (20-26nt) que guían la degradación de secuencias homólogas.

En los años siguientes se hizo evidente que los sRNAs no son solo derivados de ácido nucleicos exógenos sino también de locus endógenos. Hoy en día se entiende que el RNAi y el silenciamiento genómico no son sólo una vía sino una red compleja con funciones críticas durante el desarrollo, la respuesta al estrés, las funciones de vigilancia de transposones y estabilidad genómica (Vazquez, 2010).

El mecanismo de RNAi puede ser explicado a través de los siguientes pasos: exógeno o endógeno dsRNA es reconocido por la enzima Ribonucleasa III, también conocida como proteína Dicer Like (DCL) en plantas, y es procesado en dúplex de RNA más cortos (20-26 nt). En seguida, el duplex es desenvuelto (unwinded), y una de las cadenas, conocida como RNA guía o cadena guía, se une a una proteína denominada Argonauta (AGO) que forma parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). El complejo RISC será guiado por el RNA guía a su blanco a degradar: los RNAs homólogos a este último (Siomi, 2009).

1.4.1 RNAi en plantas

Los organismos eucariotas tienen diferentes cantidades de proteínas Argonautas y DCL. La especificidad del silenciamiento es provista por el siRNA mientras que las proteínas Argonautas provocan la represión de la traducción o el procesamiento del RNA. Por ejemplo, *A. thaliana* tiene 10 proteínas argonautas, de las cuales AGO1, AGO4, AGO6, AGO7 y AGO10 han sido relacionadas funcionalmente con diferentes tipos de siRNAs, cuatro DCL que producen siRNAs de 21-24 nt y 6 polimerasas de RNA dependientes de RNA (RDR). La enorme variedad de siRNA y proteínas envueltas en RNAi, quizá se deba al hecho de que las plantas son organismos sésiles y requieren de un amplio repertorio de respuestas al estrés causado por el ambiente (Ghildiyal, 2009; Siomi, 2009).

1.4.2 Clases de sRNAs

En plantas han sido identificadas por lo menos cuatro diferentes clases de sRNAs. Tres de ellas regulan la expresión génica de forma negativa y post-transcripcionalmente ya sea por procesamiento del RNAm o inhibición de la traducción de proteínas, estos son los microRNAs (miRNAs), los RNA transactivadores de tamaño pequeño (ta-siRNA) y los RNA de interferencia naturales (nat-siRNA). En contraste la cuarta clase de siRNAs, los siRNAs dependientes de Pol-IV (P4-siRNAs) actúan a nivel transcripcional. Los sRNAs más abundantes en angiospermas son los miRNAs y los P4-siRNAs (Eamens, 2008; Brodersen, 2006).

1.4.2.1 P4-siRNAs

Los P4-siRNAs también conocidos como siRNAs heterocromáticos (hc-siRNAs) o siRNAs asociados a repeticiones (ra-siRNAs), tienen 24 nt de longitud y son los sRNAs más abundantes en angiospermas. Los P4-siRNAs inducen el silenciamiento genómico guiando la metilación de los residuos de citosina del DNA homólogo, proceso conocido como metilación del DNA dependiente de RNA (RdDM). Los P4-siRNAs son codificados típicamente por regiones heterocromáticas de DNA, transposones, regiones intergénicas e inducen metilación *de novo* (Vaucheret, 2006, Mosher, 2010).

1.4.2.2 Biogénesis de los p4-siRNAs

La participación de la polimerasa de DNA Pol IV, polimerasa de DNA específica de plantas, es un requerimiento para la producción de los P4-siRNAs. Pol IV sintetiza transcritos de RNA los cuales son convertidos a dsRNA por RDR2 y procesados

por DCL3 para producir dúplex de 24 nt. La cadena guía es cargada en una proteína AGO4 y guiada para dirigir la metilación del DNA e histonas. Recientemente fue demostrado que la producción de lo P4-siRNAs es uniparental durante el desarrollo de semillas de *Arabidopsis* y que todos ellos están improntados paternalmente. Los p4-siRNAs son producidos por alrededor de 5,000 *loci*, lo que representa más del 10% del genoma de *Arabidopsis*; esto incrementa dramáticamente el número de *loci* improntados genómicamente en *Arabidopsis* (Mosher, 2009; Mosher, 2010).

1.4.2.3 microRNAs

Los miRNAs son pequeños RNAs (20-24 nt) endógenos que regulan la expresión génica y juegan papeles cruciales en el desarrollo, diferenciación y respuesta a estrés ambiental. Algunos miRNAs están altamente conservados en distintos linajes de plantas lo que sugiere, a su vez la conservación en las secuencias blanco regulatorias (Bartel, 2009; Yang, 2006).

1.4.2.4 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs son típicamente codificados por regiones intergénicas y son transcritos por la RNA polimerasa II para producir el transcrito primario (pri-miRNA). El pri-miRNA es una cadena sencilla de RNA doblada para formar una secuencia de RNA de doble cadena (dsRNA) poli-adenilada y con caperuza (Figura 1.3). Las proteínas HYPOASTIC LEAVES 1 (HYL1), SERRATE (SE) y DCL procesan la cola poli-adenilada de los pri-miRNAs, para formar el pre-miRNA. HYL1, SE y DCL1 actúan nuevamente y procesan la estructura de gancho para generar un dsRNA de 21 nt (miRNA/miRNA*) el cual es metilado por HUA HENCER 1 (HEN 1) y transportado al citoplasma a través de la proteína transportadora HASTY (HST). En el citoplasma la cadena guía será preferencialmente unida a AGO1 y guiará el corte del RNA mensajero (RNAm) diana mediante complementariedad de bases. A diferencia de los miRNAs de animales, la mayoría de los miRNAs en plantas tienen una complementariedad casi perfecta a sus dianas, lo que resulta en una regulación negativa mediante el corte de los RNAs blanco. Los complejos RISC también pueden dar como resultado la supresión de la traducción de los RNAm mediante la complementariedad imperfecta de los miRNAs con su diana (Voinnet, 2009; Chen, 2008).

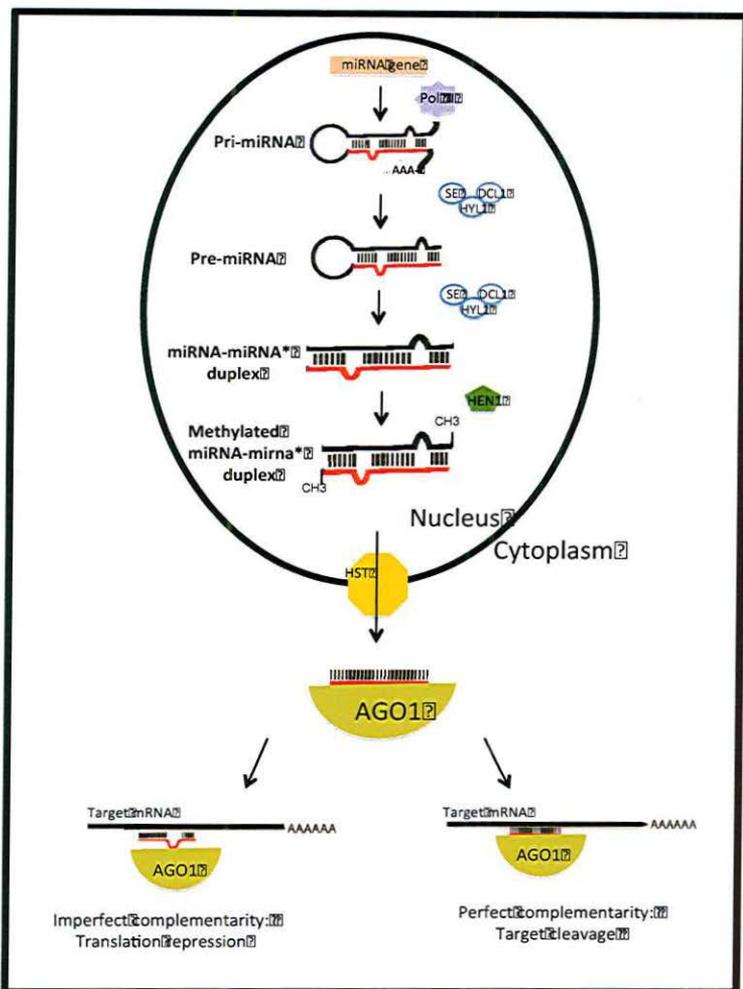


Figura 1.3 Biogénesis de los miRNAs en plantas. Los miRNAs son transcritos por la polimerasa de RNA pol II se producen los pri-miRNAs, estructuras en forma de asa poli-adenilada y con caperuza. El pri-miRNA es procesado por DCL1, SE y HYL, primeramente se elimina la cola poli(A) y después el gancho imperfecto es cortado para generar un dúplex miRNA-miRNA*. El dúplex es metilado por HEN1 para ser transferido al citoplasma por HST. La cadena guía es cargada en la proteína AGO1 para promover ya sea la degradación del RNAm o la inhibición de su traducción.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En mamíferos, se han identificado diversas clases de sRNAs improntadas, entre ellas diversos miRNAs. En plantas, los miRNAs en conjunto con los p4-siRNAs son los sRNAs más abundantes. Sin embargo, hasta el momento solo se han reportado improntados los p4-siRNAs.

JUSTIFICACIÓN

Los cereales son semillas que constituyen la mayor fuente de energía en el mundo, en países en vías de desarrollo éstas aportan del 80-100% de la alimentación diaria y en países desarrollados aproximadamente el 25%. El consumo de cada tipo de cereal varía dependiendo de la zona geográfica; trigo en Europa, arroz en Asia y maíz en América. LA FAO reportó una producción mundial de cereales en 2010 de 2.229 millones de toneladas (www.fao.org). Se ha demostrado que los mecanismos relacionados con la impronta genómica de genes codificantes en semillas en desarrollo afecta el tamaño de la semilla. Es importante conocer este mecanismo por el impacto que tendría en la producción mundial de granos y cereales.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar los miRNAs improntados genómicamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares:

- Identificar los miRNAs que se expresan en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- Identificar la región promotora de los miRNAs que se expresan en semillas de *Arabidopsis thaliana*.
- Construir vectores de expresión que contengan el promotor del miRNA fusionado a la proteína GFP.
- Obtención de líneas transgénicas de *Arabidopsis* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

2 Materiales y métodos

La mayoría de los métodos se llevaron a cabo utilizando la metodología descrita en Ausbel (1990) o Sambrook (2001) con algunas modificaciones. Agua Ultrapura (Millipak-20 Express, 0.22 μm , Milli-Q system) se utilizó en todos los protocolos. Las soluciones fueron esterilizadas ya sea por filtración con jeringa y filtro (0.20 μm filtro Minisart) o en autoclave (12.8 kPa, 121°C por 20 min). Las muestras de un volumen menor a 2 mL fueron centrifugadas en una centrifugadora Heraeus-Pico17, mientras que las muestras de volumen mayor fueron centrifugadas como se indicará posteriormente en los protocolos. La manipulación de todo el material transgénico fue llevado a cabo de acuerdo con los estatutos de la Gene Technology Act 2000 regulada por la "Office of the Gene Technology Regulation" de Australia.

2.2 Métodos bacteriológicos

2.2.1 Cepas de bacterias y vectores (plásmidos)

2.2.1.1 Cepas de *Escherichia coli*

DH5 α F⁻, ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA*, *relA1* (Invitrogen).

TOP10 F⁻, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *nupG*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA1 nupG* (Invitrogen).

JM109 *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac-proAB*)/F⁺ [*traD36*, *proAB*⁺, *lacF*⁺, *lacZ* Δ M] (donación del laboratorio del Dr. Naresh Verma, ANU).

2.2.1.2 Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*:

GV3101::pMP90 usado para la transformación de *Arabidopsis*, portador del gen de la resistencia a la rifampicina como marcador de selección.

2.2.2 Plásmidos

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó un sistema de clonación tipo Gateway, que permite la clonación de productos de PCR. El sistema Gateway consiste en el vector de clonación pCR8/GW/TOPO (Figura 2.1) en el cual se clonará el gen en medio de los sitios *attL*, el vector GW::GFP (Figura 2.1) portador de los sitios *attR* río arriba del gen que codifica para la proteína fluorescente verde

(Green Fluorescent Protein, GFP) y el mix λ recombinasa (sección 2.3.3). Los sitios *att* son sitios de recombinación reconocidos por la recombinasa de λ , que permite la transferencia direccional de la secuencia de DNA del vector de entrada al vector de destino. El otro plásmido utilizado fue el pSoup (Figura 2.3), el cual permite al pGW::GFP replicarse en *Agrobacterium*. El plásmido pSoup contiene el gen de la replicasa pSa, la cual actúa en trans para permitirle a pGW::GFP replicarse.

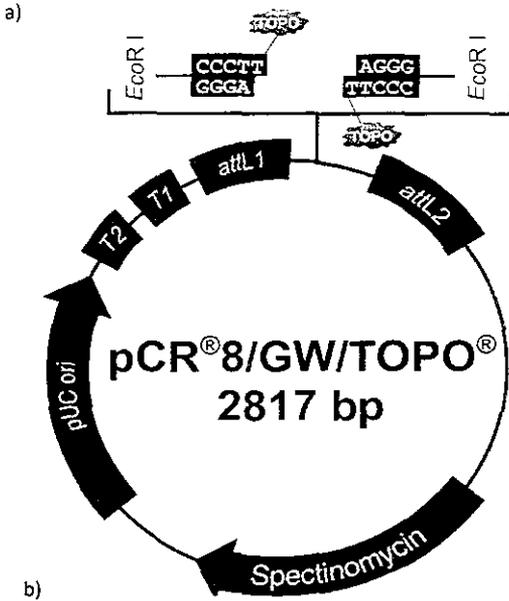
Los plásmidos construidos en este proyecto pueden consultarse en el apéndice 1

2.2.3 Medio de cultivo

E. coli y *A. tumefaciens* fueron cultivados en medio Luria-Bertani (LB) (extracto de levadura 20g, Triptona 10g y Cloruro de Sodio 5g por L). Todas las cepas de *E. coli* fueron incubadas a 37°C mientras que *A. tumefaciens* fue incubada a 28°C. Los antibióticos fueron adicionados de acuerdo al gen de resistencia que contenía cada plásmido y según las indicaciones del proveedor.

2.2.4 Preparación de células competentes por tratamiento químico.

Las bacterias competentes para transformación por choque térmico fueron preparadas como lo detallan Sambrook y Russell (2001) con pequeñas modificaciones. Diez mL de un cultivo de la cepa apropiada fueron inoculados en 250 mL de LB e incubados a 18°C con agitación orbital a 50 rpm hasta presentar una absorbancia de 0.600 a 550 nm. Las células fueron entonces incubadas en hielo por 10 minutos y recolectadas en una centrifuga a 4,100 rpm por 10 min. El sobrenadante fue removido y las células fueron drenadas por 2 min antes de ser resuspendidas en 80 mL de amortiguador de transformación "Inoue" (55mM de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 15mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 250 mM de KCl, 10 mM PIPES, todos los componentes disueltos agua mili-Q) se agregaron y mezclaron 1.5 mL de DMSO. Alicuotas de las células fueron transferidas a tubos previamente enfriados y estériles e inmediatamente congelados en hielo seco. Las células competentes fueron almacenadas a -80°C hasta que fueron requeridas.



M13 forward (20) priming site

501 TAAGTCACAG AGCCAGCTTC TCCGAGGAC CAGCTCGGAA AAAGACGCG AGCCCTTACG TCCGCGGCGA AGAAATCAAT

attL1 GW1 priming site

582 TAAGTCACAG AGCCAGCTTC TCCGAGGAC CAGCTCGGAA AAAGACGCG AGCCCTTACG TCCGCGGCGA AGAAATCAAT TTC TAC AAA

EcoRI EcoRI

659 AAA CCA CCC TCC GAA TTC CCC CTT PCR product AAA GGC GAA TTC CAC CCA GGT TTC TTC TAC

EcoRI EcoRI

713 AAA GGC GAA TTC CAC CCA GGT TTC TTC TAC AAA GGC GAA TTC CAC CCA GGT TTC TTC TAC

attL2 GW2 priming site

791 AAATGCGGAT TAAGTCACAG AGCCAGCTTC TCCGAGGAC CAGCTCGGAA AAAGACGCG AGCCCTTACG TCCGCGGCGA AGAAATCAAT

T7 promoter/priming site M13 reverse priming site

Figura 2.1 a) Mapa de vector de clonación pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). EL vector confiere resistencia a la espectinomicina y los sitios de recombinación. b) Secuencia del sitio de clonación en TOPO. Los sitios de unión de los cebadores y de restricción están señalados. La región sombreada es la secuencia de DNA que será transferida al vector de destino mediante la LR recombinación.

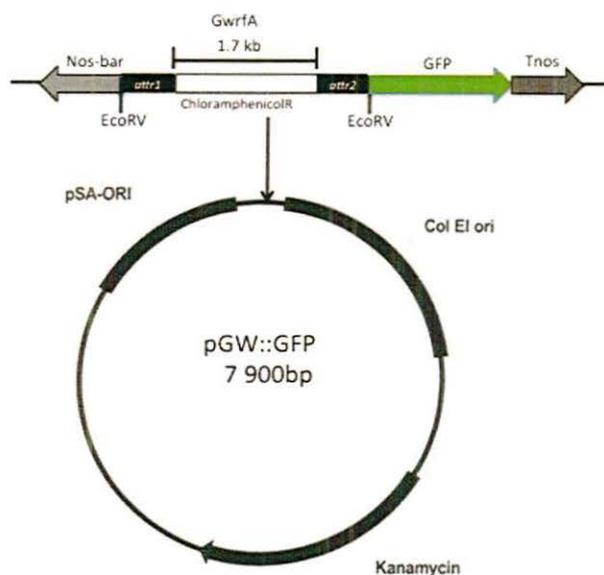


Figura 2.2 Mapa del vector GW::GFP. El vector lleva el gen reportero GFP, los sitios de recombinación y el gen de resistencia a kanamicina.

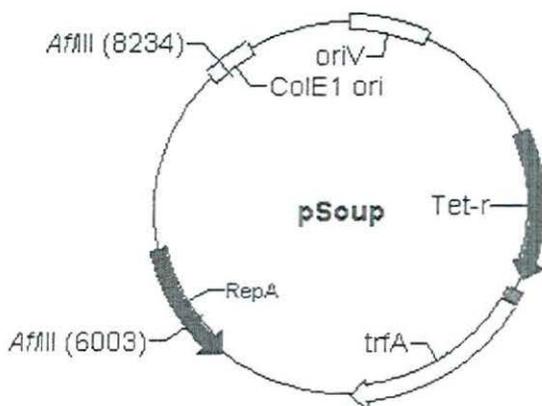


Figura 2.3 Mapa del plásmido pSoup. Éste plásmido porta el gen pSa replicasa (Rep A) el cuál provee funciones de replicación en *trans* de GW::GFP. El vector confiere resistencia a tetraciclina.

2.2.5 Transformación bacteriana

2.2.5.1 Transformación química de células competentes

La transformación química se llevó a cabo en *E. coli* para casi todas las construcciones de los vectores de entrada. Fueron mezclados 0.5 µL de producto fresco de PCR, 0.5 µL de solución salina, 1.5 µL de agua mili-Q y 0.5 µL de vector TOPO (volumen total de 3 µL). La mezcla fue incubada 15 min en hielo y después se le adicionaron 50 µL de células competentes y se incubó de nuevo en hielo por 30 min. Después las células fueron sometidas a choque térmico a 42°C por 90 segundos y regresadas a hielo por 5 minutos; enseguida se adicionaron 250 µL de LB y se incubó a 37°C por una hora, después una alícuota se paso a LB Sólido con antibiótico de selección apropiado y se incubó a 37°C toda la noche.

2.2.5.2 Transformación de células electrocompetentes

Cuando la transformación de *E. coli* por choque térmico no fue exitosa, se utilizó la transformación por electroporación. Se repitió el procedimiento de 2.2.5.1 con la única diferencia de que la solución salina fue diluida (1:4).

Por otro lado, para la transformación de las células competentes de *A. tumefaciens*, los reactivos fueron los siguientes: 50-100 µL de células competentes, 1-1.5 µL de plásmido pSoup (50-100 ng de DNA) y 1-2 µL del vector de expresión (100-200 ng de DNA). Esta solución fue incubada inmediatamente por 30 min en hielo y la mezcla transferida a celdas de electroporación (Gene Pulser Cuvette BioRad) de 0.2 cm de espacio entre electrodos, previamente enfriadas. Las celdas fueron colocadas en el electroporador (Gene Pulser cuvette) de la marca BioRad), programado como sigue: pulso de 2.5 kilovoltios, 25 microfarads y 200 ohm. Inmediatamente después las células fueron resuspendidas en 250 µL de LB.

Después de su transformación, las células *E. coli* fueron agitadas en una incubadora por 1 h a 37°C mientras que *A. tumefaciens* fue incubada de 2-3 h a una temperatura de 28°C.

2.3 Preparación y manipulación del DNA

2.3.1 Purificación y extracción de plásmido

La extracción del plásmido de *E. coli* y/o *A. tumefaciens* se llevó a cabo con los kits AxyPreP Plasmid Miniprep Kit (Axygen Bioscience) y PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.3.2 Digestión mediada por endonucleasas de restricción.

EL DNA plasmídico fue digerido con endonucleasas de restricción (ER) para seleccionar las colonias de *E. coli* transformadas con vectores cuyo producto de PCR este insertado en la orientación correcta. Las enzimas de restricción usadas en este proyecto fueron adquiridas de los laboratorios New England BioLabs; el respectivo amortiguador de cada ER fue usado en todas las reacciones, también provisto por el fabricante.

Para la selección, digestiones sencillas o dobles fueron realizadas, típicamente en un volumen total 15 μL (1.5 μL de amortiguador 10x, 0.25 μL de cada ER, 200 a 300 ng de DNA plasmídico y agua Milli-Q estéril para completar el volumen total) e incubadas de 1-2 hrs a la temperatura optima de cada enzima. Los fragmentos de DNA fueron inmediatamente separados en un gel de agarosa al 1% o la digestión fue inactivada por calor.

2.3.3 Reacción LR (Left-Right)

La reacción LR fue utilizada para transferir el gen del vector de entrada del sistema Gateway al vector de destino. Los siguientes componentes fueron mezclados: 0.5 μL del vector de entrada, 0.5 μL del vector de destino, 3 μL de amortiguador TE (10 mM Tris-Cl y 1 mM EDTA) y 1 μL de la enzima LR clonase. La mezcla fue incubada 25°C por 12 h. Después de la incubación se agregó 1 μL de proteinasa K y la muestra se incubó a 37°C durante 10 min.

2.3.4 Extracción de DNA del gel de agarosa

Los fragmentos de DNA de interés fueron extraídos del gel de agarosa al 1% y purificados con el kit AXYGEN Gel Extraction (AXYGEN Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.5 Secuenciación de DNA

2.3.5.1 Secuenciación de los productos de PCR

Algunas muestras fueron enviadas para secuenciar a la School of Botany and Zoology (BOZO) y otras a la John Curtin School of Medical Research (JCSMR), ambas en la Australian National University, Australia.

Las reacciones fueron enviadas a secuenciar con los siguientes componentes: 1 μL de Big Dye Terminator premix, 3.5 μL de amortiguador 5xBig dye, 0.125 μM de cebador y 150-300 ng de DNA como template y agua para lograr un volumen total de 20 μL . El programa de amplificación fue el siguiente:

1. 94°C por 5min
2. 96°C por 10 seg
3. 50°C por 5 seg
4. 60°C por 4 min

Los pasos 2 a 4 fueron repetidos 30 veces.

2.3.5.2 Purificación y preparación de DNA para secuenciar en microplaca de 96 pozos.

Las muestras fueron transferidas a una microplaca de 96 pozos (Axygen), la cual contenía 50 μ L de etanol al 95%, 2.0 μ L de acetato de sodio 3M y 2 μ L de EDTA por pozo. La microplaca fue sellada, invertida 4 veces y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min para la precipitación del DNA. Las muestras fueron centrifugadas por 20 min a 2500 g y se eliminó el sobrenadante por inversión. La pastilla fue lavada con etanol al 70%, la microplaca fue invertida una vez más y centrifugada brevemente (pulso). Las muestras se secaron por 15 min a temperatura ambiente.

2.3.6 Cadena en reacción de la polimerasa (PCR)

2.3.6.1 Amplificación de promotores

Se utilizó la polimerasa Phusion (Finnzimes) para la amplificación de los fragmentos de DNA. Los componentes de la reacción de PCR fueron los siguientes: 10 ng/ μ L de DNA genómico, 0.25 μ M de cada cebador, 5 mM dNTPS, amortiguador HF 1X y agua Milli-Q para un volumen final de 25 μ L por reacción (concentraciones finales).

Parámetros de la PCR

1. 98°C por 46 seg
2. 98°C por 5 seg
3. 61°C por 30 seg
4. 72°C por 4 min
5. Repetir los pasos 1 a 4 por 9 veces
6. 98°C por 5 seg
7. 55°C por 30 seg

8. 72°C por 4 min

9. Repetir los pasos 6 a 8 por 24 veces

10. 72°C por 4min

2.3.6.2 PCR de colonias de *E. coli*

Se realizaron PCRs para la selección de las colonias recombinantes. Una sola colonia fue escogida por reacción de PCR. La colonia fue diluida en 100 μ L de agua estéril e incubada a 90°C por 5 min para provocar la lisis celular y la expulsión del material genómico. Subsiguientemente este material genómico fue utilizado directamente como molde para las PCRs. Los parámetros de PCR fueron los mismos que los mencionados arriba.

2.3.7 Limpieza de las reacciones de PCR

Los fragmentos de DNA amplificados fueron purificados con el kit Cleanup Kit (Axygen Bioscience) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

2.3.8 Adición de adenina a las reacciones de PCR

Para llevar a cabo la clonación TA era necesario que los productos de la PCR tuvieran un extremo 3' con cola poli A. Para ese cometido se mezclaron los productos de PCR con 0.25 μ L de *Taq* polimerasa, 0.25 μ L de 10 μ M dATP, 3.5 μ L de agua Milli-Q y se incubaron a 72°C por 15 minutos.

2.4 Manipulación y propagación de plantas

2.4.1 *Arabidopsis thaliana*: genotipos y condiciones generales de cultivo.

Las plantas de *Arabidopsis* utilizadas en este proyecto fueron del ecotipo Columbia (Col-0). Éstas fueron germinadas y cultivadas con una mezcla potenciadora de crecimiento (Debco, Australia) y suplementadas con el fertilizador Osmocote Exact Mini control (Scotts Australia, New South Wales).

2.4.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Un cultivo inicial de 5 mL de *A. tumefaciens* el cual contenía el plásmido deseado y los antibióticos de selección fue incubado de 12-16 h a 28°C. Este cultivo fue utilizado para inocular 50 mL de LB con los respectivos antibióticos de selección. El medio se incubó aproximadamente por 12 hrs. Los cultivos fueron centrifugados a 4,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 250 mL de medio de infiltración (MI) (2.2 g MS [sales de Murashige y Skoog], 50 g sacarosa, 500 mL de detergente Silwet L-77, 0.6 g de amortiguador MES a

pH 7.5 por litro). Cuando las plantas empezaron a retoñar, las primeras inflorescencias fueron removidas para estimular la formación de las inflorescencias secundarias. Cuando las inflorescencias secundarias aparecieron las plantas fueron sumergidas en MI por 2 min, se proporcionó un lento masaje para que todas las inflorescencias quedaran totalmente empapadas. Después de ello las plantas fueron cubiertas con bolsas de plástico por aproximadamente 12 h para mantener la humedad y de esta forma asistir la transformación.

2.4.3 Selección de plantas transgénicas de *Arabidopsis*

Las plantas transgénicas fueron seleccionadas por resistencia a herbicida (BASTA, Bayer CropScience). El vector porta el gen *BAR* el cuál codifica la enzima fosfotricina acetiltransferasa que provee resistencia a herbicidas que contienen fosfotricina o BASTA (Brukhin 2000). Por lo tanto las plantas exitosamente transformadas son resistentes al herbicida BASTA. Las plántulas fueron rociadas con BASTA (400 μ L/L) 2 o 3 veces por semana. Sólo las plantas portadoras del gen *BAR* sobrevivieron lo que indica que eran plantas transgénicas.

3 RESULTADOS

En este apartado presento la identificación de los miRNAs presentes en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*, la amplificación y clonación de los promotores miRNAs, mediante la metodología Gateway, en vectores reporteros miRNA-GFP y la transformación de *Arabidopsis* mediada por *Agrobacterium* portando estos últimos.

3.2 Identificación de miRNAs presentes en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

Con el propósito de determinar si los miRNAs de *Arabidopsis* se encuentran improntados en el genoma de *Arabidopsis*, el primer paso fue la identificación de miRNAs presentes en las semillas en desarrollo, esto se llevo a cabo mediante análisis bioinformáticos, utilizando miRbase (www.mirbase.org) conocidos utilizando una base de datos (GSE15348/NCBI GEO) de pequeños RNAs presentes en silicuas jóvenes ecotipo col-0, de 5 días después de la polinización (5DAP). Dichos análisis arrojaron como resultado la identificación de 57 miRNAs específicos en *Arabidopsis*, los cuales están distribuidos en 26 familias (tabla 3.1).

De estas 26 familias de miRNAs, 19 de estos se expresan en semillas, mientras que de las familias restantes (mir156, mir163, mir168, mir169, mir171, mir447, and mir845) solo se detectaron algunos de sus miembros.

3.3 Identificación de miRNAs conservados entre *Arabidopsis* y arroz

Las secuencias de un número considerable de miRNAs mantienen una conservación filogenética entre diversas especies de plantas (monocotiledóneas y dicotiledóneas). Por ejemplo, las secuencias de 21 familias de miRNAs están conservadas entre *Oriza sativa* (arroz), *Populus trichorca* (Álamo balsámico de California) y *Arabidopsis thaliana* (oruga o cascabelitos llorones) (Jones-Rhoades, 2006). Con el fin de identificar miRNAs expresados mutuamente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* y arroz; las secuencias de los miRNAs presentes en granos de arroz (Zhu 2008), fueron comparadas con los miRNAs identificados en semillas de *Arabidopsis* con 5DAP (tabla 3.1). De los 57 miRNAs identificados en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*, 29 de ellos estaban también presentes en los granos de arroz. Estos 29 miRNAs representan a 11 familias diferentes.

Tabla 3.1 miRNAs presente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* y arroz

miRNA en semillas de <i>Arabidopsis</i>	Presente en <i>Arabidopsis</i> y arroz	Contexto diferencial de metilación en citosinas		
		CG	CH	CHH
mir156a	Si	-	-	-
mir156b	Si	-	-	-
mir156c	Si	-	-	-
mir156d	Si	-	-	-
mir156e	Si	-	-	-
mi156f	Si	-	-	-
mir156g	Si	Si	-	Si
mir156h	Si	-	-	Si
mir157a	-	Si	-	Si
mir157b	-	Si	-	Si
mir157c	-	Si	-	-
mir157d	-	Si	-	-
mir158a	-	-	-	-
mir158b	-	-	-	-
mir159a	Si	-	-	-
mir159b	Si	-	-	-
miR159c	-	-	-	-
mir161	-	Si	Si	Si
mir162a	Si	-	-	-
mir162b	Si	-	-	-
mir163	-	-	-	-
mir164a	Si	-	-	-
mir164b	Si	-	-	-
mir164c	Si	Si	Si	Si
mir166a	Si	-	-	-
mir166b	Si	-	-	-
mir166c	-	-	-	-
mir166d	-	-	-	-
mir166e	Si	-	-	-
mir166f	Si	Si	-	Si
mir166g	-	Si	-	-
mir167a	Si	-	-	-
miR167b	Si	Si	-	-
mir167d	Si	Si	-	Si
mir168a	Si	-	-	-
mir169b	Si	-	-	-
mir169c	Si	Si	-	Si
mir171a	-	-	-	-

mir172a	Si	Si	-	Si
mir172b	Si		-	-
mir172e	-		-	-
mir172c	-		-	-
mir172d	Si	Si	-	-
mir173	-	Si	-	-
mir390a	-		-	-
mir390b	-		-	-
mir403	-		-	-
mir408	Si		-	-
mir419	-		-	-
mir447a	-		-	-
mir447b	-		-	-
mir775	-		-	-
mir824	-		-	-
mir827	-	Si	-	Si
mir835	-		-	-
mir840	-	-	-	Si
mir845a	-	-	-	-

Tabla 3.1 miRNAs presente en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* y arroz. En total, 57 miRNAs fueron localizados en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*. De estos 20 están conservados en arroz y *Arabidopsis* y 17 muestran DMRs (regiones diferencialmente metiladas).

3.4 Construcción de vectores reporteros transcripcionales usando GFP

Con el fin de investigar si los miRNAs están improntados en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* se diseñaron construcciones reporteras, portadoras de las regiones promotoras probables de miRNAs fusionadas a la proteína GFP. Adicionalmente fueron construidos como controles dos vectores reporteros con dos genes improntados de las proteínas ácido giberelico (GA3) (resultados sin publicar) y MPC (Tiwari 2008). Un resumen de la estrategia para la construcción de los reporteros transcripcionales miRNA::GFP esta puntualizada en la figura 3.1.

3.4.1 Identificación de los promotores probables de miRNAs

Prácticamente son inexistentes los métodos para identificar las regiones promotoras de genes codificantes y no codificantes de manera eficaz (Ozsolak 2008; Zhou 2007). Por ende las regiones promotoras de los 57 miRNAs fueron definidas de acuerdo a las características específicas de cada miRNA: intrones, exones, UTR (del inglés untranslated region o bien de untranslated tráiler/ TAIR sequence annotation 10.0).

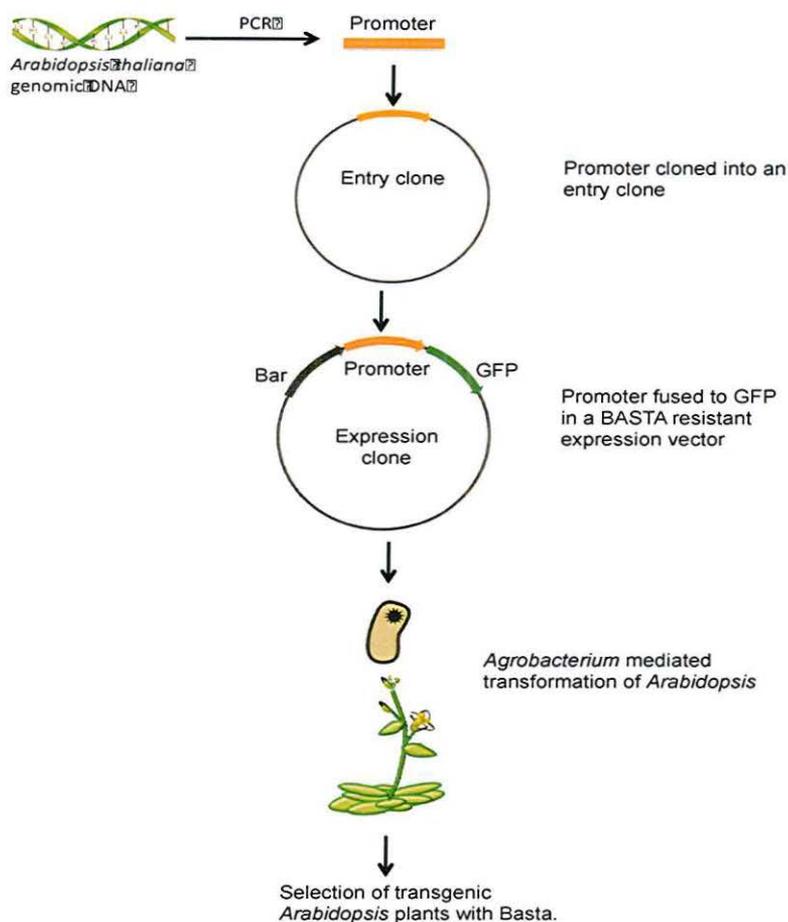


Figura 3.1 Resumen de la estrategia para generar reporteros GFP en *Arabidopsis*. Las regiones promotoras fueron amplificadas de DNA genómico de *Arabidopsis* y clonados mediante el sistema Gateway. Los promotores fueron transferidos por una reacción de recombinación LR a un vector de destino binario (pGreen GFP). Dentro del pGreen, el gen *BAR* confiere resistencia al herbicida BASTA. La región T-DNA dentro del vector de expresión fue transferido a plantas por medio de *Agrobacterium* y las plantas Ti transgénicas resistentes fueron seleccionadas mediante resistencia de crecimiento después de ser rociadas con BASTA.

Las regiones río arriba fueron definidas hasta la UTR del siguiente gen. En casos excepcionales donde la UTR del siguiente gen estaba a más de 5 kb o a menos de 1.5 kb, en caso de que las primeras no pudieran ser clonadas o no contuvieran el promotor se seleccionaron regiones de aproximadamente 4 kb y 2.5 kb respectivamente (respaldo); estas regiones adicionales fueron caracterizadas con el nombre del miRNA más un guion bajo y el número 1, por ejemplo mir169c_1 que representa a una región adicional del mir169 (respaldo del mir169). En total para los 57 miRNAs se seleccionaron 74 regiones promotoras probables (apéndice 3).

3.4.2 PCR de los potenciales promotores de los miRNAs

El software Vector NTI® se utilizó para el diseño de 76 pares de oligonucleótidos (un par para cada región promotora), y otros 74 con el propósito de amplificar los promotores de los 57 miRNAs (57 regiones promotoras específicas mas las 17 de respaldo) y dos más, los controles GA3 y MPC. La lista de oligonucleótidos se encuentra en el apéndice número 2. Se aisló y purificó el DNA genómico de *Arabidopsis* que se utilizó como el DNA templado para amplificar las 74 regiones promotoras por PCR El resultado de la amplificación por PCR de 7 promotores y de un control se muestra en el cuadro y en la figura 3.2.

<i>Gen</i>	<i>Longitud del promotor (kb)</i>
mir167d	2.9
mir169b	2.0
mir159a	1.5
mir403	2.5
mir169c_1	3.0
mir827	1.6
GA3	1.5

Cuadro 3.2: Ejemplo de la longitud en Kb de las regiones promotoras potenciales de siete miRNAs, las cuales fueron definidas en esta tesis.

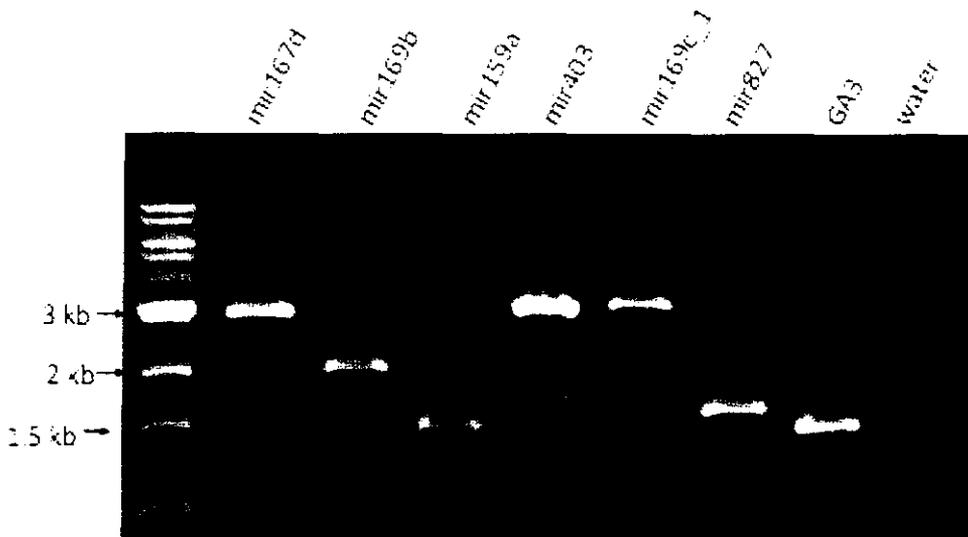


Figura 3.2. Ejemplo de las siete regiones promotoras potenciales que fueron amplificadas mediante PCR, separadas en un gel de agarosa al 1% y teñidas con bromuro de etidio.

De las 74 regiones promotoras de miRNAs 72 fueron amplificadas exitosamente y uno de los dos controles (GA3). Los promotores de mir156e, miR167a y el control MPC no fueron amplificados. Por lo tanto las probables regiones promotoras de 55 miRNAs fueron amplificadas; 17 de ellas tenían una región respaldo amplificadas.

3.4.3 Identificación de DMRs cercanas a miRNAs presentes en semillas en desarrollo

En los miRNAs presentes en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* se buscaron DMRs dentro de una ventana de 6 kb (3 kb 5' y 3 kb 3' de la secuencia madura de cada miRNAs). Dicha búsqueda resultó en la identificación de 17 miRNAs que contenían DMRs dentro de dicha ventana. En plantas la metilación de DNA ocurre en las secuencias CG (citocina y guanina), CHG (H como A, C o T) y en CHH (Finnegan 1998). La secuencia más común de DMRs entre el embrión y el endosperma fue CG, ya que 16 de los 17 miRNAs con DMRs presentaron una metilación diferencial en dicha región, 12 en la región CHH y 4 en la CH.

Los miRNAs que contenían DMRs, las presentaron en distintos contextos y fueron de una longitud variada, por ejemplo: mir169c_1 and mir827 (figura 3.3), mir169c_1 contiene dos DMRs una en sitios CG aproximadamente 600 pb de larga y otra en CHH de 250 pb. Mir827 también contiene dos DMRs en la región

CG de 250 pb y CHH de 3050 pb, sin embargo, la región promotora solo contiene la DMR CG completa.

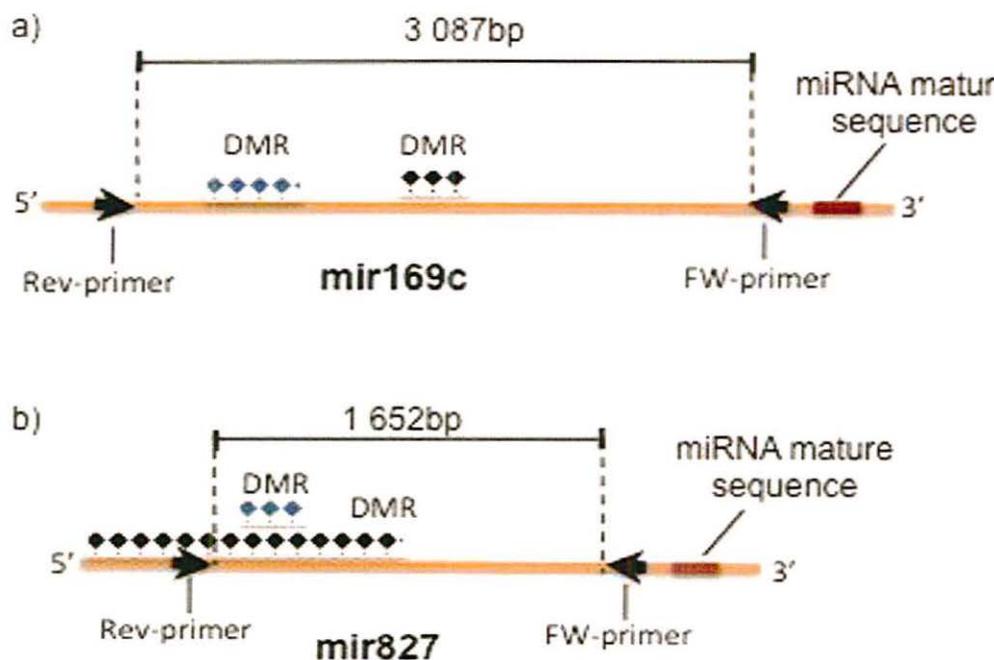


Figura 3.3 Ejemplo de dos regiones promotoras que contienen DMRs. a) Dos DMR fueron identificadas y amplificadas dentro de la región promotora de mir169c, en CHH (triángulos negros) y en CG (triángulos azules). b) La región promotora de mir827 contiene 2 DMRs; la DMR fue amplificada en CG completa y una región parcial de la DMR en CHH ya que esta última se extiende no arriba hasta el siguiente gen.

3.4.4 Construcción de los vectores de clonación para los promotores miRNAs

Después de su amplificación, en las regiones promotoras se les agregó una cola poliA para generar extremos 3'A libres, para esto se usó una *Taq* polimerasa correctora como se describió en la sección 2.3.8 y fue clonado en el vector pCR8/GW/TOPO el cual tiene extremos 3'T complementarios libres (tecnología de

clonación TA). Para determinar la orientación correcta de los promotores en los plásmidos recombinantes se utilizó el método de digestión por endonucleasas de restricción, para esto fue necesario que la región promotora tuviera sitios de restricción asimétricos (figura 3.4). De las 74 regiones promotoras probables, 56 de estas regiones fueron clonadas exitosamente en un vector pCR8/GW/TOPO (Cuadro 3.2). Estas 56 regiones promotoras potenciales corresponden a 42 miRNAs específicos (entre estas 14 de las regiones promotoras clonadas son respaldo) y el control GA3. La secuencia y orientación de cada vector pCR8/GW/TOPO fue verificada mediante el análisis de su secuencia (información no mostrada).

3.4.5 Construcción de vectores de expresión

Los promotores clonados fueron transferidos al vector reportero por recombinación LR para producir vectores de expresión miRNA para obtener la construcción promotor miRNAs::GFP. El vector reportero contiene, entre otras características, el gen BAR (confiere resistencia al herbicida BASTA) y el gen codificante de GFP (permite la visualización de los tejidos en los cuales ocurre la transcripción de promotores).

Después de la recombinación LR, fue confirmada la presencia del promotor río arriba de GFP por digestión utilizando la enzima de restricción EcoRV, la cual reconoce sitios de restricción en ambos lados del sitio de recombinación attR (mapa en la figura 1.4). Dos fragmentos de DNA fueron separados y detectados en gel de agarosa, uno que corresponde al esqueleto del vector pGW::GFP y el otro correspondiente al promotor (figura 3.5 a y b).

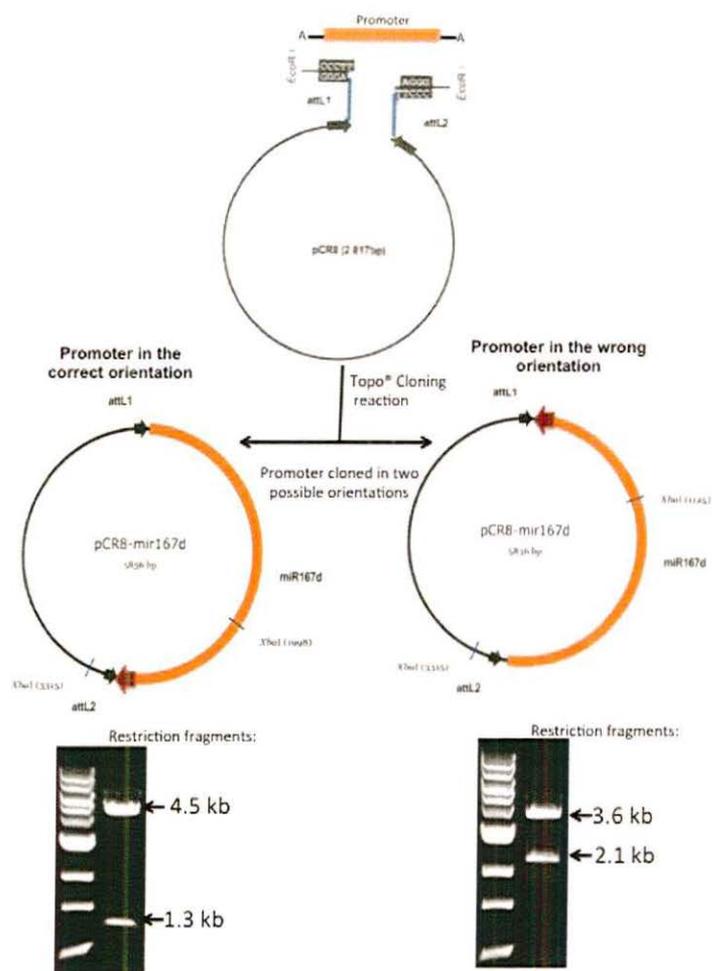
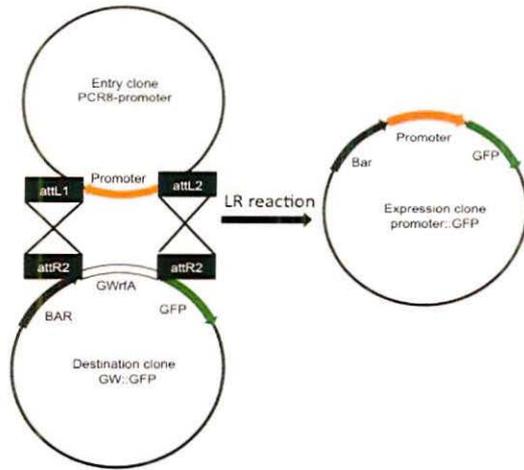


Figura 3.4 Clonación de los promotores de miRNAs y la determinación de su orientación correcta. A la región promotora se le agregó una cola poliA y fue clonada a un vector pCR8/TOPO, el cual contiene dos extremos T complementarios libres. El promotor puede ser insertado en dos diferentes orientaciones y en este ejemplo en específico, mir167d tiene un sitio de restricción asimétrico para *Xba*I, si el promotor es clonado en la dirección correcta la digestión del plásmido por *Xba*I resultará en dos fragmentos de DNA: 4.5 y 1.3 kb. De lo contrario si la orientación del promotor es incorrecta después de la digestión del plásmido con *Xba*I y la separación en gel de agarosa 1% resultaran en fragmentos de DNA de 3.6 y 2.1 kb.

a)



a) Esquema de la construcción del vector reportero mediante el sistema Gateway. El vector pCR8/GW/TOPO porta el promotor flanqueado por dos sitios attL (PCR8-promoter). El vector GW::GFP tiene un cassette Gateway (Gwrfa) flanqueado por dos sitios attR. Durante la recombinación LR los sitios attL1 y attR1 se recombinan y a su vez los sitios attL2 y attR2, dando como resultado el vector de expresión con el promotor clonado directamente río arriba del gen de la proteína GFP.

b)

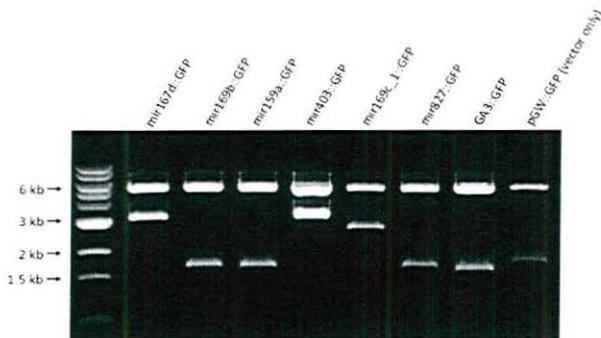


Figura 3.5 b) Confirmación de la presencia del promotor::GFP en el vector de expresión mediante la digestión por enzimas de restricción. Las construcciones fueron digeridas por EcoRV, resultando en dos fragmentos de DNA: el esqueleto del vector (6 kb) y el promotor (longitud en cuadro 3.2 a). El control es el clon de destino que en lugar del promotor contiene el GWrfa cassette (1.7kb). Los fragmentos de restricción fueron separados en gel de agarosa al 1%.

De los 42 miRNAs específicos clonados en el vector pCR8/GW/TOPO 39 regiones promotoras de miRNAs fueron transferidas exitosamente al vector de expresión pGW::GFP. De dichas regiones, 7 eran de respaldo, siendo un total de 32 regiones promotoras de miRNAs específicas fueron clonadas exitosamente en *Agrobacterium*.

3.6 Transformación de *Arabidopsis*.

Grupos de 20-25 plantas de *Arabidopsis* por fueron sumergidas en un medio de infiltración el cual entre otros componentes contenía *Agrobacterium* transformado con la construcción miRNAs::GFP que corresponde al promotor miRNA específico fusionado a GFP. En total se transfectaron aproximadamente 1,000 plantas ordenadas en 39 bloques distintos (véase 2.4.2).

Como resultado de los 39 bloques de plantas transformadas de *Arabidopsis*, 14 bloques fueron transformados y las semillas colectadas, sin embargo, por limitaciones de tiempo estas no fueron sembradas para su selección positiva de Ti (plásmido tumor inducing). La transformación de *Arabidopsis* no fue posible con: mir166::GFP, mir845a::GFP y mir162b ::GFP, pero fue posible con los respaldos mir845a_1::GFP y mir162b_1::GFP (Apéndice 3).

En total en este proyecto se diseñaron 22 líneas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan promotores de miRNAs específicos ligados al gen que codifica para la GFP (tabla 3.3). Para verificar que: efectivamente los miRNAs identificados se expresarán en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis* la región promotora seleccionada efectivamente contuviera el promotor y las transformaciones fueron exitosas se observó al microscopio bajo luz UV las silicuas de *Arabidopsis* transformadas (figura 3.6). Las 22 líneas pertenecen a 20 familias distintas, 10 de ellas (mir167, mir168a, mir169b, mir835, mir156b, mir159a, mir169c, mir166e, mir173b y mir162b) se conservan también en granos de arroz y las otras dos: mir827 y mir169c tienen el DMRs en las regiones promotoras clonadas.

El cuadro 3.3 presenta las 22 líneas transgénicas de *Arabidopsis* y el número de plántulas transformadas. En la figura 3.7 se pueden observar ejemplos de 7 líneas transgénicas de *Arabidopsis* bajo luz UV (figura 3.7), es posible apreciar la expresión localizada de los miRNAs en semillas en desarrollo de *Arabidopsis* (5 DAP).

Promotor de microRNA fusionado a GFP	Plantas transgénicas
Mir167d::GFP	10
Mir166c::GFP	8
mir168a::GFP	11
mir169b::GFP	10
miR835::GFP	2
mir156b_1::GFP	2
mir163::GFP	3
mir171::GFP	1
mir845_1::GFP	7
mir827::GFP	10
mir447b::GFP	5
mir159a::GFP	15
mir390b::GFP	15
mir171a_1::GFP	5
mir824::GFP	15
GA3::GFP	10
mir172e::GFP	11
mir169c_1::GFP	3
mir166e::GFP	5
mir403::GFP	5
mir159c_1::GFP	3
mir172b::GFP	5
mir162b::GFP	5

Cuadro 3.3 Líneas transgénicas de *Arabidopsis* y cantidad de plántulas transformadas. Se crearon 22 líneas transgénicas, con un número variable de plántulas transformadas por bloque, por ejemplo con mir171::GFP solo una plántula resistió a ser rociada con BASTA, en contraste 15 plántulas de mir159a::GFP y mir390b::GFP sobrevivieron.

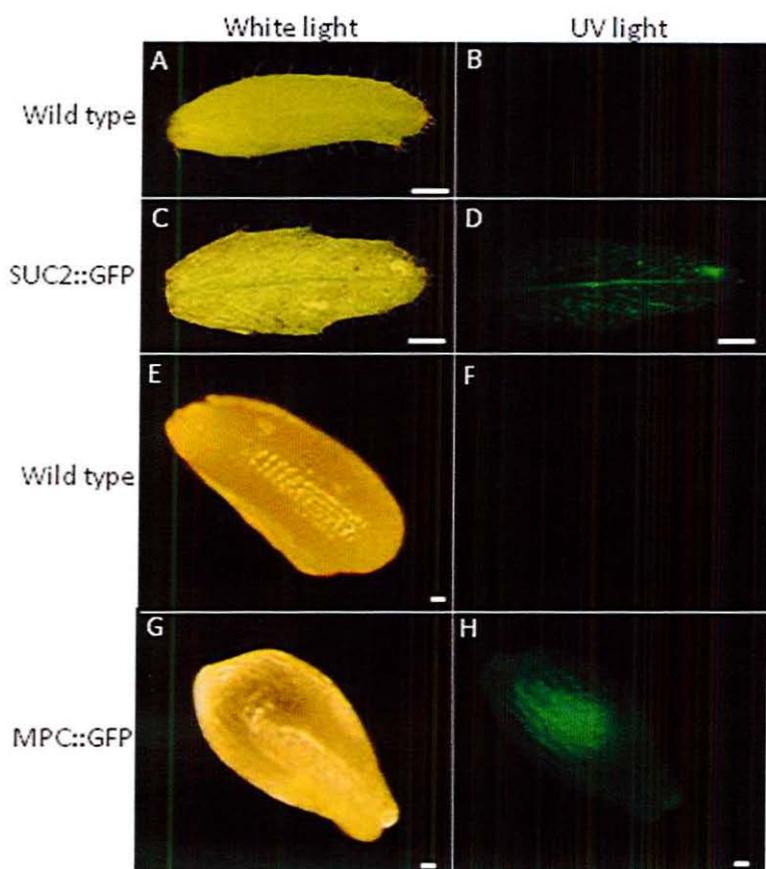


Figura 3.6 Disección microscópica de semillas y hojas de *Arabidopsis* silvestre y control transgénico. Hojas y semillas de *Arabidopsis* (5 DAP) fueron visualizadas bajo luz blanca (A,C,E,G) y luz ultravioleta (B,D, F,H). Hojas silvestres (A, B),y hojas transgénicas contienen el promotor de expresión específico de GFP en floema (SUC2::GFP, C, D), semillas silvestres (E, F) y semillas transgénicas contienen el promotor de expresión específico de GFP en el endosperma (MPC::GFP, G, H). Barra de escala en A es 0.5 cm (representativo para A;B,C,D) y la barra de escala E es 0.1 mM (Representativo para E;F,G, H).

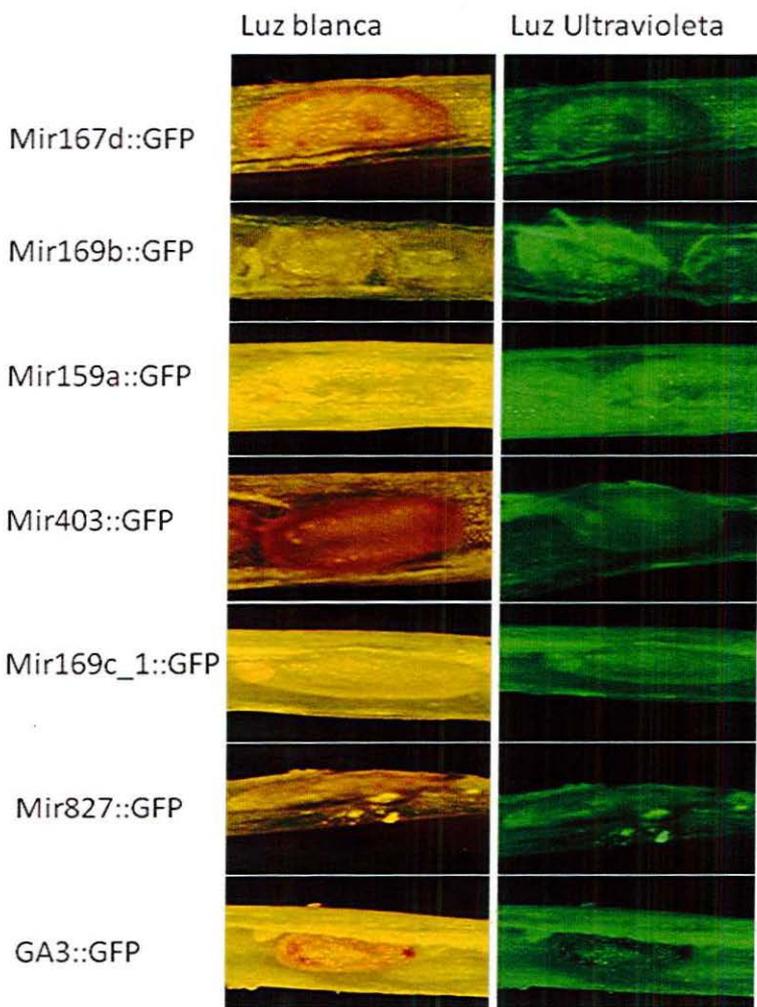


Figura 3.7 Disección microscópica de semillas de *Arabidopsis* transgénicas. Semillas observadas bajo luz blanca y en luz UV. La proteína GFP se expresa en la semilla y en las paredes de las silicuas de las plantas transformadas, esto indica la localización específica de los miRNAs en dicho tejidos.

4 DISCUSIÓN

En angiospermas y en mamíferos se han identificado un número extenso de RNAs no codificantes improntados. En mamíferos sRNAs de distintas clases se han identificado como improntados (C/D RNA genes, microRNAs y probablemente piwiRNAs), en contraste, en las plantas angiospermas, solo los P4-siRNAs están marcados epigenéticamente para la expresión diferencial dependiente del padre de origen.

A pesar de que los miRNAs junto con los P4-siRNAs son los sRNAs más abundantes en angiospermas hasta la fecha no se ha registrado algún miRNA improntado.

Métodos utilizados para identificar genes improntados en plantas

Dos métodos distintos han sido utilizados para identificar genes codificantes improntados en *Arabidopsis*: el primero consiste en identificar polimorfismos entre dos accesiones distintas de *Arabidopsis*, posteriormente generar cruza recíprocas y secuenciar los genes expresados para identificar el origen parental. El segundo método es construir vectores portadores de genes reporteros transcripcionales, generar cruza recíprocas y determinar si el gen reportero solo se expresa dependiendo del progenitor de origen. Inicialmente fue seleccionado el primer método, sin embargo, dentro de la secuencia madura del miRNA prácticamente eran inexistentes los polimorfismos entre solamente dos accesiones de *Arabidopsis*; si se utilizaba esta estrategia hubiesen sido requeridas más de 20 accesiones de *Arabidopsis* para realizar las cruza recíprocas, por ende este métodos no era viable. Por lo que el segundo método, la construcción de vectores que porten el promotor de cada miRNA específico que se exprese en la semilla ligado a GFP, para después realizar cruza recíprocas y examinar los patrones de expresión, fue seleccionado con el propósito de investigar si los miRNAs están improntados en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis*.

Para esto primero fue necesario identificar los miRNAs que se expresan en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*. Existen registros de sRNAs presentes en semilla de *Arabidopsis* pero no específicamente de miRNAs, así que mediante un BLAST (alineamiento) con la base de datos GSE15348 y mirbase se definieron 57 miRNAs en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis*. Hasta la fecha se han identificado aproximadamente 291 miRNAs en plantas (www.mirbase.org), de

acuerdo a los resultados aquí presentados el 19.5% de todos ellos se encuentran en semilla. Tomando en cuenta que la función conocida de los miRNAs en el desarrollo de *Arabidopsis*, el hecho de que casi 1 de cada 5 miRNAs se expresen en semillas en desarrollo, quizá tenga que ver con dichos procesos.

Identificación de las regiones promotoras y su clonación en el vector pCR8/GW/TOPO

Después de identificar los miRNAs en semillas de *Arabidopsis* el siguiente paso fue la identificación de las regiones promotoras. No existe una forma exacta de predecir donde estará el promotor de un gen no codificante, y debido a la cantidad de regiones promotoras que se necesitaba clonar preferimos clonar las regiones completas río arriba de la zona codificante con el propósito de que en esta región se incluyera el promotor dentro de ellas. Cada región promotora fue seleccionada dependiendo de sus características específicas y para la mayoría se intentó clonar hasta la UTR del gen próximo. Como se puede apreciar en el apéndice 3, la longitud de las regiones fue muy variable, desde fragmentos menores a los 500 pb hasta casi 8 kb, esto alargó el proyecto de Tesis ya que el siguiente paso era amplificarlos y clonarlos en tres organismos diferentes *E. Coli*, *Agrobacterium* y *Arabidopsis*. De los 57 miRNAs, 55 fueron amplificados exitosamente con las únicas excepciones de mir156e y mir162a. Cuando los fragmentos de DNA, productos de la PCR fueron separados en gel de agarosa, múltiples fragmentos de DNA se observaron, pero ninguno de la longitud correspondiente a la región promotora.

De las 55 regiones específicas amplificadas, 42 fueron clonadas en el vector pCR8/GW/TOPO. La clonación no fue exitosa para las 13 regiones promotoras de los miRNAs restantes. De las 7 regiones promotoras de alrededor de 6 kb o de mayor longitud ninguna pudo ser clonada (mir161, mir164b, mir164c, mir166a, mir167a, mir172a, mir173). Lo anterior podría deberse a las características técnicas del vector pCR8/GW/TOPO ya que se indica que es útil para clonar fragmentos menores a 5 kb. Sin embargo, fue posible clonar el miR172d que tiene una longitud de 5,481 pb, por lo que se decidió clonar fragmentos de mayor tamaño. Con base en los resultados se observó que el promotor se encuentra en las regiones promotoras seleccionadas a ~2 kb río arriba de la secuencia madura de los miRNAs, por ende para aquellas regiones promotoras que no fue posible su clonación debido quizá a su gran tamaño (mayores de 4 kb) sería mejor utilizar

fragmentos de ~2 kb río arriba de la secuencia madura del miRNAs ó en su defecto usar un vector con las características necesarias para clonar grandes fragmentos de DNA. En cambio para las regiones promotoras de mir156a, mir156f, mir156h, mir157b, mir166b, mir775 que no excedían 4 kb el problema no fue la longitud del fragmento, lo mejor sería redefinirlas.

Debido a que los fragmentos de DNA clonados durante el presente proyecto son regiones promotoras, fue necesario determinar su orientación correcta en los plásmidos recombinantes. Para ello se utilizó el método de digestión por endonucleasas. Para llevar a cabo esta técnica el único requisito era que la región promotora contuviera sitios de restricción asimétricos. En el mercado existen vectores que garantizan direccionar la clonación, estos últimos son la mejor alternativa cuando se necesita clonar un gran número de promotores sin embargo, en el presente trabajo no fue posible esta opción, ya que se habían diseñado los primers adecuados para pCR8/GW/TOPO.

Diseño de líneas transgénicas de *Arabidopsis*

Para transformar *Arabidopsis*, se infiltraron de 20-25 plantas por cada construcción. Los resultados de la transformación fueron variables: se obtuvieron de 1 a 15 plántulas transformadas por bloque. La causa de esta variación es probablemente la edad de las plantas utilizadas. Es preferible transformar *Arabidopsis* justo después de que empiezan a retoñar: se le remueven las primeras inflorescencias y cuando aparecen las segundas es el momento más conveniente para llevar a cabo la transformación. Aquí, debido a las complicaciones técnicas se trabajó con inflorescencias tardías que presentaban semillas desarrolladas.

Dieciocho bloques de plantas fueron transformados exitosamente y colectadas sus semillas, éstas no fueron sometidas a selección positiva. La selección involucra que las semillas sean plantadas y las plántulas que germinen sean rociadas con BASTA para seleccionar las plantas transgénicas, pero el material genético generado ahí está listo para que se realicen las etapas siguientes.

En total se logró producir 22 líneas transgénicas; todas ellas presentaban expresión de GFP en semillas. Lo anterior indica que los miRNAs identificados efectivamente se encuentran presentes en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*, por ende las regiones de DNA que se seleccionaron como probables regiones

promotoras, se amplificaron por PCR, y fueron utilizadas exitosamente para la transformación de *Arabidopsis*, en efecto contienen el promotor de cada miRNAs. Por lo tanto estas regiones dejan de ser “probables” y son las regiones promotoras de los miRNAs y solo falta confirmar si están o no improntadas.

Una de las características que aumentan las probabilidades de que un gen esté improntado es que se encuentra enmarcado por regiones DMRs, entre el embrión y el endosperma (Ghering 2009). Se identificaron 17 miRNAs cuyas regiones promotoras incluyen DMRs, para 15 de estas 17 no fue posible construir las líneas transgénicas, sin embargo 2 líneas transgénicas fueron diseñadas exitosamente, mir167d::GFP y mir827::GDP. Debido a que de las 22 líneas transgénicas diseñadas mir167d::GFP y mir827::GDP tienen más probabilidades de estar improntadas son las primeras cruza recíprocas a realizar para observar sus patrones de expresión. *MIR167* regula la expresión de los genes *ARF6* y *ARF8* (Miin-Feng 2006), vitales para el desarrollo de el ovulo y de la antera, mir827 involucrado en las vías de fosforo (Hui-Fen 2010).

Arabidopsis es la planta modelo en biología molecular, por ello es en ésta donde se han identificado la mayor cantidad de genes codificantes improntados y a la par la única planta hasta la fecha en donde se han identificado genes no codificantes improntados (P4-siRNAs). La importancia de estudiar genes improntados en *Arabidopsis* reside en que estos conocimientos pueden ser aplicados a plantas de cultivo, como en su caso sucedió con *Mee1* (gen improntado en maíz). Se ha demostrado que la impronta genómica modifica el tamaño de las semillas, agrandándolas en varios casos generando un posible impacto económico y alimenticio en granos y cereales.

CONCLUSIONES

A través del presente proyecto,

- Se identificaron 57 miRNAs que se expresan en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*.
- Las regiones promotoras seleccionadas sí contienen el promotor, según los resultados aquí obtenidos una región de 2 kb río arriba de la secuencia madura de miRNA es suficiente para que contenga el promotor.
- De los 57 miRNAs identificados, 42 de ellos fueron clonados a un vector de entrada, de estos 38 fueron clonados exitosamente a un vector de expresión.
- Se confirmó la construcción de 22 líneas transgénicas de *Arabidopsis* con promotor de un miRNA específico fusionado a GFP.

PERSPECTIVAS

El material aquí diseñado representa el inicio de una investigación que era continuada durante un proyecto de Posgrado. Las 22 líneas transgénicas diseñadas en este proyecto son portadoras de la región promotora de miRNAs fusionadas a GFP. Como parte del proyecto, se realizarán las cruces recíprocas para cada una de ellas y así será posible identificar miRNAs improntados en semillas en desarrollo de *Arabidopsis*.

En cuanto a las regiones promotoras que no pudieron ser clonadas en los vectores, ya sea de entrada o de expresión, queda claro que estas deben ser redefinidas o reducidas según sea el caso en específico.

BIBLIOGRAFÍA

- Berger F. y Chaudhury A. (2009). "Parental memories shape seeds." *Trends in Plant Science* 14(10): 550-556.
- Brodersen P. y Voinnet O. (2006). "The diversity of RNA silencing pathways in plants." *Trends in Genetics* 22(5): 268-280.
- Chen X. (2008) "MicroRNA metabolism in plants". *Curr Top Microbiol Immunol* 320:117–136.3.
- Chinnusamy V. y Zhu J. K. (2009). "RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants." *Science in China Series C: Life Sciences* 52(4): 331-343.
- Eamens A., Wang M.-B., Smith A., Waterhouse M. (2008). "RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow." *Plant Physiology* 147(2): 456-468.
- Feil R. y Berger F. (2007). "Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals." *Trends in Genetics* 23(4): 192-199.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. (1998) "DNA methylation in plants" *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* Vol. 49: 223-247
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-811.
- Friis E. M., Chaloner W. G., Crane P. R. (1987). "The Origins of Angiosperms and their Biological Consequences." Ed. Cambridge University
- Gehring M., Bubb K. L., Henikoff S. (2009). "Extensive Demethylation of Repetitive Elements During Seed Development Underlies Gene Imprinting." *Science* 324(5933): 1447-1451.
- Gehring M., Choi Y., Fisher R.L. (2004). "Imprinting and Seed Development." *Plant Cell* 16(suppl_1): S203-213.

Haig D. y Westoby M. (1991). "Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis." *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333(1266): 1-13.

Hamilton A. J. y Baulcombe D. C. (1999). "A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants." *Science* 286(5441): 950-952.

Hays J. B. (2002). "Arabidopsis thaliana, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions." *DNA Repair* 1(8): 579-600.

Hsieh T.F., C. A. Ibarra, Silva S., Zemach A., Eshed-Williams L., Fisher L. R. . Zilberman D. (2009). "Genome-Wide Demethylation of Arabidopsis Endosperm." *Science* 324(5933): 1451-1454.

Huh J. H., Bauer M. J., Fisher R.L. (2008). "Cellular Programming of Plant Gene Imprinting." *Cell* 132(5): 735-744.

Huh J. H., Bauer, M. J Fisher R.L. (2007). "Endosperm gene imprinting and seed development." *Current Opinion in Genetics & Development* 17(6): 480-485.

Hui-Fen K. Y Tzyy-Jen C. (2010) "The Role of MicroRNAs in Phosphorus Deficiency Signaling" *Plant Physiology* Vol. 156, pp. 1016–1024,

Ikeda Y. y Kinoshita T. (2009). "DNA demethylation: a lesson from the garden." *Chromosoma* 118(1): 37-41.

Jahnke S. y Scholten S. (2009). "Epigenetic Resetting of a Gene Imprinted in Plant Embryos." *Current biology* : CB 19(19): 1677-1681.

Jones-Rhoades M.W., Bartel, D.P., y Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 19–53.

Jullien P. E. y F. Berger (2009). "Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting." *Current Opinion in Plant Biology* 12(5): 637-642.

Jullien P. E., Mosquana A., Ingouff M., Sakata T., Ohad N., Berger F. et al. (2008). "Retinoblastoma and Its Binding Partner MSI1 Control Imprinting in Arabidopsis" *PLoS Biol* 6(8): e194.

Kermicle J. L. (1970). "Dependence of the r-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission." *Genetics* 66(1): 69-85.

Kinoshita T, Ikeda Y, Ishikawa R. (2008). "Genomic imprinting: A balance between antagonistic roles of parental chromosomes." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19(6): 574-579

Kohler C. y Weinhofer-Molisch I. (2009). "Mechanisms and evolution of genomic imprinting in plants." *Heredity* 105, 57-63-

Lester R. N. y J. H. KANG (1998). "Embryo and Endosperm Function and Failure in *Solanum* Species and Hybrids." *Annals of Botany* 82(4): 445-453.

Miin-Feng W., Qing T., y Reed J. W. (2006) "Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction" *Development* 133, 4211-4218 (2006) doi:10.1242/dev.02602

Mosher R. A., Melnyk C. W., Studholme D. J., Baulcombe D. C. (2009). "Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis." *Nature* 460(7252): 283-286.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *The Plant Cell Online* 2(4): 279-289.

Pang P. P. y Meyerowitz E. M. (1987). "Arabidopsis *Thaliana*: A Model System for Plant Molecular Biology." *Nat Biotech* 5(11): 1177-1181.

Peters J. y Robson J. (2008). "Imprinted noncoding RNAs." *Mammalian Genome* 19(7): 493-502.

Prins M., Laimer M., Noris E., Shubert L., Wassenger M. Tepfer M (2008). "Strategies for antiviral resistance in transgenic plants." *Molecular Plant Pathology* 9(1): 73-83.

Royo H. y Cavallé J. (2008). "Non-coding RNAs in imprinted gene clusters." *Biology of the Cell* 100(3): 149-166.

Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG. (1998). "Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*." *Development* 125(17): 3329-3341.

Scott R. J. y Spielman M. (2006). "Genomic imprinting in plants and mammals: how life history constrains convergence." *Cytogenetic and Genome Research* 113(1-4): 53-67.

Siomi H. y Siomi M. C. (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." *Nature* 457(7228): 396-404.

Siomi, M. C. y Kuramochi-Miyagawa S. (2009). "RNA silencing in germlines--exquisite collaboration of Argonaute proteins with small RNAs for germline survival." *Current Opinion in Cell Biology* 21(3): 426-434.

Tiwari S., Schulz R., Ikeda Y., Dytham L., Bravo J., Mathers L., Spielman M., Guzman P., Knoshita T., Scott R. J. (2008). "MATERNALLY EXPRESSED PAB CTERMINAL, a novel imprinted gene in Arabidopsis, encodes the conserved C-terminal domain of polyadenylate binding proteins." *Plant Cell*. 20:2387-98.

Vaucheret H. (2006). "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations." *Genes & Development* 20(7): 759-771.

Vazquez F., Legrand S. (2010). "The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs." *Trends in plant science* 15(6): 337-345.

Yadegari R. y Drews G. N. (2004). "Female Gametophyte Development." *Plant Cell* 16(suppl_1): S133-141.

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., Cokus S., Chan SW., Chen H., Henderson I.R., Shinn P., Pellegrini M., Jacobsen S.E., Ecker J.R. (2006). "Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis." *Cell* 126(6): 1189-1201.

Zhou X., Ruan J., Wang G., Zhang W. (2007) Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol* 3:e37.

Zhu Q. H., Spriggs A., Matthew L., Fan L., Kennedy G., Gubler F., Helliwell C. (2008). A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome Res* 18:1456-65.

Apendice1

Plásmido	Proveedor	Resistencia a antibióticos
pCR ⁸ /GW/TOPO [*]	Invitrogen	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir172bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] mir167dPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir166cPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir168aPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir845Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] mir169bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir162bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir835Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -2domir156bpro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir163Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir171Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -2domir845aPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir827Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir162bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir447bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir159aPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir390bPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -SPmir171aPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir166dPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir824Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -GA3Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir172ePro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -2domir169cPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir166ePro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -mir403Pro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -SPmir159cPro	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -2domir156d	Este proyecto	espectinomicina
pCR ⁸ /GW/TOPO [*] -2domir447bPro	Este proyecto	espectinomicina

pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir156cPro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -SPmir162b	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -SPmir172e	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir157dPro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir164aPro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir156bPro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -2domir166fPro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir408Pro	Este proyecto	espectinomycin
pCR ⁸ /GW/TOPO ⁸ -mir158aPro	Este proyecto	espectinomycin
pGW::GFP	Laboratorio del Dr. Miller, ANU	Kanamycin y cloranfenicol
pGW::GFP-mir172bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir167dPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir166cPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir168aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir845Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir169bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir162bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir835Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-2domir156bpro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir163Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir171Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-2domir845aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir827Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir162bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir447bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir159aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir390bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-SPmir171aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir166dPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir824Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-GA3Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir172ePro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>

pGW::GFP-2domir169cPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir166ePro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir403Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-SPmir159cPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-2domir156d	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-2domir447bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir156cPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-SPmir162b	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-SPmir172e	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir157dPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir164aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir156bPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-2domir166fPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir408Pro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>
pGW::GFP-mir158aPro	Este proyecto	<i>kanamicina</i>

Apendice 2

Primer	Secuencia
miR156a-FW	TTCTTTGCGTTTCTCTTGTC
MiR156a-REV	AAGTGACAGATCCAACGGCAG
MiR56c-FW	TTATCACCTTTACCTTACCGACAC
MiR156c-REV	TCGTCTTGAGCAGTAGAAGTGTAG
miR156e-FW	CCGTTGACCGTTGATCTGC
miR156e-REV	TACGCATGTGACCAGGCTC
miR156f-FW	TGTTTGTGGAAAGTTGGG
miR156f-REV	ATCCTCACCACCTCAAACCGTC
miR157a-FW	ATCAATGCCTCTCAATTCTC
miR157a-REV	ATCAATGCCTCTCAATTCTC
miR157b-FW	TCCACAAAGATCGACTGCTCTG
miR157b-REV	ACTATCAATGCCTCCCAAACC
miR157c-FW	CCAACATCACTCTCAAACCTATG
miR157c-REV	ATCGGTTGAATATCGGTTACC
miR157d-FW	TTCATGTACTTTCTCCACA
miR157d-REV	GGAAATATTGCCGACTTAGC
miR159a-FW	GGGCAAGTTAAAGCTCCTGAG
miR159a-REV	GGTTTACTCAACATTGACTCGTC
miR159b-FW	TGTATGATTGTTGGAAGGCC
miR159b-REV	AGTGAAAGCTCCTGAGATATGGC
miR159c-FW	ATTGACATTGAACACAACCTCCG
miR159c-BW	ATCTAAGAGGTCGTGCAATCC
miR161-FW	CCTCCTTCTCCCTTCTTCTCTAC
miR161-BW	AGAGAAGTACTGATCAAAGCTTCGG
miR162b-FW	AATTGATCGATGAACCGCTG
miR162b-BW	AATGGGTAGCTAGTTTTGGAGTG
miR163-FW	GAATCTTTGTTTCTCCATGC
miR163-BW	TTACTTCTTCGACCGTGCTCTTC
mir164a-FW	CGTCACCTTCTTCCACTTATGG
mir164a-BW	GAGATTCTCACCCGCATTTC
miR164b-FW	AGCACACGGGAGCATTGATG
miR164b-BW	ATAACTGGGCCGGGATGAGAG

miR172c- BW	TGACGTAGATACGTTGAGATTACG
miR172d-FW	GACGTGTTATTCTGTCTCTCGG
miR172d- BW	CAATAGCAAACAATGACTGCC
miR173-FW	AAGTGACAATGACCAGAGCGAG
miR173- BW	AGATTACGATGAGACCGCCG
miR390a-FW	AATGAATTGCTAGGTGAGGTTG
miR390a- BW	GAAGAAGGAGAAGAGAAGGTGC
miR390b-FW	CATAGAGAGACAGAGAGAAGGCG
miR390b- BW	CATCCATAGGTATGCATCTTCC
miR447b-FW	CAATGATCAACTCGAGAACTTGGG
miR447b- BW	GCATCGTTTCAAATTGCCTTGTC
miR775-FW	TTTGTTCCTTGAATCGTGGA
miR775- BW	TCAATGTCACGTAGTGCAACG
miR827-FW	CAATCGATCAACACAAGGATG
miR827- BW	GCTGCAGTGGCTAGTAAAGAAG
miR840-FW	TTCCACACTGTGGATGTAAACC
miR840- BW	CTCTTTAACCTAGGAAGCTTTGAG
miR835-FW	GCCTAAACACAAAGATGACCAG
miR835- BW	AAGTAAGCTCCTCTGGTGTCG
miR408-FW	ATCATTACCAACTACCACTGC
miR408- BW	GGGTAGAGACAAAACAGAGTCGT
miRNA166c_1-FW	GGAGTAACTCACTGCAATCAGG
miRNA166c_1- BW	CTTCATGACCTCGAGCCAGACAAC
miRNA 166f_1-FW	GAGTTGCATATTGAACAGGGAC
miRNA 166f_1- BW	GATTGAATGGTCTCGAGCCAG
MPC -FW	AATGCTTCTTTCCATTTCTTGC
MPC- BW	TTTTCCCCTAGCAATTTTC
GA3-FW	AGAGAGGTTGGCCAAAATCAT
GA3- BW	ATGGAAGGAATGTGATTTTGTATG
miR156b-FW	CCAATAAGCAATAAGGCCACAAC
miR156b- BW	CTCTGTTGCATTCTCAATCAC
miR156b_1-FW	ATAAGGCCACAACGTAAATCC
miR156b_1- BW	ACTAGCAAAAGTGCAACAGAC
miR156d-FW	CAACATCTGTCCATCTAGTTATGAC
miR156d- BW	CTCATCACTTCTCACTTTCCG

miR164c-FW	CTTCTTCTTCCTTTCTTCTCTG
miR164c-BW	CTCTCTTGCATCATCAAACCTCC
miR166a-FW	CCGCATAGTAAACATTCTGGTCCG
miR166a-BW	ATGAATAGAGCGAGCCAGAGTCC
miR166b-FW	CGACACGAATTGGCTCATGTC
miR166b-BW	TCTCGAGCCAGACAACAGTCC
miR166c-FW	CGAAATCGGTCTTTCCAGTTC
miR166c-BW	TCGAGTGATTCTTCTTTCATGACC
miR166d-FW	TTGCCCCACTTTCTTTCTTTAGTC
miR166d-BW	ATCTTCTTCATGACCTCGAGCCAG
miR166e-FW	GATCTAAGTTAAGGGCCTCGTG
miR166e-BW	CCAACGTAATGCTTGGTGTTG
miR166f-FW	GCTCTTAGATTGTGACAGGGAAC
miR166f-BW	TCGAGCCAGGCATCATTAC
miR166g-FW	TGGTGGCAGTGTGTTGCTCTG
miR166g-BW	TTACTCTCCATGACCTCGAGC
miR167a-FW	GGGTTACGGAATTGAAAGCGTG
miR167a-BW	TGCACCATAGACTTCACCGTAGC
miR167d-FW	GAGAGGGTTCTTTGGGCCAAG
miR167d- BW	AGAGAAATGCCTCCTTGTGAAGC
miR168a- FW	CCGTGAGTGGAGTTAGTTGTACG
miR168a- BW	CCCGATGGTGAGACTCTACTATC
miR169b-FW	GCGACGTAGAGCATTGCAAC
miR169b- BW	TCCGTTGGGCAAGAATGTAC
mir169c-FW	GAACAACAATGGCCTTTTTCC
mir169c- BW	CCACCTATTCTTTCAAGACACC
miR171a-FW	GCATTATAATACAGAGGTGCTTG
miR171a- BW	ACGTGTGTGGTCAGGTAAGATC
miR172a-FW	ACCGTCCATCAACAGATGTG
miR172a- BW	ATTGGGTTTAGTTAAACGAGCC
miR172b-FW	GCCTACAAACAACGACAGATGAG
miR172b- BW	CGAGAAAGGTACACTACAAGTGC
miR172e-FW	ACTCTTTGGGTTAGCACGAATCTG
miR172e- BW	GCGAAAGCAAAGGGAACACATC
miR172c-FW	ATGCTCCAACAGCGAACAGTAG

miR156d_1-FW	CCCATCAACATGCATCTATCTAG
miR156d_1- BW	TAAGTAATAGTGTGCGGGTC
miR156g-FW	CGTTATTGCTATTCCCTTACCTC
miR156g- BW	GCAATCCCCGGTGATACTTG
miR156h-FW	TTTTCATCTTCTTCTCGGGAG
miR156h- BW	ATCATTCCAGTGTATGTTATTCGCC
miR158a-FW	AAGAGCAATGGCGTCATCAC
miR158a- BW	GGTCACCGCATCTTTTGTTGG
miR158a_1-FW	TGTAGACAAAGAAGCACAGAGATG
miR158a_1- BW	AAAGTAACAGATTCAAGTGAGGTGAG
miR158b-FW	AATTCTCTCTCTCCCTCTCC
miR158b- BW	CCTCTTCCAACAGTGTAGAC
mir158b_1-FW	GTTTGCTTCCCTCCCTCTGCTTG
mir158b_1- BW	CAAAGAAGCACAGAGATGACGTG
miR167b-FW	GCCGTGCGTTTCTTAGGATG
miR167b- BW	ACCTGAGCAACAAGTTGTGC
miR403-FW	CAGACTGTTGTGTAGACAAGTG
miR403- BW	AGCATCTCTTACAGAAAGCCTG
Mir419-FW	GTCCTACATGTGATGCTCTCAC
Mir419- BW	AGCTCTGACATCGAAGAGTCAG
miR447a-FW	AATGATCAACTCGAGAACTTGGG
miR447a- BW	AAACGCTGAACCATGACGGTG
mir824_1-FW	ATCCACGTGCGTGGTATTC
mir824_1- BW	GAGGAAGGATGCGAGAGAGG
mir824-FW	CACGTGCGTGGTATTCAAGC
mir824- BW	TGGTGATACTCAGCATCTCAGC
miR845a-FW	CAAATTCCTCATAGGCGTGGCTC
miR845a- BW	AGATGAAAGAAGACACTTCACATGG
mir845a_1-FW	AAATATGCATCCTCCAGGTCC
mir845a_1- BW	TAAGTTCCTTTGTGTCACTACTGTG
mir169c_1-FW	CACATTCAAGGCTTTAGATG
mir169c_1- BW	CATCTCTTGACAGAAGAAACCC
mir447b_1-FW	AAGCTCGAAGACAATACCAGG
mir447b_1- BW	CTTCATTCTGGTGATACTACAGAGG
mir775_1-FW	CTCGATGAAGAAGAAGAGG

mir775_1- BW	GATGTCCTTGGACAAACC
miR447a-FW	CGAGAACTTGGAGTTGGCTAG
miR447a-BW	GCAACAGAAGCTCCATTCTCTAG
SPmiR166a	TTTCAATGCTACCCTCGCTCCTC
SPmiR164c	GCGAGCTTTGTTAATGGACC
SP172e	GACTTTGACTTTGGTCTTGGACCC
sp171a	TGCAAACGCTAGATATGTCAAG
SpmiR162b	AATCCAAAACGGCACGAG
SP mir159c	CAACGGAAGAAGCTAAGCG

Apendice 3

MiRNAs	PCR	Longitud del promoter	Clonado en vector de entrada	Clonado en Arabidopsis
mir156a	Si	2 921	No	---
mir156b	Si	2 572	Si	Seleccionar Ti
mir156b_1	Si	2 718	Si	Si
mir156c	Si	3 761	Si	Seleccionar Ti
mir156d	Si	456	Si	NO
mir156d_1	Si	2 763	Si	Seleccionar Ti
mir156e	No	3184	---	---
mir156f	Si	4 343	No	---
mir156g	Si	2 588	Si	NO
miR156h	Si	2 516	No	---
miR157a	Si	4 554	Si	NO
miR157b	Si	2 692	No	---
miR157c	Si	3 105	Si	Seleccionar Ti
miR157d	Si	3 474	Si	Seleccionar Ti
miR158a	Si	555	Si	Seleccionar Ti
mir158a_1	Si	3 318	Si	NO
mir158b	Si	517	Si	NO
mir158b_1	Si	2 517	Si	NO
miR159a	Si	1 569	Si	Si
miR159b	Si	2 296	Si	Seleccionar Ti
miR159c	Si	1 403	Si	No*
mir159c_1	Si	2 382	Si	Si
miR161	Si	8 273	NO	----
miR162a	No	---	---	---
miR162b	Si	1 199	Si	No*
mir162b_1	Si	2 119	Si	Seleccionar Ti
miR163	Si	1 842	Si	Si
mir164a	Si	1 865	Si	Seleccionar Ti
mir164b	Si	5 904	No	---

miR164c	Si	8 775	No	---
mir164_c_1	Si	4 617	No	---
miR166a	Si	8 935	No	---
mir166a_1	Si	4 508	No	---
miR166b	Si	2 025	No	---
miR166c	Si	593	Si	Si
mir166c_1	Si	2 505	Si	NO
miR166d	Si	1 888	Si	no*
miR166e	Si	1 662	Si	Si
miR166f	Si	783	Si	NO
mir166f_1	Si	2 503	Si	Seleccionar Ti
miR166g	Si	2 025	Si	Seleccionar Ti
miR167a	Si	7 225	No	---
miR167b	Si	2 746	Si	NO
miR167d	Si	2 957	Si	Si
miR168a	Si	2 184	Si	Si
miR169b	Si	2 070	Si	Si
miR169c	Si	2 116	Si	NO
mir169c_1	Si	3 087	Si	Si
miR171a	Si	1 284	Si	Si
mir171a_1	Si	2 150	Si	Si
mir172a	Si	6 949	No	---
miR172b	Si	3 961	Si	Si
miR172e	Si	1 113	Si	Si
mir172e_1	Si	2 112	Si	Seleccionar Ti
miR172c	Si	1 816	Si	NO
miR172d	Si	5 481	Si	NO
miR173	Si	6 214	No	---
miR390a	Si	3 878	Si	NO
miR390b	Si	1 834	Si	Si
miR403	Si	3 058	Si	Si
miR408	Si	2 532	Si	Seleccionar Ti
miR419	Si	2 638	Si	NO
miR447a	Si	2 602	Si	NO

miR447b	Si	874	Si	Si
mir447b_1	Si	2 420	Si	Seleccionar Ti
miR775	Si	612	No	---
mir775_1	Si	2 644	No	---
miR824	Si	4 617	Si	Si
mir824_1	Si	3 050	Si	NO
miR827	Si	1 652	Si	Si
miR835	Si	2 486	Si	Si
miR840	Si	2 553	Si	NO
mir845a	Si	2 613	Si	no *
mir845_1	Si	2 099	Si	Si