

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

TESIS

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE
EXPRESIÓN DE microRNAs DE
RESPUESTA A SEQUÍA EN PLANTAS
MONOCOTILEDÓNEAS

Presentado por:

JOSÉ FRANCISCO PULIDO BARAJAS

Para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Directora del proyecto:

DRA. BLANCA ESTELA BARRERA FIGUEROA

Codirector del proyecto:

DR. JULIÁN MARIO PEÑA CASTRO

Abril, 2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y la codirección del Dr. Julián Mario Peña Castro, con el apoyo del Programa de Mejoramiento del Profesorado a través del proyecto PROMEP 2011 103.5/11/6720 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de Ciencia Básica CONACYT 169619.

Partes de este trabajo fueron presentadas en el Primer Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Oaxaca, realizado en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca del 21 al 22 de Noviembre de 2013.

Resumen	i
Abreviaturas	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La sequía y sus efectos	1
1.2 La sequía en el mundo	2
1.3 La sequía en México	3
1.4 Plantas monocotiledóneas de importancia económica	5
1.4.1 El maíz (<i>Zea mays</i>)	6
1.4.2 El sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	7
1.4.3 El arroz (<i>Oryza sativa</i>)	8
1.5 La planta modelo <i>Brachypodium distachyon</i>	9
1.6 Respuesta general de las plantas a la sequía	10
1.7 La expresión en el flujo de la información genética	13
1.8 Respuesta molecular al estrés por sequía	15
1.9 Regulación de la respuesta molecular al estrés	17
1.10 Los microRNAs y la regulación postranscripcional	17
1.11 Los microRNAs en la respuesta al estrés	19
1.12 MicroRNAs de respuesta a sequía en monocotiledóneas	22
1.13 Métodos para la identificación de miRNAs de respuesta al estrés	27
1.13.1 PCR cuantitativa	29
1.14 Conservación de microRNAs	31
2. JUSTIFICACIÓN	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 Objetivos específicos	35
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Análisis de secuencias	37
6.1.1 Elaboración de un índice no redundante de secuencias de microRNAs	37
6.2 Análisis digital de la expresión	38
6.2.1 Análisis digital de la expresión de miRNAs en respuesta a sequía	40
6.3 Clasificación de microRNAs regulados por sequía	40
6.4 Establecimiento de plantas y tratamientos de estrés	41
6.4.1 Material vegetal	41
6.4.2 Cultivo de <i>Brachypodium distachyon</i>	42
6.4.3 Cultivo de maíz, arroz y sorgo	43
6.4.4 Tratamientos de estrés	44
6.4.5 Recolección del tejido vegetativo	44

6.5	Parámetros fisiológicos de estrés	45
6.5.1	Fluorescencia de clorofila	45
6.5.2	Contenido relativo de agua	45
6.6	Extracción de ARN	46
6.7	Análisis de concentración, pureza e integridad del ARN	48
6.8	Ensayos de expresión mediante qPCR	48
6.8.1	Método N-Code	50
6.8.2	Método de ligación de un adaptador en el extremo 3´	54
6.9	Prueba del método de ligación de adaptador al extremo 3´ por <i>spike-in</i>	59
7.	RESULTADOS	60
7.1	Índice de microRNAs no redundantes	60
7.2	Análisis digital de la expresión	61
7.2.1	Análisis digital de la expresión diferencial	67
7.3	Selección de microRNAs para su validación experimental	69
7.4	Establecimiento del cultivo de 4 especies monocotiledóneas	70
7.5	Inducción del estrés y registro de parámetros fisiológicos	71
7.6	Extracción de ARN total	73
7.7	Análisis de expresión por qPCR	74
7.7.1	Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos	74
7.7.2	Diseño de un método para analizar la expresión de microRNAs mediante qPCR	75
7.7.3	Análisis de expresión de miRNAs selectos mediante qPCR	77
8.	DISCUSIÓN	81
8.1	Identificación de nuevos microRNAs	81
8.2	Índice de microRNAs y cuantificación en bibliotecas de ARNs pequeños	82
8.3	Cuantificación de la expresión de microRNAs por qPCR	85
8.4	Importancia biológica de microRNAs de respuesta a sequía	88
8.5	Consideraciones finales	89
9.	CONCLUSIONES	91
10.	PERSPECTIVAS	92
11.	REFERENCIAS	93
12.	APÉNDICES	102
	APÉNDICE A	102
	APÉNDICE B	106
	APÉNDICE C	107

Figura 1. Distribución de la sequía en el mundo	2
Figura 2. Frecuencia e intensidad de la sequía en México	4
Figura 3. Producción de los principales cereales en México	6
Figura 4. Estrategias de adaptación de la planta frente al déficit hídrico	11
Figura 5. El flujo de la información genética	14
Figura 6. Mecanismos de regulación de la respuesta molecular al estrés por sequía	16
Figura 7. Biogénesis y modo de acción de los miRNAs	18
Figura 8. Fundamento de la detección de fluorescencia en tiempo real y la cuantificación de la concentración de un gen usando el valor Ct	30
Figura 9. Elaboración del índice no redundante a partir de secuencias maduras obtenidas de la base de datos miRBase.	38
Figura 10. Método para el kit N-CODE	50
Figura 11. Método de ligación de adaptador al extremo 3'	55
Figura 12. Los 10 microARNs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de <i>Brachypodium distachyon</i>	62
Figura 13. Los 10 microARNs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de <i>Zea mays</i>	63
Figura 14. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de <i>Sorghum bicolor</i> ...	64
Figura 15. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de <i>Oryza sativa</i> ...	65
Figura 16. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de RNAs pequeños de <i>Brachypodium distachyon</i>	66
Figura 17. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de RNAs pequeños de <i>Zea mays</i>	66
Figura 18. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de RNAs pequeños de <i>Sorghum bicolor</i>	67
Figura 19. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de RNAs pequeños de <i>Oryza sativa</i>	67
Figura 20. Diagrama de microRNAs inducidos por sequía en 4 especies monocotiledóneas	68
Figura 21. Diagrama de microRNAs reprimidos por sequía en 4 especies monocotiledóneas	68
Figura 22. Relación de expresión (RE) de miR166b-3p y miR166a-3p en las especies bajo estudio	70
Figura 23. Cuarto de crecimiento acondicionado para el cultivo de <i>Brachypodium distachyon</i> y Mini-invernadero móvil para el cultivo de sorgo, arroz y maíz	70
Figura 24. Plantas de <i>Brachypodium</i> en condiciones normales de humedad en suelo y en sequía. Plantas de maíz en condiciones normales y en sequía	71
Figura 25. Contenido relativo de agua en hojas de sorgo (Sbi) y maíz (Zma) en condiciones control (Ctrl) y de sequía (Seq)	72
Figura 26. Fluorescencia de clorofila de las cuatro especies y sus	

tratamientos de control y sequía	73
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante de los ARNs extraídos de las plantas colectadas	74
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos con los oligonucleótidos diseñados para amplificar el miRNA 168a-5p, 166a-3p y 629-3p en las pruebas de qPCR	75
Figura 29. Procedimiento propuesto para la cuantificación de microRNAs, basado en la ligación de un adaptador 3´	76
Figura 30. Análisis del ensayo del método propuesto con un <i>spike</i> de ARN	77
Figura 31. Resultados cuantitativos de expresión relativa obtenidos por qPCR para los microRNAs	78
Figura 32. Curvas de disociación de los productos obtenidos en el qPCR	79
Figura 33. Curvas de disociación de los productos de miR444 en qPCR	80

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Algunos microRNAs de respuesta a sequía identificados en plantas	21
Tabla 2. MiRNAs de respuesta al estrés por sequía identificados en plantas monocotiledóneas	23
Tabla 3. Bibliotecas de ARNs pequeños empleadas para el análisis digital de la expresión	39
Tabla 4. Lista de las especies vegetales empleadas en este estudio	41
Tabla 5. Condiciones ambientales del cuarto de crecimiento	42
Tabla 6. Preparación de reacciones para PCR de temperatura en gradiente	49
Tabla 7. Programa de ciclado de temperatura en gradiente	49
Tabla 8. Preparación de ARN poliadenilado mediante N-Code	51
Tabla 9. Preparación de ADNc mediante N-Code	52
Tabla 10. Continuación de la preparación de ADNc mediante N-Code	52
Tabla 11. Preparación de reacciones de qPCR con Platinum SYBRGreen	53
Tabla 12. Condiciones de ciclado empleadas en la qPCR con Platinum SYBRGreen qPCR super mix	54
Tabla 13. Ligación del adaptador al extremo 3´	56
Tabla 14. Preparación de ADNc mediante el método de ligación de adaptador	56
Tabla 15. Continuación de la preparación de ADNc mediante ligación de adaptador	57
Tabla 16. Preparación de reacciones de qPCR con Maxima SYBRGreen	58
Tabla 17. Condiciones de ciclado empleadas en la qPCR con Maxima SYBRGreen qPCR master mix	58
Tabla 18. MicroRNAs reportados en la miRBASE en especies monocotiledóneas	61
Tabla 19. MicroRNAs seleccionados para análisis de qPCR y sus valores de expresión	69

RESUMEN

La sequía es uno de los problemas más graves que enfrenta la agricultura en el mundo y en nuestro país. Las plantas han desarrollado mecanismos para responder al estrés; entre éstos, se producen cambios en la expresión de los genes, para reprimir aquellos que no son importantes para la respuesta e inducir aquellos otros que resultan indispensables para que la planta pueda tolerar el estrés mediante el ajuste de su metabolismo, sus relaciones de agua y la protección de sus estructuras celulares. Se ha reportado que muchos de estos cambios a nivel molecular están regulados por pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (ARN) llamados microRNAs.

En el presente trabajo se aborda el estudio de cuatro plantas monocotiledóneas, arroz, maíz, sorgo y *Brachypodium distachyon* para identificar nuevos microRNAs que regulan la respuesta al estrés y cuyo patrón de expresión se encuentra conservado en monocotiledóneas. A través del análisis digital de la expresión de microRNAs en 8 bibliotecas de ARNs pequeños construidas a partir de estas especies, tratadas con condiciones normales de agua y con déficit hídrico o sequía, se identificaron 72 microRNAs inducidos y 106 reprimidos por el estrés. Se identificó además al microRNA166a-3p como un microRNA potencial para ser empleado como referencia, ya que muestra un perfil de expresión estable en las 4 especies y en todos los tratamientos. Adicionalmente se propone un método para la validación de los resultados obtenidos del análisis de las bibliotecas mediante PCR cuantitativa. Aplicando el método propuesto al análisis de 5 microRNAs, seleccionados por presentar patrones de expresión conservados en más de una especie, se confirmó la expresión diferencial de miR144b.2, miR444f y miR528-5p en respuesta a sequía.

Los resultados de este trabajo contribuyen a ampliar el conocimiento de nuevos microRNAs que participan en la respuesta al estrés en plantas monocotiledóneas, y cuyas funciones podrían ser clave para la tolerancia a la sequía en este grupo de plantas. El análisis funcional detallado de los microRNAs identificados permitirá explorar en un futuro cercano el uso de los microRNAs como herramientas para el mejoramiento biotecnológico de la tolerancia a sequía en especies monocotiledóneas de importancia económica.

Lista de abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AGO	Argonauta
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
cm	Centímetros
Ctrl	Control
DEPC	Dietilpirocarbonato
Fm	Fluorescencia máxima
Fv	Fluorescencia variable máxima
GI	Gen de interés
°C	Grados centígrados
g	Gramos
Ha	Hectáreas
h	Horas
<i>H. vulgare</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
Id	Identificador
Kg	Kilogramo
Km ²	Kilómetros cuadrados
L	Litros
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
m	Metros
MicroRNA	MicroARN
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molaridad
nM	Nanomolar
N	Normalidad
No.	Número
Ct	Número de ciclos para alcanzar el umbral
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>P. virgatum</i>	<i>Panicum virgatum</i>
<i>P. vulgaris</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>P. trichocarpa</i>	<i>Populus trichocarpa</i>
LEA	Proteínas de abundancia de embriogénesis tardía
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Relación de expresión
rpm	Revoluciones por minuto

<i>S. spp</i>	<i>Saccharum spp</i>
s	Segundos
Seq	Sequía
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional
<i>S. bicolor</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
T	Temperatura
Ta	Temperatura de alineamiento
Ton	Toneladas
<i>T. dicoccoides</i>	<i>Triticum dicoccoides</i>
VPM	Veces por millón
V	Volt
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La sequía y sus efectos

La sequía es un factor abiótico definido como la condición meteorológica natural que ocurre cuando la precipitación y la disponibilidad del agua en un período de tiempo y una región dados, son menores que el promedio histórico registrado, y cuando esta deficiencia es lo suficientemente grande y prolongada como para dañar las actividades humanas (NOAA, 2006).

Las principales causas de la sequía están relacionadas con cambios de la presión atmosférica y alteraciones en la circulación general de la atmósfera, la existencia de una espesa capa de polvo en la atmósfera, cambios en la temperatura de la superficie de los océanos y mares, así como incrementos en las concentraciones de dióxido de carbono (CO₂). Todos estos fenómenos ocasionan variaciones espacio-temporales de las precipitaciones (CENAPRED, 2012).

La sequía tiene efectos a diferentes niveles. A nivel económico ocasiona pérdidas en la producción de alimentos de origen vegetal y animal, repercutiendo en los costos de energía y de suministro de agua, además de pérdidas en actividades industriales y la consecuente alza de precios en el mercado. A nivel ambiental, daña la flora y la fauna silvestre, se incrementa la vulnerabilidad de los ecosistemas, se intensifican los procesos de erosión hídrica y eólica, se reduce la calidad del agua, se promueve la contaminación del aire y se afecta el ciclo hidrológico en general. A nivel social, hay escasez de alimentos, mal nutrición, disminución del nivel de vida, conflictos sociales por el uso del agua o de mejores tierras, incremento de la pobreza, migración, hacinamiento en las ciudades y abandono de tierras agrícolas (Ortega-Gaucin, 2012).

1.2 La sequía en el mundo

Más de 110 países sufren problemas relacionados con la sequía y la desertificación debido a las malas prácticas de gestión del suelo y al cambio climático (Fig. 1); cada año se pierden más de 12 millones de Ha de suelo productivo por causa de la desertificación. Las tierras áridas abarcan una superficie del 40% del suelo de nuestro planeta, ahí viven las personas más pobres del mundo y las más vulnerables al hambre (El economista, 2011). En la figura 1 se muestran datos del mes de marzo, en un evento de sequía que impactó fuertemente a México y al mundo en 2013.

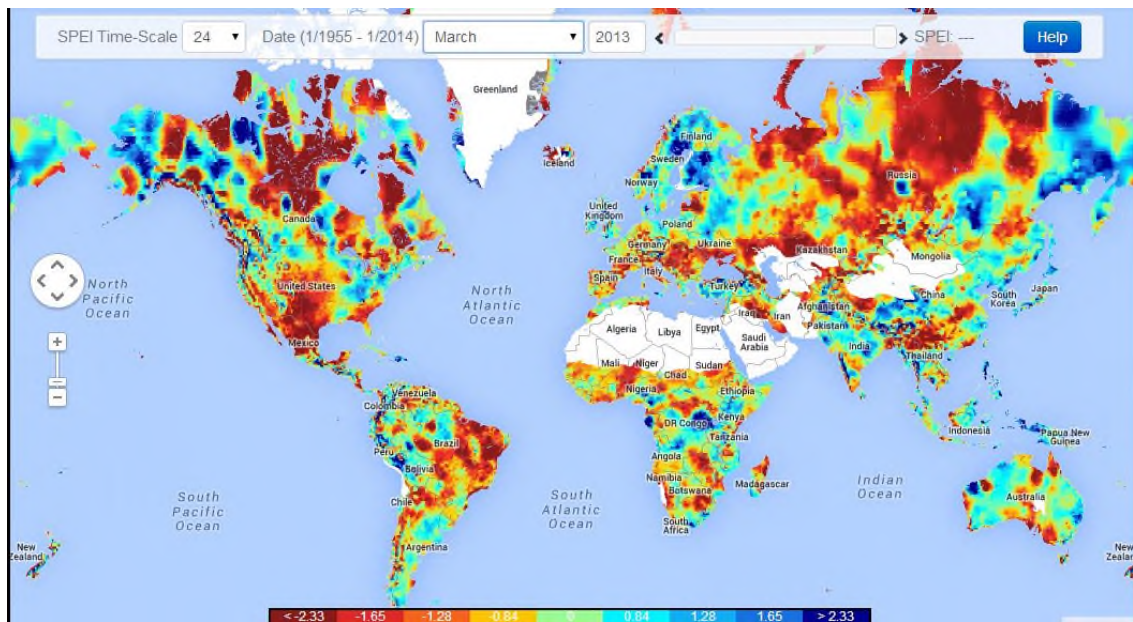


Figura 1. Distribución de la sequía en el mundo basado en mediciones de precipitación sobre la superficie, mediante el índice SPEI, llamado así por sus siglas en inglés (Standardized Precipitation-Evapotranspiration Index) (SPEI Global Drought Monitor, 2014).

Uno de los continentes más afectados por la sequía es África. Dos terceras partes del continente se componen de desiertos o tierras áridas. En el caso de América y el Caribe, a pesar de poseer bosques tropicales, alrededor del 25% de su territorio está compuesto de desiertos y zonas áridas (FAO, 2008). En Estados Unidos, la desertificación afecta a 30% de la superficie territorial (UNESCO, 2006).

Se prevé que para el año 2050, la población de la Tierra será de 9 mil millones de personas, lo que requerirá un aumento mundial de producción de alimento del 70% (FAO, 2009). Sin embargo, el panorama de la producción de alimentos no es alentador si consideramos que más del 50% de las tierras agrícolas se encuentran en situación de degradación moderada a severa, y que cada minuto se pierden 23 Ha de tierra productiva a causa de la degradación del suelo, lo que equivale a una pérdida de 12 millones de Ha y 20 millones de Ton de alimento (FAO, 2009).

1.3 La sequía en México

La agricultura es una de las actividades más importantes en México, con una fuerza de trabajo directa de más de 6 millones de personas (SIAP, 2013). La República Mexicana cuenta con una superficie de 1, 958,201 km², de los cuales el 66% corresponde a regiones áridas y semiáridas, con predominio de climas secos. La superficie agrícola de México en 2002 era de 31, 691,868 Ha, de las cuales, el 18% era de riego y el 82% de temporal (Benavides, 2002). Las superficies totales incluyen áreas agrícolas en descanso y abandonadas, pero abiertas al cultivo. Cifras más recientes refieren que el 26% de la agricultura en México se encuentra en superficie de riego (SIAP, 2013)

México es un país de contrastes en lo que se refiere al ciclo de lluvias, por lo que presenta problemas recurrentes de sequía a lo largo y ancho de su territorio (Saldaña-Zorrilla, 2007). El alto porcentaje de la superficie dedicada al cultivo de temporal puede explicar por qué la agricultura de temporal alcanza el índice más alto de siniestrabilidad del país, y que la sequía sea la causa del 80% de las pérdidas económicas debidas a factores ambientales adversos, seguida por las inundaciones (AGROASEMEX, 2006).

En los últimos diez años se ha incrementado el porcentaje de área afectada por la sequía en México. Además de esto, los eventos de sequía son más prolongados. En la figura 2, que muestra el porcentaje de área afectada por la sequía, se puede

apreciar que entre el año 2011 y 2012 se presentó una sequía prolongada con nivel de intensidad excepcional (CONAGUA, 2013).

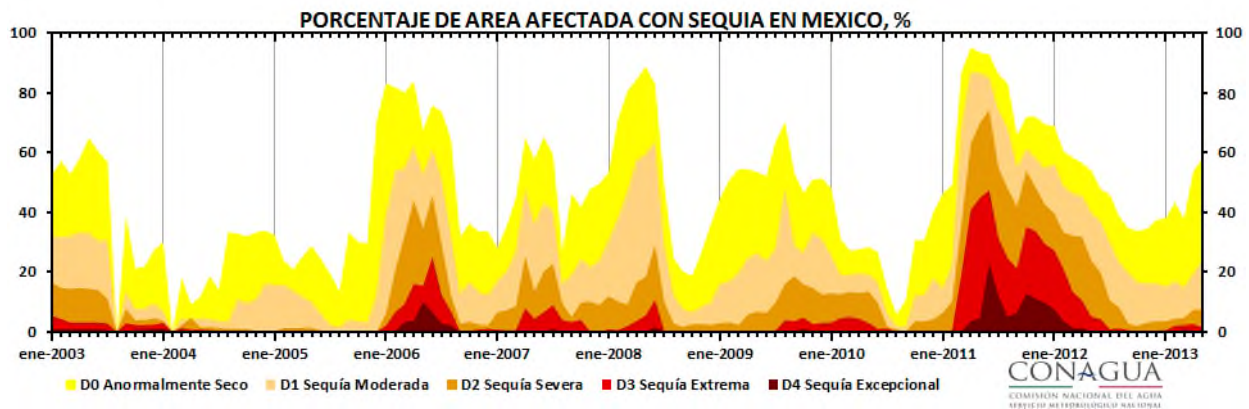


Figura 2. Frecuencia e intensidad de la sequía en México (2003-2013) y superficie afectada (CONAGUA, 2013).

Oficialmente se reconoce que en el 2009 se presentó en México la segunda peor sequía en 60 años, el 2010 fue el año más lluvioso del que se tenga registro y que, en el 2011, 40% del territorio mexicano ha registrado el peor año de sequías en las últimas siete décadas (El Economista, 2012). Estos datos reflejan el nivel de contraste que existe en el ciclo de lluvias de un año a otro. Se estima que 1.280 millones Km², de los 1.973 millones Km² del territorio nacional total de México, casi 65%, está afectado por la sequía (LaRouche, 2013).

La Comisión Nacional Forestal informó que existen 128 millones Ha afectadas por la sequía en México. La región norte es la más aquejada, seguida por la zona central (Informador, 2013). La Comisión de Agricultura y Ganadería del Senado de la República informó que los estados más afectados son Chihuahua, Durango, Coahuila, Zacatecas, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Aguascalientes, Sinaloa y Sonora (SIL, 2012).

Las pérdidas en cultivos debidas a la sequía ocasionan problemas económicos y de abastecimiento que obligan a la importación de productos. Las altas tasas de desertificación en el norte han causado la pérdida de millones de hectáreas de

diversos cultivos, resultado en la necesidad de importar decenas de toneladas de granos (ASERCA, 2013).

En el caso del maíz de cultivo en México, las pérdidas por sequía alcanzaron los 9,000 millones de pesos. En el caso del frijol —del cual se perdieron el 60% de las cosechas en el año 2011— fueron 6,000 millones de pesos los que los agricultores mexicanos dejaron de percibir, de acuerdo a información de la Secretaría de Agricultura. En Sinaloa, el principal productor de maíz en el país, la mitad de las cosechas se perdieron, con un total de 100,000 Ha afectadas (CNN-México, 2012).

En los primeros meses del año 2013 la sequía ya había provocado la pérdida de más de 90 mil Ha de cultivo de temporal. Se perdieron 87 mil Ha de sorgo, además de 3 mil 200 de cártamo. También se registraron problemas en las 42 mil Ha dedicadas al cultivo naranja, mandarina, toronja y limón italiano (La Jornada, 2013).

1.4 Plantas monocotiledóneas de importancia económica

Las monocotiledóneas son un grupo de plantas de gran importancia para la producción de alimentos y una alternativa para la producción de biocombustibles (FAO, 2009). Las monocotiledóneas como el sorgo, el trigo y el maíz constituyen el aporte principal de calorías para la alimentación humana y animal (Fig. 3).

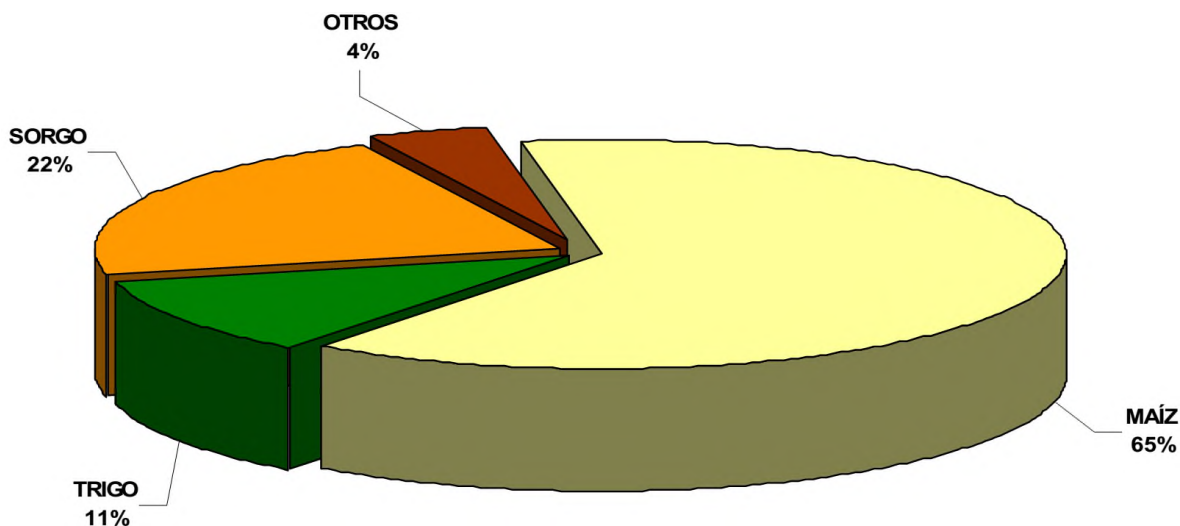


Figura 3. Producción de los principales cereales en México durante el periodo 1996-2006 (SIAP, 2012).

1.4.1 El maíz (*Zea mays*)

El maíz es la monocotiledónea de cultivo más importante de México desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social en relación con los demás cereales que se producen (Fig. 3). México es el séptimo mayor productor de maíz en el mundo (SIAP, 2013). Durante el periodo 1996-2006 se produjo un promedio anual de 19.3 millones de Ton de maíz, con un valor promedio anual de 29,090 millones de pesos corrientes (SIAP, 2012). En el año 2012 se cosecharon más de 22 millones de Ton de maíz blanco (SIAP, 2013)

A partir del maíz se obtiene una gran variedad de productos. Por ejemplo tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, entre otros.

La mayor parte del maíz producido en México se cultiva en superficie de temporal. En un periodo de 10 años, de 1996 a 2006, se registró que de la superficie anual sembrada en promedio, el 85.5% del total se cultivó en temporal, proporción que

representa 7,2 millones de Ha promedio anual; mientras que 1, 217,000 Ha se siembran bajo condiciones de riego, que representa 14.5% del total (SIAP, 2012).

El hecho que casi el total del maíz cultivado en México se cultive en superficie de temporal hace que esta monocotiledónea se encuentre constantemente amenazada por la sequía. En el 2012, México tuvo que importar 25% de su consumo de maíz, 51% de trigo y 75% de arroz, en tanto la sequía acabó con esas cosechas en estados importantes (CNA, 2013). Adicionalmente al problema de la sequía, México requiere realizar importaciones de maíz amarillo para satisfacer al sector pecuario. Para esto, por cada 1 peso que se obtiene por exportación de maíz, gasta 15 pesos por importarlo (SIAP, 2013).

1.4.2 El sorgo (*Sorghum bicolor*)

El sorgo es una planta monocotiledónea de alta importancia en México. Es el segundo producto más importante entre los granos básicos y el tercero en cuanto a superficie cultivada, superado solo por maíz (*Z. mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Galarza *et al.*, 2004). El sorgo ha sido calificado como grano forrajero y considerado por los productores pecuarios como sustituto del maíz (*Z. mays*), ya que se destina a la elaboración de alimentos balanceados, como alimento directo para aves, cerdos y bovinos.

El sorgo no se introduce en la alimentación directa del hombre, pero sí en forma indirecta, ya que se consume a través de alimentos de alto valor nutritivo, como son la carne de pollo, la carne de cerdo y el huevo. En menor medida se usa en la industria para la producción de almidón, aceites, alcohol y glucosa; además de harinas para alimentación humana y etanol como biocombustible, aspectos que están en proceso de desarrollo en el país (Galarza *et al.*, 2004; SIAP-SIACON, 2011)

México es el tercer productor de sorgo en el mundo, después de India y Nigeria, con una producción que representa el 11.9% del total mundial (54 millones de Ton

en 2011 en 35.5 millones de Ha). Los principales importadores de sorgo en el mundo son: México, la Unión Europea, Japón y Chile, con un valor total 1 530 millones de dólares para 2011. (FAOSTAT, 2011).

La producción de sorgo en México se ha incrementado 12% en promedio de los últimos siete años. Los principales estados productores son: Tamaulipas, Guanajuato, Sinaloa, Michoacán, Nayarit, Morelos y Jalisco, que en conjunto producen el 92%, con un valor total nacional de 22 185 millones de pesos (SIAP-SIACON, 2011). Aún cuando la producción de sorgo es alta en nuestro país, la demanda interna requiere ser complementada con volúmenes de importación para satisfacer las demandas del sector ganadero (SIAP, 2013).

En México el sorgo se cultiva tanto en riego (46%) como en temporal (54%) en los ciclos agrícolas primavera-verano (56%) y otoño-invierno (44%), con un rendimiento promedio anual por Ha de 3.4 Ton (6.1 para riego y 2.6 para temporal) (Financiera Rural, 2011).

1.4.3 El arroz (*Oryza sativa*)

En México el arroz es uno de los cuatro cultivos básicos en la alimentación de la población del país, después del maíz, el trigo y el frijol. En México, el arroz palay ocupa el sexto lugar en la producción de granos básicos, detrás del maíz, sorgo, trigo, frijol y cebada. De cada 1000 Ton de cereales que se producen en México, siete son de arroz (SIAP, 2013).

La proporción de participación de México en la producción mundial de arroz es baja; dos de cada diez mil Kg de arroz que se producen en el mundo, son mexicanos. Esto ubica a nuestro país en el lugar 63 de la lista de productores mundiales de arroz. Es además uno de los cultivos que está a la baja en México, puesto que en la última década disminuyó la superficie sembrada y el volumen de producción de este grano. En contraste, las importaciones de arroz se han mantenido a niveles elevados (SIAP, 2013).

El arroz es un cultivo con altos requerimientos de agua en las etapas iniciales de desarrollo. La sequía afecta negativamente su producción y es una de las causas principales de la disminución de la superficie destinada a este cultivo. En la temporada de Otoño-Invierno, la superficie sembrada de este cereal en el lapso 1990-2006 disminuyó en promedio 5.1% anual, que representó la pérdida de poco más de 11 mil Ha (SIAP, 2010). Esta disminución se explica por la falta de agua en Sinaloa, entidad que redujo sensiblemente la superficie de arroz desde 1993; no obstante fue la entidad que aportó el mayor volumen de arroz en ese lapso. Otros estados importantes en este ciclo son Campeche, Jalisco, Michoacán y Nayarit. Esos cinco estados aportaron más del 80% de la producción promedio registrada entre 1990 y 2006 que ascendió a 41.4 mil Ton (SIAP, 2010). El arroz es resistente a la sequía y puede cultivarse en suelos poco profundos y pedregosos, con la condición que no falte agua al inicio de su desarrollo (SIAP, 2010).

*1.5 La planta modelo *Brachypodium distachyon**

El maíz, el sorgo y el arroz son plantas de importancia económica de las cuales se tiene abundante información acerca de hábitos de crecimiento, tolerancia a diferentes tipos de estrés y potencial productivo. Adicionalmente, la comprensión de su biología y bioquímica, así como de sus mecanismos para responder al estrés, puede facilitarse mediante el estudio de plantas monocotiledóneas modelo.

B. distachyon es una planta monocotiledónea que crece en climas templados y que en los últimos años se ha establecido como modelo de estudio ideal ya que tiene un ciclo de vida corto, ocupa poco espacio y tiene un genoma pequeño totalmente secuenciado (IBI, 2010). *Brachypodium* presenta alta similitud con otras monocotiledóneas como el arroz, el sorgo y el trigo, lo que hace que los conocimientos biológicos que se obtengan en *Brachypodium* puedan ser rápidamente verificables y escalables a plantas de importancia económica (Opanowicz *et al.*, 2008). Esta planta posee además una gran diversidad de

variantes naturales con diferentes capacidades para tolerar la sequía (Luo *et al.*, 2011), lo que la convierte en un modelo adecuado para realizar el estudio de la respuesta al déficit hídrico (IBI, 2010).

1.6 Respuesta general de las plantas a la sequía

La sequía en el campo provoca déficit hídrico en las plantas. El déficit hídrico se define como la condición en la que el contenido de agua de un tejido o célula está por debajo del contenido de agua que presenta en el estado de mayor hidratación (Bray, 2007). El estrés por déficit hídrico ocasiona la disminución del crecimiento total de la planta y de su productividad, por lo que es uno de los problemas más importantes para la agricultura.

Durante su evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación tanto a nivel morfológico y celular para hacer frente a factores de estrés como la sequía (Nilsen y Orcutt, 1996). Las plantas presentan principalmente tres mecanismos de respuesta frente al déficit hídrico: el escape, la evasión y la tolerancia (Kramer, 1983) (Fig. 4).

El escape se caracteriza en las plantas por mostrar plasticidad, desarrollo fenológico rápido y adaptación de su ciclo vegetativo y reproductivo ante las condiciones climáticas adversas. Estos cambios tienen como consecuencia una alta tasa de supervivencia, pero muy baja productividad potencial. Se presenta floración y fructificación precoz (Bidinger y Hash, 2004).

La evasión comprende básicamente de cambios morfológicos y fisiológicos que retrasan la deshidratación en la planta para evitar llegar a un déficit hídrico, especialmente. El cierre estomático. Este ocurre mediante señales hormonales que conducen al cierre de estomas, los cuales son cavidades por las que se lleva a cabo el intercambio gaseoso en las plantas (Taiz y Zeiger, 1998; Sinha, 2004).

Otro cambio que ocurre en el mecanismo de evasión es la reducción de la transpiración, de la cual se encarga la cutícula. La cutícula es una cubierta

polimérica extracelular depositada en la parte externa de la pared celular (Cutler *et al.*, 1982). El estrés hídrico causa una desecación de la cutícula induciendo cambios estructurales que reducen su permeabilidad al vapor de agua. El tercer cambio es la reducción de la superficie de transpiración y consiste en el plegado o enrollamiento de las hojas para limitar la superficie expuesta (Blum, 1989) y en la abscisión foliar. El último cambio de la evasión es la adaptación de la raíces, consistente en el incremento de la superficie radicular y el crecimiento de raíces secundarias hacia la profundidad del suelo húmedo (Fig. 4).



Figura 4. Estrategias de adaptación de la planta frente al déficit hídrico.

El mecanismo de tolerancia se refiere a la capacidad de resistir en forma reversible la deshidratación de los tejidos. Permite a la planta ser funcional aún con pérdidas de agua y déficit hídrico. Turner (1986) definió la tolerancia y separó

los mecanismos en dos tipos: los destinados al mantenimiento de la turgencia celular (ajuste osmótico y ajuste elástico) y los que permiten la tolerancia a la deshidratación (tolerancia protoplasmática). El ajuste osmótico permite a las células mantener la presión hidrostática positiva (Yancey *et al.*, 1982), mediante la acumulación de solutos compatibles osmóticamente activos que son altamente solubles en agua como algunos aminoácidos y azúcares que permiten el mantenimiento de la turgencia con la disminución del potencial osmótico ante condiciones de estrés por sequía (Geiger y Servaites, 1991). El ajuste elástico es otro mecanismo para proteger el potencial de turgencia en células. Las paredes de las células vegetales presentan propiedades plásticas y elásticas. La plasticidad posibilita la extensión permanente de las células en crecimiento. La elasticidad permite cambios del potencial de turgencia en función de las variaciones de volumen celular. La tolerancia protoplasmática mantiene las células vivas a contenidos relativos de agua muy bajos. Suele darse en plantas poiquilohídricas las cuales son incapaces de retener agua y prevenir la desecación pero pueden recuperarse rápidamente de un estado totalmente deshidratado (Gibson, 1996).

Los mecanismos de respuesta al déficit hídrico pueden ser específicos del tipo de estrés, o bien, parte de una respuesta general para conferir protección básica (Kültz 2005) que actúa a varios niveles. Las hormonas vegetales como el ácido abscísico, las giberelinas y las auxinas juegan un papel relevante en la respuesta integral al estrés e inducen cambios en el desarrollo de las plantas (Wang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011).

Los mecanismos de adaptación fisiológica y morfológica que ocurren en las plantas ante condiciones de estrés por déficit hídrico se encuentran regulados por cambios al nivel molecular. Estos cambios implican la inducción y la represión de la expresión de genes. Las principales respuestas al estrés hídrico en la modificación de la expresión génica están relacionadas con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes y factores de transcripción (Zhu *et al.*, 2002).

1.7 La expresión en el flujo de la información genética

La información genética que se encuentra en el genoma de un organismo está constituida por ácido desoxirribonucleico (ADN) y está organizada en unidades llamadas genes, así como en regiones intergénicas y reguladoras. Los genes son unidades que contienen información para la producción de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Esta información codificada a través del orden de 4 bases: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). El proceso para que un gen se exprese requiere una serie de pasos. El primer paso en la expresión de los genes es la transcripción (Campos-De Quiroz, 2002) (Fig. 5).

En la transcripción, una región del genoma en la cual se encuentra contenida un gen, es reconocida por factores proteicos y copiada en forma de ARN mediante la actividad de una enzima llamada ARN polimerasa. El ARN sintetizado, que se denomina ARN mensajero o transcrito, es liberado hacia el citoplasma en células eucariotas, donde es reconocido por la maquinaria celular de síntesis de proteínas, llamadas ribosomas (Fig. 5). Ahí, la información del ARN es leída a intervalos de tres bases y traducida a un código de aminoácidos en secuencia. Para cada serie de tres bases corresponde un aminoácido, mismo que es acoplado mediante un ARN de transferencia o ARNt, con lo que se forma una cadena de proteína a partir de cada transcrito. De esta forma, el segundo paso de la expresión de los genes es la producción de sus proteínas.

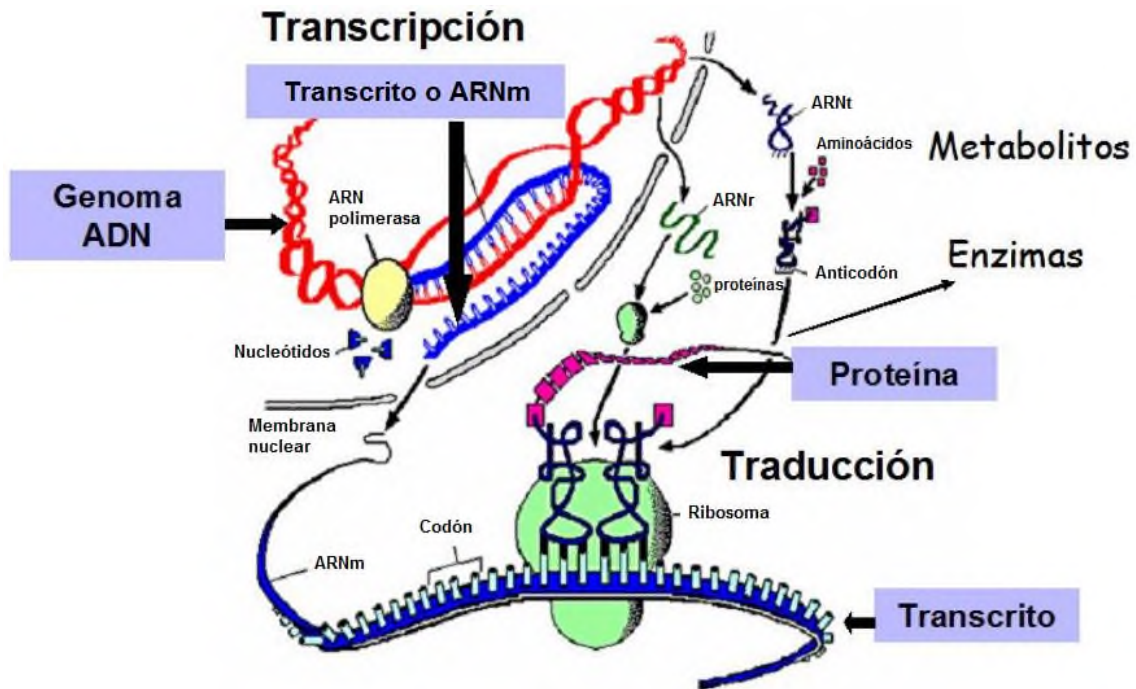


Figura 5. El flujo de la información genética. (Modificado de Campos-De Quiroz, 2002).

Al conjunto total de transcritos de un organismo o célula, sintetizados bajo cualquier condición, estímulo ambiental, estímulo endógeno, tipo de tejido, etapa de desarrollo o condición fisiológica, se le denomina transcriptoma (Campos-De Quiroz 2002). Al conjunto de proteínas se le llama proteoma. Se espera que en respuesta a alguna condición o estímulo, como el déficit hídrico, la expresión de genes sufra modificaciones, lo que implica que algunos genes dejarán de expresarse (sus transcritos ya no se sintetizarán), mientras que otros aumentarán su expresión (sus transcritos se acumularán): en otras palabras, se alterará el transcriptoma de la planta, y en consecuencia, potencialmente se alterará también el proteoma.

1.8 Respuesta molecular al estrés por sequía

Los trabajos pioneros, como el de Seki *et al.* (2001), analizaron el transcriptoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* para detectar cambios en perfiles de expresión en respuesta al déficit hídrico. Este estudio reveló que un gran número de genes de respuesta al estrés inducen su expresión y tienen funciones en el metabolismo, la transducción de señales, la regulación de la transcripción, la síntesis de hormonas y osmolitos, el transporte de agua e incluso, la protección directa de proteínas y estructuras celulares.

A partir de los estudios en *Arabidopsis*, el transcriptoma de la respuesta en plantas de cultivo, como el arroz, el maíz y el frijol, también se ha descrito (Yang *et al.*, 2004; Barrera-Figueroa *et al.*, 2007).

Dentro de los genes más comunes que se inducen por estrés osmótico se encuentran los que codifican proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins). Estas proteínas se acumulan durante el estado final de la desecación de la semilla y se han encontrado inducidas en estrés por sequía (Barrera-Figueroa *et al.*, 2007). Las proteínas LEA son proteínas altamente hidrofílicas, ricas en glicina y en aminoácidos cargados que se caracterizan por no tener una estructura globular, y ser, por tanto, resistentes a la coagulación por efecto de las altas temperaturas (Dure III, 1993).

Se ha observado que la expresión de las enzimas clave en la biosíntesis de osmolitos durante el déficit hídrico permite el ajuste osmótico en las células. Los osmolitos más comunes son la prolina y otros aminoácidos, las poliaminas y los compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaina, la sacarosa, los polioles, los azúcares-alcoholes y otros oligosacáridos (Tamura *et al.*, 2003); algunos de estos osmolitos protegen además a las células de las especies reactivas de oxígeno (Pinhero *et al.*, 2001).

Cuando disminuye el contenido de agua en las hojas, el cierre de estomas reduce la disponibilidad de CO₂ y produce especies reactivas como el superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Durante la condición de estrés se ha visto la

acumulación enzimas antioxidantes que, junto con compuestos no proteicos, detoxifican a las plantas de los radicales libres (Bohnert y Sheveleva, 1998) Entre las principales enzimas están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR) y la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) (Apel y Hirt, 2004). Otro grupo de proteínas que se expresan durante estrés hídrico incluye las de choque térmico (HSP), que protegen a otras proteínas de la desnaturalización y así evitan la pérdida de función. Las acuaporinas que son proteínas que controlan el flujo de agua a través de la membrana plasmática (Johansson *et al.*, 2000) juegan un papel crítico en la tolerancia de las plantas la déficit hídrico (Maurel y Chrispeels, 2001).

Estos estudios demuestran que la respuesta molecular al estrés por déficit hídrico implica cambios funcionales diversos para ajustar la fisiología y el desarrollo de las plantas a la limitación de agua (Fig. 6).

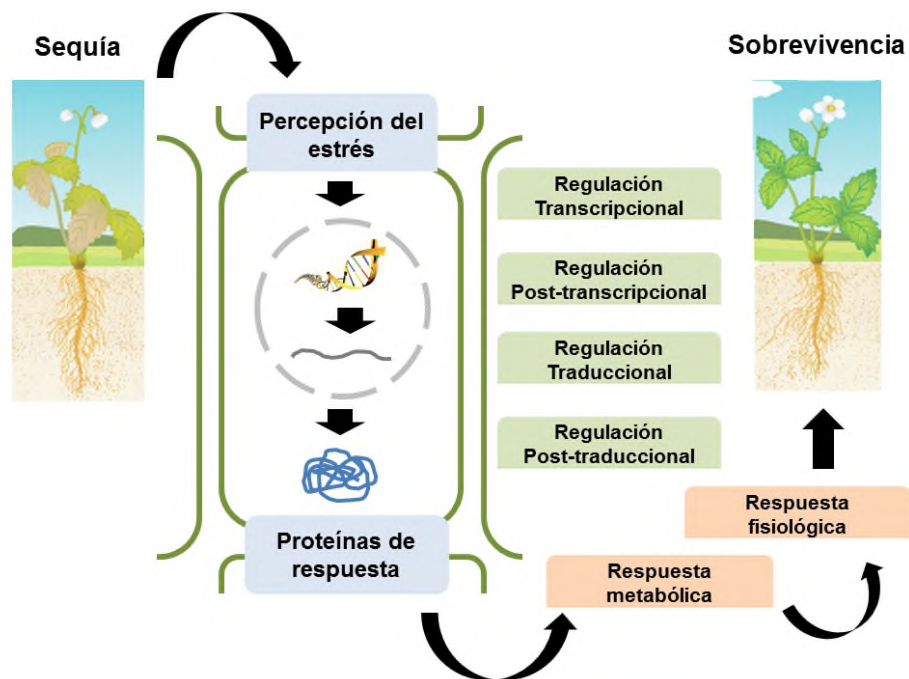


Figura 6. Mecanismos de regulación de la respuesta molecular al estrés por sequía (Covarrubias, 2007).

1.9 Regulación de la respuesta molecular al estrés

La expresión de los genes en respuesta al déficit hídrico está sujeta a un control estricto, ya que ésta dicta la forma en que una planta responde al estrés y determina su capacidad para tolerarlo. Uno de los puntos de regulación de la expresión más importantes lo constituye el momento en que un gen es activado para su transcripción. Para esto, una región del gen debe ser reconocida directamente por factores proteicos, llamados factores de transcripción. Enseguida, la maquinaria de síntesis de ARN debe iniciar la transcripción del gen. Esto se denomina regulación transcripcional (Singh, 1998).

Otro punto de control ocurre cuando el transcrito ya ha sido producido y debe ser procesado o modificado para ser transportado hacia los ribosomas, donde ocurrirá la síntesis de la proteína. Este punto de control es la regulación postranscripcional (Filipowicz *et al.*, 2008).

1.10 Los microRNAs y la regulación postranscripcional

Los microRNAs son pequeñas moléculas de ARN, de 21 a 24 bases de longitud. Se producen a partir de un precursor de ARN largo que es sintetizado por la ARN polimerasa II. El producto de ARN se dobla para formar una estructura estable de horquilla (Bartel, 2004) (Fig. 7). Las enzimas que procesan al ARN, como Dicer-like1 (DCL1), actúan sobre el tallo de la horquilla para cortarlo y producir ARN de doble cadena de 20-24 nucleótidos, mismo que será exportado del núcleo hacia el citoplasma (Chen, 2005). Una de las cadenas es llamada microRNA* y se cree que es degradada, mientras la otra cadena o microRNA maduro es incorporada en un complejo de silenciamiento inducido por ARN llamado RISC, que contiene proteínas llamadas Argonauta (AGO) y que permite su reconocimiento con la secuencia de transcritos blanco (Khraiwesh *et al.*, 2011) (Fig. 7).

Los microRNAs actúan como reguladores negativos de la expresión a nivel postranscripcional. Los microRNAs maduros ejercen control sobre los transcritos blanco, a los que reconocen por complementación de sus bases (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Dalmay, 2006). Las bases de la pequeña cadena de ARN de un

microRNA encuentran una región en el transcrito blanco en la que se complementan casi de forma perfecta. Una vez reconocidos, los marcan para su degradación. Con esto, la expresión del transcrito blanco, y por tanto, del gen, es bloqueada en ese punto (Fig. 7). El transcrito es generalmente degradado y con esto ya no será transportado a los ribosomas para su traducción a proteína. También puede suceder que el transcrito no sea degradado de inmediato después de haber sido reconocido por el microRNA. En este caso, un segundo punto de control es la inhibición de la síntesis de la proteína. El transcrito que acarrea un microRNA no será tomado por los ribosomas para sintetizar la proteína.

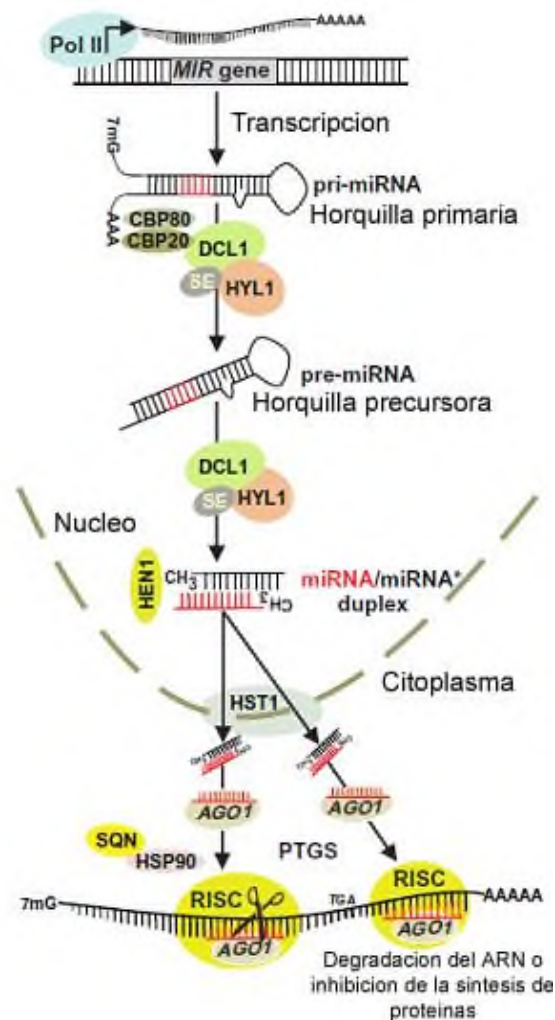


Figura 7. Biogénesis y modo de acción de los microRNAs (Khraiwesh *et al.*, 2011).

Si bajo ciertas condiciones se reprime la expresión de un microRNA, se tendrá como resultado que su transcrito blanco será expresado y conducido hasta la síntesis de proteínas. Si en cambio, alguna condición induce la producción de un microRNA, el resultado es que su transcrito blanco será silenciado, es decir, que será bloqueado en su camino hacia la expresión a proteína. Este proceso es parte del silenciamiento génico postranscripcional, o PTGS, por sus siglas en inglés (Vaucheret, 2006).

1.11 Los microRNAs en la respuesta al estrés

Los microRNAs son reguladores con un papel clave en la expresión de los genes y actúan en diversos aspectos de la biología de las plantas, tales como la germinación, el crecimiento, la morfología y el desarrollo (Reinhart *et al.*, 2002). El análisis funcional de microRNAs ha revelado su implicación en múltiples procesos biológicos y metabólicos en plantas, regulando el desarrollo de órganos, la señalización hormonal, la transición al estado maduro y la identidad floral. Al mismo tiempo, están involucrados en la respuesta molecular a una variedad de estrés abiótico, como el frío, la alta salinidad y la sequía. El trabajo pionero realizado por Sunkar *et al.* (2004) reportó por primera vez la alteración de los niveles de microRNAs en respuesta al estrés por sequía, frío y alta salinidad, con base en un estudio con *A. thaliana* que incluyó la construcción de bibliotecas de ARNs pequeños y su secuenciación por métodos clásicos. En este trabajo, se identificó al miR393 que se induce por sequía, salinidad, frío y ácido abscísico. Otros microRNAs de respuesta al estrés fueron miR397b, miR402, miR319c y miR389a.

En estudios recientes se ha demostrado que varios microRNAs son inducidos por la sequía en *Arabidopsis*, entre éstos miR168, miR171, miR396, miR156 y miR394 (Liu *et al.*, 2008). Esto significa que no solo el transcriptoma, sino también los microRNAs se inducen o reprimen durante el estrés, y que en parte, la regulación del transcriptoma en respuesta al estrés está a cargo de los microRNAs. En la mayor parte de los casos, los microRNAs de sequía regulan la expresión de factores de transcripción (Tabla 1; Zhang *et al.*, 2006; Chitwood *et al.*, 2007; Reyes

y Chua, 2007). Los factores de transcripción pueden a su vez regular a familias completas de genes, lo que coloca a los microRNAs en el más alto nivel de regulación de la expresión, incluso por encima de algunos factores de transcripción. Por ejemplo, miR169 es reprimido por estrés, liberando la expresión de su gen blanco NFYA5, que es un factor de transcripción importante para la tolerancia a la sequía (Li *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se enlistan microRNAs de respuesta al estrés que se han reportado en diversas especies vegetales.

Tabla 1: Algunos microRNAs de respuesta a sequía identificados en plantas.

microRNA	Organismo	Gen blanco	Función	Referencia
<i>Inducidos</i>				
miR157	<i>A. thaliana</i>	SBP-LIKE	Factor de transcripción	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR167	<i>A. thaliana</i>	ARF	Factor de transcripción	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR168	<i>A. thaliana</i>	AGO	Biogénesis de pequeños ARNs	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR169	<i>O. sativa</i>	MtHAP2-1	Diferenciación celular	Zhao <i>et al.</i> , 2007
miR171	<i>A. thaliana</i>	SCL	Factor de transcripción	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR319/159	<i>A. thaliana</i>	TCP/MYB	Factor de transcripción	Sunkar <i>et al.</i> , 2004 ; Liu <i>et al.</i> , 2008.
miR393	<i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>M. truncatula</i> , <i>P. vulgaris</i>	TIR1/AFB	Factor de transcripción	Sunkar <i>et al.</i> , 2004; Zhao <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2008; Arenas-Huerta <i>et al.</i> , 2009
miR396	<i>A. thaliana</i>	GRF	Factor regulador de crecimiento	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR397	<i>A. thaliana</i>	Laccase	Estrés oxidativo	Sunkar <i>et al.</i> , 2004
miR398	<i>M. truncatula</i>	CSD	Estrés oxidativo	Trindade <i>et al.</i> , 2010
miR408	<i>A. thaliana</i> , <i>M. truncatula</i>	Plastocyanin	Estrés oxidativo	Trindade <i>et al.</i> , 2010
<i>Reprimidos</i>				
miR169	<i>A. thaliana</i>	NFY	Factor de transcripción	Li <i>et al.</i> , 2008
miR156	<i>O. sativa</i>	SBP-LIKE	Factor de transcripción	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR168	<i>O. sativa</i>	AGO	Biogénesis de pequeños ARNs	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR172	<i>O. sativa</i>	AP2-LIKE	Factor de transcripción	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR319	<i>O. sativa</i>	TCP	Factor de transcripción	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR396	<i>O. sativa</i>	GRF	Factor regulador de crecimiento	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR397	<i>O. sativa</i>	Laccase	Estrés oxidativo	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR408	<i>O. sativa</i>	Plastocyanin	Estrés oxidativo	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1446 a-e	<i>P. trichocarpa</i>	GRML	factor regulador de crecimiento	Lu <i>et al.</i> , 2008
miR1447	<i>P. trichocarpa</i>	Ankyrin repeat	Interacción proteína-proteína	Lu <i>et al.</i> , 2008
miR1450	<i>P. trichocarpa</i>	L-RTMK	Transducción de señales	Lu <i>et al.</i> , 2008

1.12 *MicroRNAs* de respuesta a sequía en monocotiledóneas

Los primeros *microRNAs* de respuesta a la sequía se aislaron en *A. thaliana* (Sunkar *et al.*, 2004); a éstos se han sumado aquellos identificados en diferentes especies, incluyendo plantas de cultivo (Arenas-Huertero *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Kantar *et al.*, 2011; Barrera-Figueroa *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012; Barrera-Figueroa *et al.*, 2012). Dentro del grupo de las monocotiledóneas, *Z. mays* (maíz), *O. sativa* (arroz), *Triticum dicoccoides* (trigo), *B. distachyon*, *Panicum virgatum* (switchgrass), *Hordeum vulgare* (cebada) y *Saccharum spp.* (caña de azúcar) han sido objeto de investigación para identificar *microRNAs* de respuesta a sequía (Tabla 2).

Tabla 2. MicroRNAs de respuesta al estrés por sequía identificados en plantas monocotiledóneas

microRNA	Organismo	Patrón de expresión	Conservación	Referencias
miR156	<i>H. vulgare</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>Z. mays</i> , <i>B. distachyon</i>	Inducido	C	Kantar <i>et al.</i> , 2010; Lv <i>et al.</i> , 2010; Bertolini <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2013
miR159	<i>Z. mays</i>	Inducido	C	Li <i>et al.</i> , 2013
miR160	<i>O. sativa</i> , <i>P. virgatum</i> , <i>S. spp.</i>	Inducido	C	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012; Ferreira <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2013.
miR162	<i>Z. mays</i> , <i>P. virgatum</i>	Inducido	C	Sun <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2013
miR166	<i>Z. mays</i> , <i>T. spp.</i>	Reprimido	C	Kantar <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>H. vulgare</i>	Inducido		Kantar <i>et al.</i> , 2010
miR164	<i>S. spp.</i>	Inducido	C	Gentile <i>et al.</i> , 2013
miR167	<i>Z. mays</i> , <i>O. sativa</i>	Inducido	C	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>Z. mays</i>	Reprimido		Wei <i>et al.</i> , 2009
miR168	<i>Z. mays</i> ,	Reprimido	C	Wei <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2013
miR169	<i>S. spp</i> , <i>B. distachyon</i>	Reprimido	C	Bertolini <i>et al.</i> , 2013; Ferreira <i>et al.</i> , 2012
	<i>O. sativa</i>	Inducido		Zhao <i>et al.</i> , 2007
miR170	<i>O. sativa</i>	Reprimido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR171	<i>H. vulgare</i>	Inducido	C	Kantar <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. spp</i>	Reprimido		Ferreira <i>et al.</i> , 2012
miR172	<i>O. sativa</i> , <i>S. spp.</i>	Reprimido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010;

				Ferreira <i>et al.</i> , 2012
miR319	<i>Z. mays</i>	Inducido	C	Li <i>et al.</i> , 2013
miR393	<i>S. spp</i> , <i>O. sativa</i>	Inducido	C	Gentile <i>et al.</i> , 2013; Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
	<i>S. spp</i>	Reprimido		Ferreira <i>et al.</i> , 2012
miR394	<i>O. sativa</i> , <i>S. spp</i>	Inducido	C	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012; Ferreira <i>et al.</i> , 2012
	<i>S. spp</i>	Reprimido		Gentile <i>et al.</i> , 2013
miR395	<i>O. sativa</i>	Inducido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
	<i>Z. mays</i>	Reprimido		Li <i>et al.</i> , 2013
miR396	<i>S. spp</i> , <i>T. spp.</i> , <i>Z. mays</i> , <i>B. distachyon</i>	Reprimido	C	Bertolini <i>et al.</i> , 2013; Ferreira <i>et al.</i> , 2012; Kantar <i>et al.</i> , 2011 Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>O. sativa</i> , <i>H. vulgare</i>	Inducido		Lv <i>et al.</i> , 2012; Barrera- Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR397	<i>O. sativa</i>	Reprimido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. spp</i>	Inducido		Gentile <i>et al.</i> , 2013
miR398	<i>T. spp.</i> , <i>Z. mays</i>	Inducido	C	Kantar <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013
miR399	<i>Z. mays</i> , <i>S. spp</i>	Reprimido	C	Gentile <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. spp.</i> , <i>H. vulgare</i>	Inducido		Ferreira <i>et al.</i> , 2012; Lv <i>et al.</i> , 2012.
miR408	<i>O. sativa</i>	Reprimido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
	<i>H. vulgare</i>	Inducido		Kantar <i>et al.</i> , 2010
miR474	<i>T. spp.</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Z. mays</i>	Inducido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010; Kantar <i>et al.</i> , 2011 ; Li <i>et al.</i> , 2013.

miR528	<i>T. spp., Z. mays</i>	Reprimido	NC	Kantar <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013 ; Wei <i>et al.</i> , 2009
	<i>S. spp., B. distachyon</i>	Inducido		Bertolini <i>et al.</i> , 2013; Gentile <i>et al.</i> , 2013; Ferreira <i>et al.</i> , 2012
miR529	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
	<i>O. sativa</i>	Inducido		Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR530	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR810	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR827	<i>Z. mays</i>	Inducido	C	Li <i>et al.</i> , 2013
miR845	<i>O. sativa</i>	Inducido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR851	<i>O. sativa</i>	Inducido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR854	<i>O. sativa</i>	Inducido	C	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR896	<i>T. spp., O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010; Kantar <i>et al.</i> , 2011
miR901	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR903	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1030	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1035	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1050	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1088	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1125	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1126	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1428	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR1432	<i>Z. mays</i>	Inducido	NC	Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. spp.</i>	Reprimido		Gentile <i>et al.</i> , 2013;

				Ferreira <i>et al.</i> , 2012.
miR1450	<i>T. spp.</i>	Inducido	NC	Kantar <i>et al.</i> , 2011
miR1866	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR1867	<i>T. spp.</i>	Inducido	NC	Kantar <i>et al.</i> , 2011
miR1874	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR1877	<i>O. sativa</i>	Reprimido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR2275	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012
miR2871	<i>O. sativa</i>	Inducido	NC	Barrera-Figueroa <i>et al.</i> , 2012

C: Conservado; NC: No Conservado.

1.13 Métodos para la identificación de microRNAs de respuesta al estrés

La identificación de microRNAs regulados por estrés sigue un principio general simple: los niveles de expresión de microRNAs son cuantificados y comparados en muestras control y tratadas por estrés, y los microRNAs que muestran una acumulación significativamente alta o baja en las muestras tratadas con estrés son microRNAs activados o encendidos, o microRNAs apagados o reprimidos por el estrés, respectivamente.

Los primeros reportes que permitieron demostrar la participación de microRNAs en la respuesta a estrés abiótico estuvieron basados en la construcción de bibliotecas de ARNs pequeños y su secuenciación por tecnologías tradicionales, como la secuenciación de Sanger. Una vez secuenciados, los microRNAs eran cuantificados en bibliotecas control y de estrés y comparados para identificar aquellos microRNAs que presentaban una acumulación diferencial en respuesta al estrés, es decir, aquellos que se acumulaban o se reprimían preferentemente en la condición de estrés (Sunkar *et al.*, 2004; Arenas-Huertero *et al.*, 2009). Sin embargo, la secuenciación tradicional sólo permite una profundidad limitada de secuenciación. La profundidad de la secuenciación es una medida directa del alcance que tiene la técnica para secuenciar un gran número de moléculas en una muestra y detectar, incluso, a moléculas que se presentan en bajo número de copias o de baja abundancia. Así, una profundidad elevada de secuenciación generalmente permite cubrir un alto porcentaje del total de moléculas presentes en la muestra.

Al emplear métodos de secuenciación tradicionales, no se podía obtener una medida confiable de la expresión diferencial de los microRNAs en las bibliotecas debido al bajo número de lecturas o frecuencias en que aparece una secuencia. De esta forma, el descubrimiento de microRNAs de respuesta a sequía se limitaba principalmente a microRNAs que son muy abundantes, y estos son generalmente microRNAs conservados.

Debido a la baja sensibilidad de los métodos de secuenciación tradicionales, los ensayos Northern Blot fueron en su momento la única forma posible de validar que un microRNA estaba regulado por el estrés. Adicionalmente, los ensayos Northern Blot también poseen un bajo nivel de detección, por lo que resultaba difícil identificar microRNAs asociados al estrés que se expresaban a una abundancia relativa baja. Todo lo anterior tuvo como consecuencia que la gran mayoría de los microRNAs de respuesta a estrés que se identificaron al inicio fueran microRNAs conservados de alta abundancia.

Con el paso del tiempo se desarrollaron nuevas tecnologías de secuenciación masiva. Entre otras, la tecnología de secuenciación por síntesis, lanzada en 2007 por la compañía Solexa (actualmente Illumina), provee la cobertura más alta de microRNAs maduros. Esto hace posible detectar microRNAs expresados diferencialmente con base en comparaciones de frecuencia de lecturas en bibliotecas de condiciones de estrés y control. Este tipo de análisis es conocido como análisis digital de la expresión y se había implementado anteriormente para analizar los patrones de expresión en bibliotecas de ADN complementario (ADNc) (Audic y Claverie, 1997).

La identificación de microRNAs de respuesta al estrés puede realizarse también con el uso de la tecnología de microarreglos (Liu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008; Kantar *et al.*, 2011). En esta estrategia, las secuencias maduras de microRNAs conocidos se colocan en un chip de microarreglo. Las muestras control y estrés se marcan y se hibridan al microarreglo. Los microRNAs que difieren significativamente en la intensidad de sus señales son detectados como regulados por estrés.

Comparando con el análisis digital de la expresión mediante secuenciación (Illumina), los microarreglos puede ser la opción más económica, especialmente cuando el número de muestras es grande. Sin embargo, el análisis de expresión se limita a los microRNAs conocidos que se colocan en el chip. Por lo tanto, los microarreglos son sólo factibles para especies cuyos microRNAs han sido estudiados extensivamente (Liu *et al.*, 2008).

Una vez que los microRNAs de respuesta al estrés se identifican, el siguiente paso es realizar un análisis detallado de la expresión de microRNAs específicos. Para esto se pueden realizar ensayos Northern Blot. Sin embargo, si se trata de detectar microRNAs de baja abundancia, es recomendable emplear PCR cuantitativa o qPCR.

1.13.1 PCR cuantitativa

La técnica de PCR cuantitativa qPCR, también llamada PCR en tiempo real o qPCR, permite analizar la formación de productos de PCR a lo largo de los ciclos de una reacción de amplificación. A diferencia de la PCR convencional, o de punto final, no sólo permite la observación de la formación de un producto de reacción al término de un programa de ciclado, sino además permite cuantificar su producción ciclo a ciclo mediante el uso de fluoróforos como SYBRGreen, que se intercala en las cadenas dobles de ADN elevando su emisión de fluorescencia, o bien, con sondas que se activan por la amplificación (Benes y Castoldi, 2010).

Con esto es posible observar la cinética de formación de un producto específico en una muestra. La cantidad de producto, y por tanto la fluorescencia obtenida al transcurrir determinado número de ciclos de una reacción de PCR es directamente proporcional a la cantidad de moléculas específicas que contenía la muestra molde al inicio (Agilent, 2012). En la figura 8 se observa que el número de ciclos, o Ct, necesarios para alcanzar un valor umbral de fluorescencia será bajo si la muestra inicial tenía un alto número de copias del gen en cuestión, como en el caso de la muestra 1. En cambio, el número de ciclos Ct necesarios para alcanzar el umbral será elevado cuando se trate de una muestra inicial con bajo número de copias del gen, como en el caso de la muestra 3. Por lo tanto, el valor de Ct está en proporción inversa con la abundancia del gen de interés en la muestra.

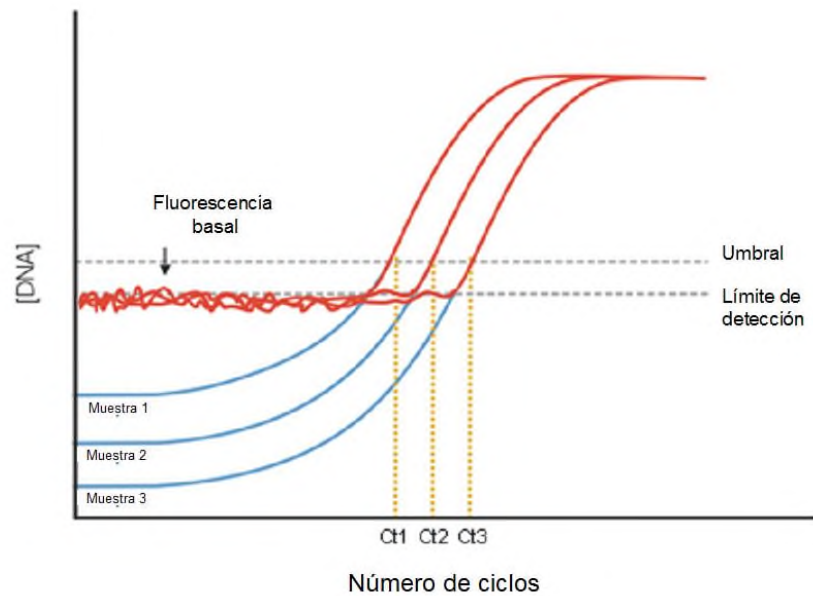


Figura 8. Fundamento de la detección de fluorescencia en tiempo real y la cuantificación de la concentración de un gen usando el valor Ct (Agilent, 2012).

La qPCR es aplicable al estudio de los microRNAs. Se han reportado diversos métodos para cuantificar la expresión de microRNAs que se basan en la detección y cuantificación de las formas maduras del microRNA (Chen *et al.*, 2005), o bien, las formas precursoras (Schmittgen *et al.*, 2004; 2008). En cuanto se refiere al sistema de detección, el método más económico es el de SYBRGreen.

Cuando se trata de comparar la expresión relativa de un gen de interés en dos muestras, por ejemplo, en una muestra control no tratada, y en otra tratada o muestra problema, se aplica alguno de los métodos reportados. El método $\Delta\Delta Ct$ es uno de los más empleados para la cuantificación de niveles de expresión de ARNs. El método $\Delta\Delta Ct$ consiste en el uso de un gen de referencia, cuya expresión no se altera entre las muestras a analizar, que sirve para normalizar el nivel de expresión del gen o ARN de interés (GI). Se basa en la premisa de que cualquier cambio en el valor de Ct del gen de referencia tiene un efecto equivalente en el cambio que se registra para el valor de Ct del gen de interés. Así, el cambio en la expresión de un gen de interés, medido a través del nivel de

acumulación de su transcrito, se determina con la ecuación 1 (Livak y Schmittgen, 2001):

$$ER = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad [Ec. 1]$$

donde, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{GI} - Ct_{REF})_{Problema} - (Ct_{GI} - Ct_{REF})_{Control}$

REF: Gen de referencia; GI: Gen de interés; Problema: condición bajo estudio; Control: condición control.

1.14 Conservación de microRNAs

A partir de estudios realizados para identificar microRNAs se ha observado que una fracción de microRNAs se encuentra presente en todas las plantas. Por ejemplo, microRNAs como miR156, aislado por primera vez en *A. thaliana*, se han encontrado también en el resto de las plantas analizadas. Estos microRNAs se conocen como microRNAs conservados y generalmente tienen niveles de expresión elevados. El análisis funcional de microRNAs conservados indica que participan en la regulación de procesos vitales y básicos para cualquier planta (Lelandais-Brière *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013).

Los microRNAs conservados constituyen sólo una pequeña proporción del total de microRNAs en plantas. Del total de familias de microRNAs existentes, sólo alrededor de 20 están conservadas (Axtell y Bowman, 2008). En contraste, existe una fracción de microRNAs que se conserva sólo entre plantas del mismo grupo, lo que indica un alto grado de especialización de la función. Adicionalmente, el gran número de microRNAs que son específicos de especie (no conservados) sugiere que los genes de microRNAs son frecuentemente creados y eliminados.

Dentro de los microRNAs que se han asociado al estrés abiótico en monocotiledóneas, muchos pertenecen a familias de microRNAs conservados (Tabla 2). Estos se conservaron por selección natural ya que su función es

necesaria para la supervivencia. Sin embargo, aún cuando se encuentren conservados, existen evidencias que sugieren que existe un grado de diversificación funcional de los microRNAs en diferentes especies (Cuperus *et al.*, 2011).

Cuando se analizan los microRNAs de respuesta a sequía en plantas monocotiledóneas presentados en la tabla 2, se observa que, por ejemplo, el microRNA conservado miR169 se expresa en direcciones opuestas en caña de azúcar, arroz y maíz. Por otra parte, los microRNAs no conservados también muestran diversificación funcional. Por ejemplo, el miR528 que se expresa en forma opuesta en plantas diferentes. Esta diversidad puede presentarse incluso dentro de la misma especie durante diferentes momentos del estrés o diferentes intensidades de sequía. Un ejemplo de lo anterior es el microRNA529, el cual se expresa de forma opuesta en arroz (Tabla 2).

2. JUSTIFICACIÓN

Como consecuencia del cambio climático, el ciclo de lluvias ha experimentado alteraciones ocasionando inundaciones o sequías severas en sitios geográficos de forma inusual. Ante este panorama se plantea para la humanidad el reto de mantener y garantizar la productividad de plantas de cultivo bajo condiciones ambientales adversas (Boyer, 1982; Gutiérrez-Bonilla *et al.*, 2006; Saldaña-Zorrilla, 2007). La sequía ejerce uno de los mayores impactos en la productividad de plantas de cultivo en el campo, ocasionando hasta el 80% de las pérdidas económicas debidas a factores ambientales adversos (Agroasemex, 2006), y colocando a la agricultura como la actividad productiva económicamente más vulnerable en nuestro país. Entre los cultivos más importantes en México que son afectados por la escasez de agua, se encuentran varias plantas monocotiledóneas como el maíz, el sorgo, la caña de azúcar y el arroz.

La tolerancia a la sequía es una característica importante para una agricultura sustentable. Además es una característica cuantitativa que depende de mecanismos de adaptación a nivel genético, bioquímico y fisiológico, y que por lo tanto requiere ser estudiada a fondo. El conocimiento generado en años recientes sobre el control de la expresión señala a los miRNAs como elementos clave en la regulación del desarrollo o de las respuestas a estímulos ambientales como la sequía.

Por todo lo anterior, el presente trabajo explora la conservación de la respuesta a la sequía mediada por microRNAs en plantas monocotiledóneas. Se hace referencia a dos tipos de conservación: por una parte la conservación de un microRNA en todas las especies vegetales, y por otra, la conservación de un perfil de expresión característico en respuesta a sequía al comparar diferentes especies, independientemente de que se trate de microRNAs conservados o no. En ambos casos, ya sea que se encuentren participando en mecanismos de respuesta comunes a todas las plantas, y que por lo tanto realicen procesos generales, o bien, que participen en mecanismos de grupo- o especie-específicos, altamente especializados, la identificación de microRNAs de respuesta a sequía

ofrece una posibilidad única para explorar y descubrir nuevos mecanismos que contribuyan al conocimiento de las bases biológicas de la tolerancia y de sus aplicaciones potenciales en biotecnología. Con esto se ampliará el conocimiento básico de la función de los miRNAs, lo que en un futuro abrirá posibilidades de aplicación en el mejoramiento y selección de características combinadas de alto valor agronómico en plantas, como son la tolerancia al estrés y el potencial productivo.

3. HIPÓTESIS

En maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oryza sativa*) y *Brachypodium distachyon* existen microRNAs específicos de monocotiledóneas cuyo patrón de expresión diferencial se encuentra conservado en la respuesta al déficit hídrico.

4. OBJETIVO GENERAL

Identificar microRNAs de expresión diferencial en respuesta al déficit hídrico en maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y *Brachypodium distachyon*.

4.1 Objetivos específicos

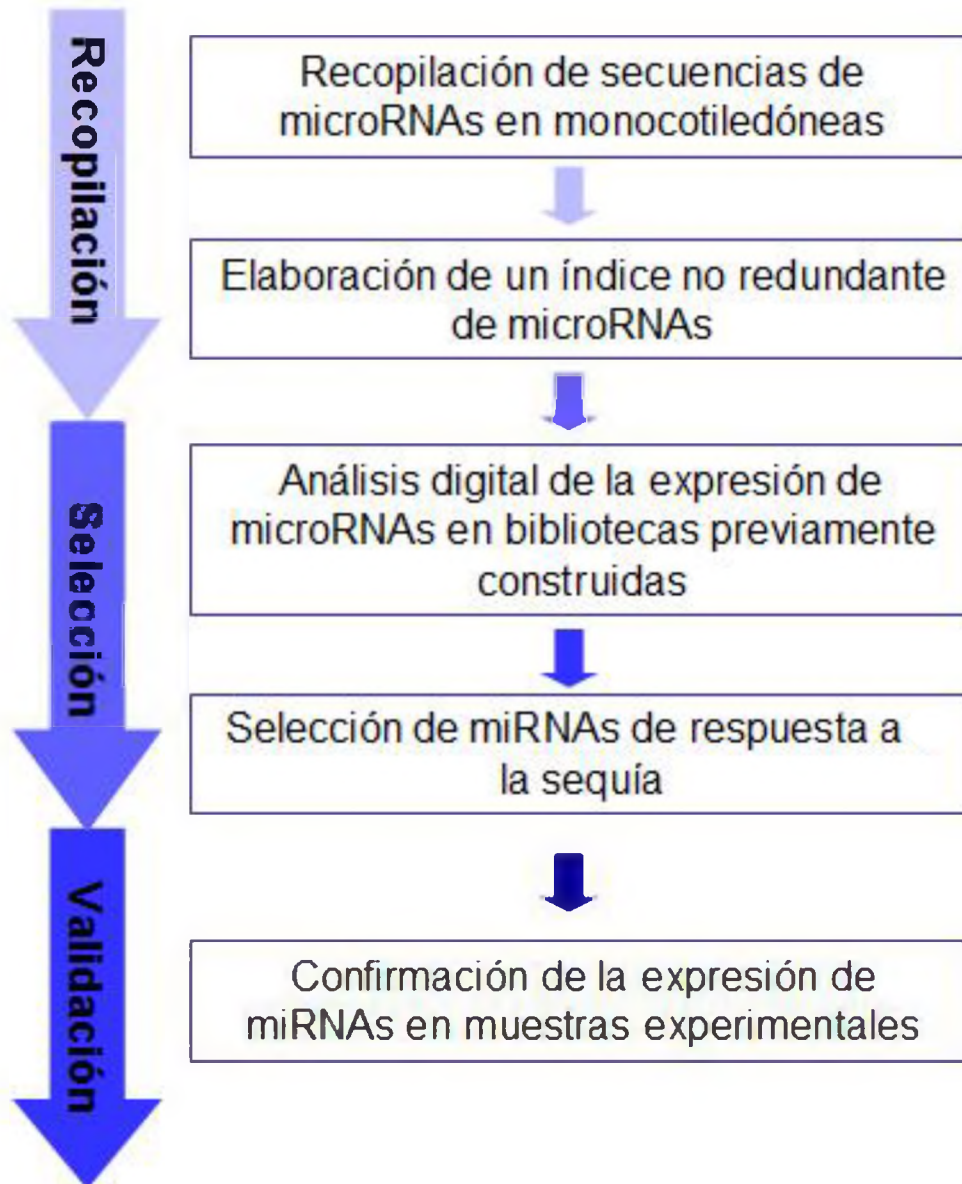
4.1.1 Encontrar microRNAs no redundantes reportados en la base de datos Mirbase en plantas monocotiledóneas.

4.1.2 Analizar digitalmente la expresión de microRNAs de monocotiledóneas a partir de bibliotecas de microRNAs secuenciadas previamente.

4.1.3. Identificar microRNAs cuya expresión esté regulada por sequía en plantas monocotiledóneas.

4.1.4 Validar experimentalmente la expresión diferencial de microRNAs de respuesta en plantas bajo estrés por sequía.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis de secuencias

6.1.1 Elaboración de un índice no redundante de secuencias de microRNAs

Con la finalidad de contar con un índice de las secuencias de microRNAs que se han identificado en plantas, se recopilaron secuencias de microRNAs maduros reportados en la base de datos MiRBASE, versión 19 (<http://www.mirbase.org/>), correspondientes a 12 especies de monocotiledóneas. Las secuencias de microRNAs se almacenaron en una hoja de Excel copiando en una columna el nombre identificador (Id) de la especie seguido por el número de microRNA, por ejemplo, Osa-mir1468 para el microRNA número 1468 de *O. sativa*. En la columna contigua, denominada secuencia, se almacenó la secuencia correspondiente a ese nombre. Para identificar microRNAs, que por encontrarse en especies diferentes presentan Id diferente, pero que poseen la misma secuencia madura, se realizó una búsqueda de secuencias repetidas con la herramienta de Excel 'regla de formato para valores únicos o duplicados' sobre la columna de secuencia. Con esta herramienta se pudieron encontrar los valores repetidos en la columna de secuencia, mismos que fueron eliminados, dejando sólo una secuencia representativa. Por otra parte, los Id que pertenecían a la misma secuencia madura fueron especificados en el renglón de la secuencia redundante (Fig. 9). Con esto se logró obtener el número total de secuencias únicas no redundantes.

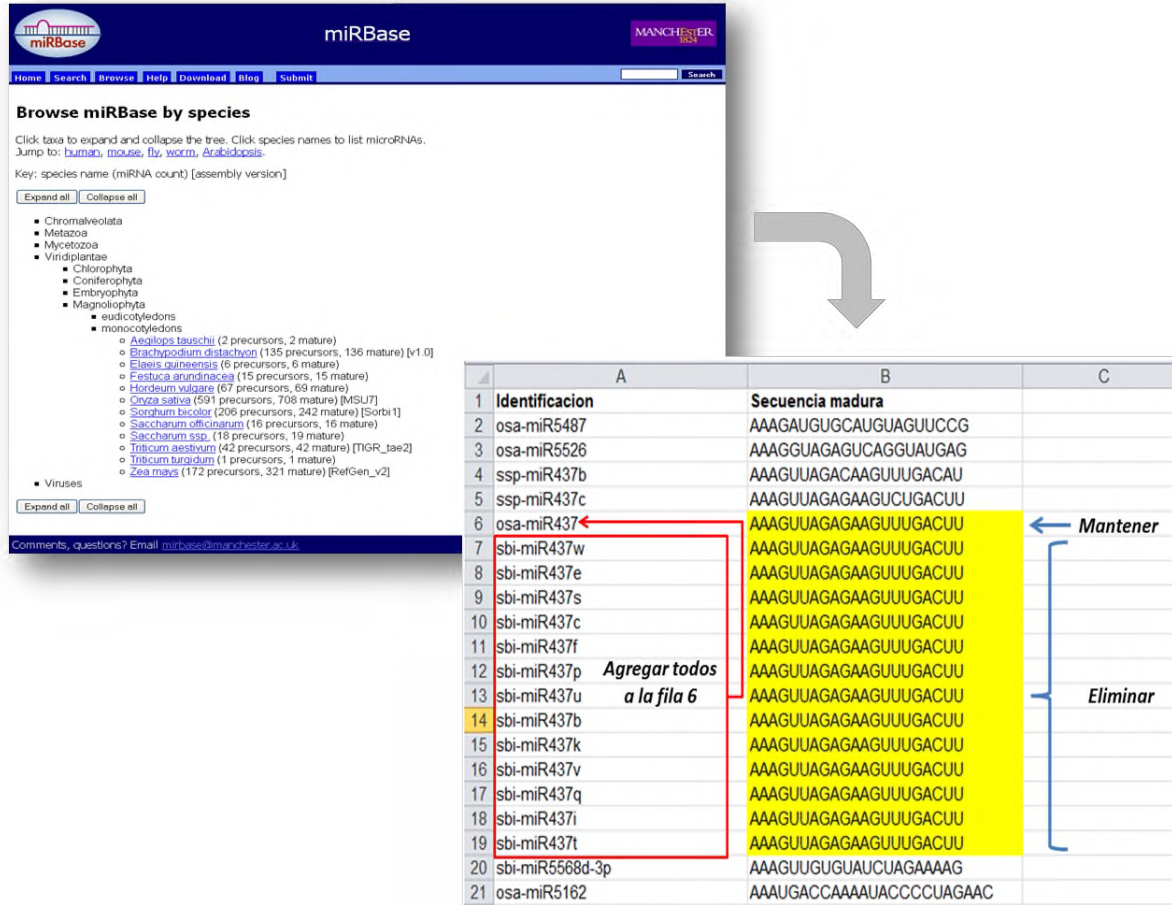


Figura 9: elaboración del índice no redundante a partir de secuencias maduras obtenidas de la base de datos miRBase.

6.2 Análisis digital de la expresión

Para realizar un análisis digital de expresión de microRNAs en las plantas monocotiledóneas bajo estudio, se emplearon datos de secuenciación masiva obtenidos de 8 bibliotecas de microRNAs elaboradas y secuenciadas en la Universidad de California-Riverside. Estas corresponden a poblaciones completas de microRNAs de muestras experimentales obtenidas en tratamientos control y de estrés. En la tabla 3 se muestran los detalles de dichas bibliotecas.

Tabla 3. Bibliotecas de ARNs pequeños empleadas para el análisis digital de la expresión

Identificación	Especie	Tejido	Tratamiento	Tamaño de la base de datos (GB)
ZmaCRL	Maíz (<i>Z. mays</i>)	Hojas y tallos	Control	2.36
ZmaSEQ			Sequía	2.50
OsaCRL	Arroz (<i>O. sativa</i>)	Inflorescencias	Control	1.54
OsaSEQ			Sequía	1.15
BdiCRL	<i>Brachypodium</i> (<i>B. distachyon</i>)	Hojas y tallos	Control	3.28
BdiSEQ			Sequía	3.0
SbiCRL	Sorgo (<i>S. bicolor</i>)	Hojas y tallos	Control	2.77
SbiSEQ			Sequía	2.98

Las 8 bibliotecas de microRNAs fueron analizadas para cuantificar la presencia de cada una de las secuencias del índice no redundante. Para esto se empleó la herramienta TextPad, mediante su opción de búsqueda y cuantificación en archivo. Las frecuencias obtenidas para cada secuencia madura no redundante se registraron en la columna correspondiente y posteriormente se normalizaron dividiendo por el número millones de secuencias en cada biblioteca correspondiente. Así se obtuvieron valores normalizados, expresados como “veces por millón”. Con estos valores se identificaron los 10 microRNAs más abundantes en cada biblioteca, así como los 10 menos abundantes.

6.2.1 Análisis digital de la expresión de microRNAs en respuesta a sequía

Con los valores normalizados se calculó la proporción en que la expresión aumentó o disminuyó en la condición de estrés, de acuerdo a la ecuación 2:

$$\text{Relación de expresión} = \frac{\text{NsE} / \text{NtE}}{\text{NsC} / \text{NtC}} \quad [\text{Ec. 2}]$$

donde NsE: número de veces en que apareció la secuencia de un microRNA específico en la biblioteca de estrés; NsC: número de veces en que apareció la secuencia del microRNA específico en la biblioteca control; NtE: número de millones de secuencias totales en la biblioteca de estrés; NtC: número de millones de secuencias totales en la biblioteca control. NsE/NtE y NsC/NtC son los valores normalizados en “veces por millón” de cada microRNA en las bibliotecas de estrés y control, respectivamente.

6.3 Clasificación de microRNAs regulados por sequía

Con los valores obtenidos aplicando la ecuación 2 de relación de expresión se obtuvieron los perfiles de expresión en las bibliotecas cuantificadas de todas las secuencias del índice, clasificando como microRNAs inducidos aquellos que presentaron una relación de expresión superior a 1.5, y como reprimidos, aquellos cuya relación de expresión fue inferior a 0.66.

Una vez que los microRNAs se clasificaron de acuerdo a sus perfiles de expresión en las bibliotecas cuantificadas, se seleccionaron 6 para análisis molecular mediante qPCR.

6.4 Establecimiento de plantas y tratamientos de estrés

6.4.1 Material vegetal

Para llevar a cabo experimentos que permitieran la validación de la expresión de microRNAs seleccionados se obtuvieron semillas de cuatro especies monocotiledóneas: maíz, arroz, sorgo y *B. distachyon*. En la tabla 4 se enlistan los detalles de cada especie.

Tabla 4. Lista de las especies vegetales empleadas en este estudio.

Nombre común	Nombre científico	Variedad, ecotipo o cultivar	Institución de origen
Maíz	<i>Z. mays</i>	B73	CINVESTAV-Irapuato ^a
Arroz	<i>O. sativa</i>	Japónica R38, Murazaki	Instituto de Ciencias Genómicas, UNAM ^b
Sorgo	<i>S. bicolor</i>	Fortuna	Variedad comercial empleada en la región del Papaloapan
<i>Brachypodium</i>	<i>B. distachyon</i>	Bd21	Departamento de Agricultura de Estados Unidos ^c

Donaciones del ^aDr. Jean Phillippe Vielle-Calzada, ^bDr. Pallvolu M. Reddy, y ^cDr. David F. Garvin.

6.4.2 Cultivo de *B. distachyon*

En el caso de *B. distachyon*, las semillas que originalmente se obtuvieron fueron propagadas en el laboratorio, y una vez que se obtuvieron cantidades suficientes de semillas nuevas, se procedió a realizar los experimentos. Para esto se seleccionaron las semillas para desinfectarlas superficialmente, eliminando aquellas que se encontraban vacías. Se colocaron las semillas en un tubo cónico con tapa, y se desinfectaron en ambiente de esterilidad (en campana de flujo laminar) lavando con 10 mL de etanol al 70% durante 30 s, seguido por un enjuague con agua destilada estéril. A continuación se lavaron con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.3%, con agitación durante 4 min. Después de transcurrido el lavado, la solución se decantó y las semillas se enjuagaron con agua destilada estéril como mínimo 3 veces. Las semillas se colocaron en un soporte de papel filtro estéril previamente hidratado con agua destilada estéril dentro de una caja Petri. Se envolvió la caja con papel aluminio y se guardó en el refrigerador durante 7 días a 5 °C, para romper la dormancia (mecanismo que retrasa la germinación). La caja se transfirió después a temperatura ambiente en oscuridad por 7 días, y una vez terminado el periodo se expusieron las cajas con los germinados durante 2 días a las condiciones dentro del cuarto de crecimiento, previo a su trasplante al sustrato. Las condiciones del cuarto de crecimiento se especifican en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones ambientales del cuarto de crecimiento

Temperatura	26-27 °C
Humedad relativa	60%
Intensidad de luz	70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	20 h luz / 4 h oscuridad

El sustrato para crecimiento de plantas empleado en este trabajo fue la mezcla de sustrato SunShine #3: Perlita (3:1). La mezcla se homogenizó, se colocó en un saco de tela y se esterilizó a 121 °C durante 1 h en autoclave. Finalizada la esterilización se permitió al sustrato alcanzar la temperatura ambiente por lo menos 4 h antes de ser usado.

En todos los casos se agregó al sustrato fertilizante 15N-5P-20K (Nitrofoska Perfect) después de la esterilización, a razón de 2% de peso total. Por ejemplo, a un litro de sustrato SunShine # 3 con perlita, que pesa 154 g, se agregaron 3.08 g de fertilizante. Por tratarse de un fertilizante de liberación prolongada, no se realizaron adiciones posteriores durante el resto del ciclo de vida de las plantas.

Una vez enriquecido con fertilizante, el sustrato se hidrató agregando 1.2 L de agua por cada 4 L de sustrato preparado y se mezcló profusamente para asegurar la uniformidad y evitar la formación de grumos. El sustrato hidratado se distribuyó en macetas de 10 cm de diámetro por 8 cm de altura, con capacidad de 0.4 L, para el caso de *Brachypodium*.

6.4.3 Cultivo de maíz, arroz y sorgo

En el caso de maíz, arroz y sorgo, las semillas no recibieron tratamiento de desinfección ni estratificación, sino que fueron sembradas directamente en el sustrato. Para estas plantas se empleó el mismo sustrato antes descrito para *Brachypodium*, distribuido en macetas de 13 cm de diámetro por 9 cm de altura, con capacidad de 0.6 L.

Una vez realizada la siembra, las macetas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento hasta la germinación y después se transfirieron a una cámara mini-invernadero especialmente diseñada para mantener a las plantas en las condiciones ambientales naturales prevalecientes en el verano, y al mismo tiempo mantenerlas libres de insectos.

Los cultivos fueron monitoreados diariamente para verificar en nivel de hidratación del sustrato, así como la ausencia de factores bióticos tales como insectos, microalgas y hongos. También se suministró hierro en solución comercial Poliquel (Arysta LifeScience), el cual se diluyó para aplicar a las plantas de maíz, arroz y sorgo. Para preparar la solución se tomó 0.5 mL de hierro en 200 mL de agua y se empleó como agua de riego una vez cada dos semanas.

6.4.4 Tratamientos de estrés

Una vez preparado el sustrato, en todos los casos se seleccionaron plántulas de la misma edad y grado de desarrollo para los experimentos. En el caso de *Brachypodium*, tres plántulas se transfirieron del papel filtro a cada maceta; en el caso de maíz, arroz y sorgo, se sembraron diez semillas en cada maceta y una vez asegurada la germinación se removieron dos plántulas, generalmente las que tardaron en germinar y tenían desarrollo menor, para dejar ocho en cada maceta. En total, se dispuso de seis macetas por especie. Las seis macetas se separaron en dos lotes de tres macetas cada uno, y cada maceta fue considerada como una unidad experimental.

Uno de los lotes recibió el tratamiento control, consistente de riego continuo por aplicación de 50 mL de agua cada 3 días; el lote restante se destinó al tratamiento de sequía, el cual consistió en no aplicar riego, sino mantener a las plantas únicamente con el agua que se agregó al sustrato al inicio del experimento y permitir su deshidratación gradual y progresiva.

6.4.5 Recolección del tejido vegetativo

La fecha de recolección para cada especie se determinó por la manifestación de los síntomas de estrés en las plantas, tales como pérdida de turgencia y el enrollamiento notable de las hojas. En el caso de *Brachypodium*, las plantas tenían la edad de 25 días después de germinación. Las plantas de maíz tenían 21

días de edad, mientras que el arroz tenía 30 días y el sorgo 21 días después de la germinación.

En todos los casos se colectaron tallos y hojas de las plantas, se envolvieron en paquetes de papel aluminio previamente etiquetado y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente almacenarse en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior extracción. Estos pasos fueron realizados para cada una de las especies y tratamientos, así como para sus réplicas.

6.5 Parámetros fisiológicos de estrés

6.5.1 Fluorescencia de clorofila

En los minutos previos a la colecta, se midió la fluorescencia de la clorofila en cada planta con un fluorómetro portátil (Opti-Sciences OS-30Pt) de la siguiente manera: Se seleccionó al azar una hoja de cada planta y sin arrancarla se colocó un adaptador en forma de clip para aislar de la luz una porción de la hoja. Se esperaron 10 min para permitir la adaptación de la hoja a la oscuridad y enseguida se midió la fluorescencia de clorofila mediante el cálculo de F_v/F_m (fluorescencia variable máxima/ fluorescencia máxima). Este valor es indicativo del nivel de estrés que experimenta la planta.

6.5.2 Contenido relativo de agua

Con la finalidad de cuantificar el nivel de deshidratación a nivel de tejido como medida directa del estrés hídrico, se midió el contenido relativo de agua de la siguiente manera: Se tomó muestra de la segunda hoja de planta y se pesó para conocer su peso fresco (P_f). La muestra fue enseguida sumergida en agua desionizada durante 24 h para permitir la hidratación total del tejido. Al término se sacó del agua, se secó brevemente con un papel absorbente para eliminar la

humedad superficial y se pesó, obteniendo el peso turgente (P_t). Posteriormente, la muestra se secó en un horno a 70 °C por 48 h. Finalizado el tiempo se registró el peso seco de las muestras (P_s).

Con las tres mediciones de peso, se calculó el contenido relativo de agua empleando la ecuación 3 (Barrs y Weatheley, 1968):

$$\text{CRA} = [(P_f - P_s) / (P_t - P_s)] \times 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

donde P_f es peso fresco, P_t es peso turgente y P_s es peso seco.

6.6 Extracción de ARN

Las muestras de material vegetal que se colectaron fueron removidas de su almacenamiento a -80 °C, y colocadas rápidamente en un mortero con nitrógeno líquido. Se realizó la molienda de las muestras con ayuda de un pistilo de porcelana y se realizaron adiciones de nitrógeno líquido al mortero durante la molienda para asegurar que las muestras no se descongelaran. Una vez reducidas a polvo, las muestras de material vegetal se transfirieron a tubos Eppendorf congelados en nitrógeno líquido, vaciando un volumen de aproximadamente 0.5 mL del polvo a cada tubo. El material pulverizado restante fue colocado en un tubo de 15 mL congelado y se almacenó a -80 °C para futuras extracciones.

El material colocado en microtubo de 1.5 mL se homogenizó mediante la adición de 1 mL de Trizol (Invitrogen) y agitación en vortex. Una vez que las muestras se mezclaron con el reactivo, sin que se pudieran percibir aglomerados de tejido, se dejaron reposar por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo a cada tubo y se agitaron manualmente durante 20 s. Se dejaron incubar a temperatura ambiente por 5 min y fueron centrifugadas a 13,000

rpm durante 15 min, en una centrífuga refrigerada a temperatura de 5 °C. A partir de ese momento, el resto del procedimiento se lleva a cabo en hielo a 5 °C.

Después de la centrifugación, las muestras fueron removidas de la centrífuga y colocadas en hielo. Se verificó la separación de la fase acuosa en la parte superior (sobrenadante) y de la fase orgánica en el fondo del tubo. La fase acuosa se separó con ayuda de una micropipeta, tratando de no tocar la fase orgánica y se colocó en un microtubo de 1.5 mL limpio. Nuevamente, las muestras deben mantenerse en el hielo el mayor tiempo posible durante la extracción.

Al sobrenadante se agregaron 0.2 mL de cloroformo, se agitó y se repitió el paso de centrifugación hasta la recuperación del sobrenadante en un tubo limpio. Una vez realizada la segunda ronda de separación con cloroformo, cada sobrenadante se mezcló con 1 mL de isopropanol. Se homogenizó la solución por agitación manual y se incubó por 20 min a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ARN.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron por 20 min a 13,000 rpm a 5 °C. Al término, se verificó la precipitación del ARN, visible por la formación de una pastilla en el fondo del tubo. La pastilla se separó del sobrenadante por decantación del líquido y se procedió a su lavado agregando 0.5 ml de etanol al 80%, preparado con agua DEPC (Apéndice A). El lavado se realizó con agitación en un vortex y enseguida se centrifugó por 5 min a 5 °C. Una vez concluida la centrifugación, se decantó la solución de lavado y se dejó la pastilla pegada al tubo. Durante 15 min a temperatura ambiente con los tubos inclinados se permitió el secado de la pastilla. Una vez transcurrido el tiempo, las pastillas fueron resuspendidas en 30-50 μ L de agua tratada con DEPC. Los ARNs obtenidos se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

6.7 Análisis de concentración, pureza e integridad del ARN

La concentración y pureza del ARN total obtenido de cada una de las muestras se registró empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000/2000e mediante el software del fabricante (Nanodrop 2000). Después de cuantificar se verificó la integridad del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 1%. La preparación del gel se especifica en el Apéndice A.

Antes de cargar las muestras, se prepararon de la siguiente manera: Se colocaron 4 μ L de cada muestra en un microtubo y se mezclaron con 1 μ L de amortiguador de carga 5X para ARN que contiene bromuro de etidio (Apéndice A). Enseguida se incubaron a 65 °C en un termobloque para desnaturizar durante 5 min. Al término, los tubos se transfirieron rápidamente del termobloque al hielo. Después de 2 min en hielo, las muestras se centrifugaron para coleccionar cualquier líquido de condensación en las paredes del tubo.

Las muestras se cargaron en carriles del gel de agarosa desnaturizante y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a 60 V, empleando buffer MOPS 1X como solución de corrida (Apéndice A). La electroforesis se detuvo al momento en que el colorante azul contenido en el buffer de carga había alcanzado $\frac{3}{4}$ partes de la longitud del gel. La imagen del gel se adquirió en el fotodocumentador (Ingenius LHR Syngene) mediante el programa GeneSnap. La calidad del ARN se verificó mediante la comprobación de la presencia, integridad e intensidad de las bandas ribosomales mayores, y la ausencia de signos visibles de degradación o barridos en el gel.

6.8 Ensayos de expresión mediante qPCR

Previamente a la validación de la expresión de microRNAs mediante qPCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de microRNAs seleccionados. Estos oligonucleótidos, llamados directo, se enlistan en el Apéndice B, y corresponden a la secuencia exacta de los microRNAs a cuantificar.

Cada oligonucleótido directo presenta temperatura de alineamiento teórica distinta, por lo que se realizaron reacciones de PCR de temperatura en gradiente en un termociclador Axygen MaxyGeneGradient, a tres temperaturas de prueba: 57 °C, 60 °C y 63 °C. La amplificación se realizó empleando la polimerasa DreamTaq Green PCR (Thermo Scientific) descrito en la tabla 6.

Tabla 6: Preparación de reacciones para PCR de temperatura en gradiente.

Componente	Volumen (µL)
DreamTaq Green Master Mix (2X)	10
Oligonucleótido directo	0.4
Oligonucleótido SBS3	0.4
ADNc (obtenido por ligación de adaptador)	1
Agua	8.2

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo el programa descrito en la tabla 7.

Tabla 7: Programa de ciclado de temperatura en gradiente.

Etapa	T (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	30
Alineamiento	Ta*	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	10	1

Ta*: temperatura de alineamiento específico del oligonucleótido.

Al término, las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2% y de acrilamida nativa al 6% con la finalidad de analizar la presencia de productos y así determinar la temperatura óptima de alineamiento para cada primer.

Una vez que se obtuvieron las temperaturas más adecuadas para la amplificación, se procedió a realizar los ensayos de qPCR mediante dos métodos: el método del kit comercial N-Code y el método de ligación de un adaptador en el extremo 3'.

6.8.1 Método N-Code

Para este procedimiento se empleó el kit comercial N-CODE (Invitrogen), que está basado en la adición de una cola poli(A) al ARN total mediante la enzima poliA polimerasa para posteriormente, con el empleo de un oligonucleótido dT (primer Universal), y la enzima retrotranscriptasa (SuperScript III), realizar la síntesis del ADNc. El ADNc obtenido se emplea como molde para la amplificación mediante qPCR con el agente SYBRGreen como agente fluorescente. En la figura 10 se describe a detalle los pasos de este método.

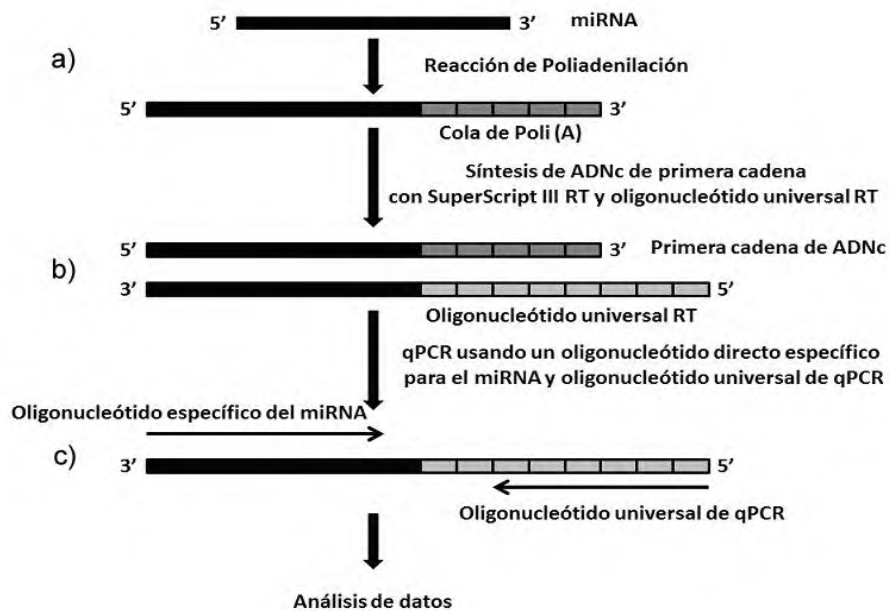


Figura 10: Método N-CODE. a) Los microRNAs son extendidos a partir de su extremo 3' con una cola de poliA, mediante una reacción de poliadenilación. b) un oligonucleótido universal d(T) es empleado para complementar al poliA e iniciar la reacción de síntesis de ADN complementario, mediante la actividad de una retrotranscriptasa, c) un oligonucleótido con la secuencia específica del microRNA en estudio y un oligonucleótido universal de qPCR son empleados para realizar una reacción de amplificación cuantitativa mediante PCR.

a) Poliadenilación.

A partir de ARN íntegro obtenido de cada una de las muestras: sorgo, maíz, arroz y *Brachypodium* (control y sequía), se prepararon reacciones de poliadenilación, como se describe en la tabla 8.

Tabla 8. Preparación de ARN poliadenilado mediante el método N-Code.

Componente	Cantidad
ARN total	2.5 µg
Buffer de reacción 5X microRNA	5 µL
MnCl ₂ 25 Mm	2.5 µL
ATP	1 µL
Poli(A) polimerasa	0.5 µL
Agua DEPC	hasta 25 µL

Las reacciones se incubaron a 37 °C por 15 min y se procedió inmediatamente a la síntesis de ADNc

b) Síntesis de DNA complementario.

Como resultado de las reacciones anteriores, se obtuvo ARN poliadenilado. Enseguida se procedió a la preparación de reacciones para la síntesis de la primera cadena de DNA en tubos de 0.1 mL, como se indica en la tabla 9.

Tabla 9. Preparación de ADNc mediante N-Code.

Componente	Cantidad
ARN poliadenilado (del paso a)	5 μ L
Buffer de alineamiento	1 μ L
Oligonucleótido Universal (25 μ M)	3 μ L

Las reacciones se incubaron a 65 °C por 5 min en un termociclador. Inmediatamente de la incubación, los tubos se colocaron en hielo por 1 min y se adicionaron los componentes indicados en la tabla 10.

Tabla 10. Continuación de la preparación de ADNc mediante N-Code.

Componente	Cantidad
Mezcla de reacción de primera cadena, 2X	10 μ L
Retrotranscriptasa SuperScript III / RNase OUT	2 μ L

Los tubos se centrifugaron brevemente para colectar líquido de las paredes y se regresaron al termociclador a 50 °C durante 50 min. Al término, se incubaron a 85 °C por 5 min para inactivar a la retrotranscriptasa.

Las muestras se diluyeron 1:10 y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso en reacciones de PCR.

c) qPCR

Los ADNcs obtenidos en la reacción anterior se emplearon como molde para la amplificación de microRNAs seleccionados. Para esto se diseñaron oligonucleótidos específicos, que corresponden a la secuencia exacta de cada microRNA (Apéndice B) (oligonucleótido directo). Como primer reverso se empleó el oligonucleótido dT etiquetado como Universal qPCR primer, provisto

por el fabricante del kit. Las reacciones se realizaron con la enzima Platinum SYBR Green qPCR Super Mix provista por el fabricante, y se prepararon para cada ADNc en microplacas de 96 pozos, incluyendo siempre las reacciones correspondientes al control constitutivo miR166 en cada corrida de qPCR, con fines de comparación. Las reacciones se prepararon como se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Preparación de reacciones de qPCR con Platinum SYBRGreen

Componente	Cantidad
Platinum SYBR Green qPCR Super Mix	10 μ L
Primer directo (10 μ M)	0.5 μ L
Primer Universal qPCR (10 μ M)	0.5 μ L
ADNc molde (diluido 1:10)	2 μ L
Agua DEPC	7 μ L

Las reacciones se prepararon por triplicado para cada ADNc. El primer directo es específico para cada microRNA. Para cada primer directo se incluyeron tres reacciones sin ADNc molde como control negativo. Una vez preparadas las reacciones se colocaron en una placa de 96 pozos y se procedió a realizar el programa indicado en la tabla 12, empleando un termociclador de qPCR Piko Real (Thermo Scientific):

Tabla 12. Condiciones de ciclado empleadas en la qPCR con Platinum SYBR Green qPCR Super Mix (Invitrogen)

Etapas	T (°C)	Tiempo (min)	No. de ciclos
Desnaturalización	95	3	1
Desnaturalización	95	0.5	40
Alineamiento	60	0.5	
Extensión	72	0.5	
Extensión final	72	10	1

Al término del programa de ciclado, se realizó una curva de disociación para verificar la obtención de un producto único en cada reacción.

6.8.2 Método de ligación de un adaptador en el extremo 3´

Para la síntesis de ADNc se empleó un método alternativo que consistió en la ligación de un adaptador preadenilado (IDT linker 1) que no requiere ATP para la reacción a los extremos 3´ del ARN total, para sustituir el poli(A), y el uso de una T4 ARN ligasa troncada (T4 Rnl2tr, NewEngland Biolabs). Los productos ligados fueron después retrotranscritos empleando un primer complementario al adaptador 3´ y con el uso de la enzima SuperScript III (Invitrogen). En la figura 11 continuación se describe a detalle los pasos de este método.

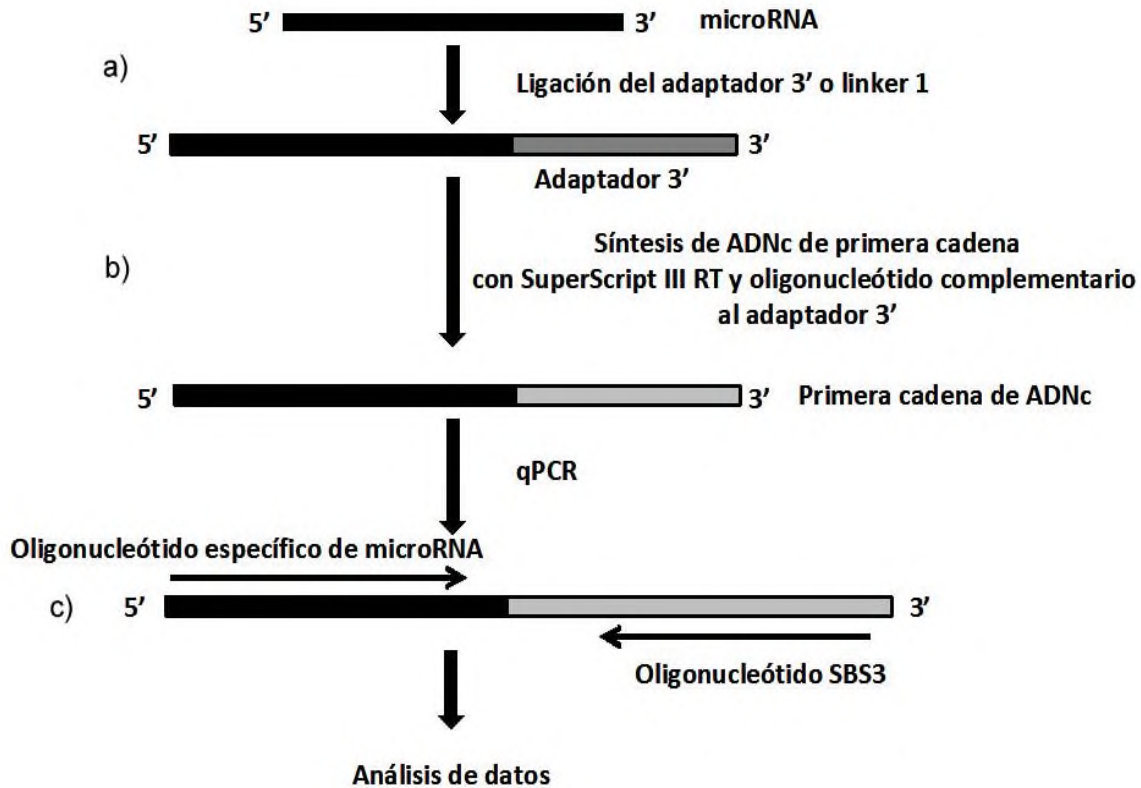


Figura 11. Método de ligación de adaptador al extremo 3'. a) Un adaptador preadenilado es ligado al extremo 3' de los microRNAs, mediante la actividad de una la T4 RNA ligasa 2. b) Síntesis de ADN complementario con retrotranscriptasa. Un oligonucleótido complementario a la secuencia del adaptador 3' es empleado para iniciar la reacción. c) La reacción de qPCR se lleva a cabo con un oligonucleótido específico del microRNA en estudio y un oligonucleótido reverso largo que reconoce a la secuencia del extremo 3' del ADNc.

a) A partir de ARN íntegro obtenido de las 4 plantas (control y sequía), se prepararon las siguientes reacciones para la ligación del adaptador 3' como se muestra en la tabla 13:

Tabla 13. Ligación del adaptador al extremo 3´

Componente	Cantidad
ARN total	1.25 µg
Inhibidor de RNasas (RNaseOUT)	0.5 µL
DMSO	1 µL
Adaptador 3´	0.5 µL
Amortiguador de ligación 10X (sin ATP)	1 µL
ARN ligasa 2	1 µL
Agua DEPC	Hasta 10µL

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente (25-26 °C) durante 1 h. Al término se procedió a la síntesis de ADNc.

b) Síntesis de DNA complementario (ADNc).

Las reacciones anteriores dieron como resultado la adición del adaptador al extremo 3´ de los ARNs pequeños. Enseguida se procedió a la preparación de reacciones para la síntesis de la primera cadena de DNA en tubos de 0.1 mL, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Preparación de ADNc mediante el método de ligación de adaptador.

Componente	Cantidad
ARN ligado (de la reacción anterior)	2 µL
Amortiguador de alineamiento	0.5 µL
Oligonucleótido Reverso (10 µM)	1.5 µL

Las reacciones se incubaron a 65 °C por 5 min en un termociclador y luego en hielo por 2 min. Los tubos se centrifugaron para colectar líquido de las paredes y se adicionaron los siguientes reactivos como se describe en la tabla 15:

Tabla 15. Continuación de la preparación de ADNc mediante ligación de adaptador.

Componente	Cantidad
Mezcla de reacción de primera cadena 2X	5 µL
Enzima SuperScrip III RT/RNase OUT	1 µL

Los tubos se incubaron a 50 °C por 1 h. Concluido el tiempo, las reacciones se inactivaron a 70 °C por 15 min, los ADNcs se diluyeron 1:10 y se almacenaron a -20 °C para ser empleadas en reacciones de PCR.

c) qPCR

En este paso, los ADNcs obtenidos se emplearon como molde para preparar reacciones de qPCR para la detección de microRNAs específicos. Previamente se diseñaron oligonucleótidos correspondientes a la secuencia exacta de cada microRNA (Apéndice B) que sirven como oligonucleótidos directo. El primer reverso es SBS3, que consta de 37 bases y que posee una región idéntica a la secuencia del adaptador 3' empleado en el paso a) de este método.

A diferencia del método NCode, para el método de ligación de adaptador se empleó el kit Maxima SYBRGreen (Thermo Scientific). Las reacciones se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante, en microplacas de 96 pozos, como se presenta en la tabla 16:

Tabla 16. Preparación de reacciones de qPCR con Maxima SYBRGreen.

Componente	Cantidad
Mezcla de reacción Maxima SYBRGreen qPCR (2X)	10 μ L
Oligonucleótido directo	0.5 μ L
Oligonucleótido SBS3	0.5 μ L
ADNc molde (diluido 1:10)	2 μ L
Agua DEPC	7 μ L

De la misma forma que con el método N-Code, las reacciones se prepararon por triplicado, incluyendo tres reacciones sin ADNc molde como control negativo, para cada primer directo. El programa para la amplificación de microRNAs en el termociclador de qPCR Piko Real (Thermo Scientific) se indica en la tabla 17:

Tabla 17. Condiciones de ciclado empleadas en la qPCR con Maxima SYBR Green qPCR master mix.

Etapas	T (°C)	Tiempo	No. de ciclos
Pre-tratamiento	50	2 min	1
Desnaturalización	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Alineamiento	60	30 s	
Extensión	72	30 s	

Para verificar la amplificación de un producto único, se realizó una curva de disociación al término del programa de PCR.

Los resultados obtenidos utilizando ambas estrategias se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_t$, expresado en la ecuación 4.

$$ER = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad [Ec. 4]$$

donde, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{miR166}})_{\text{Sequía}} - (Ct_{\text{microRNA}} - Ct_{\text{miR166}})_{\text{Control}}$

El microRNA 166 (miR166) se utilizó como control de referencia constitutivo en todos los ensayos.

6.9 Prueba del método de ligación de adaptador al extremo 3' por SPIKE-IN

El método diseñado para cuantificar la expresión de microRNAs mediante ligación de un adaptador al extremo 5' fue validado de la siguiente manera:

A 2.0 μg de ARN total de *B. distachyon* se agregó 1 μL del adaptador Illumina 5' ARN (Apéndice B) diluido como *spike*. La concentración final del *spike* en el ARN es de 1 nM. En otro tubo, a 2 μg de ARN total se agregó 1 μL del mismo adaptador, pero en dilución 10 veces mayor, para hacer una concentración inicial de *spike* de 0.1 nM.

Estos ARNs enriquecidos con el *spike* fueron procesados de la misma forma que cualquier otro ARN, siguiendo los pasos del método 6.8.2. En el paso final de PCR, se empleó como oligonucleótido directo al oligonucleótido Illumina 5' PCR primer (Apéndice B). Al finalizar el qPCR se verificó la obtención de un producto único mediante una curva de disociación y se observó que el desplazamiento en el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral correspondiera con la concentración relativa de *spike* presente en cada muestra.

7. RESULTADOS

7.1 Índice de microRNAs no redundantes

A partir de la base de datos de microRNAs reportados, miRBASE (versión 19) se logró extraer un total de 1910 secuencias maduras, correspondientes a 12 especies monocotiledóneas (Tabla 18). De estas secuencias, 218 se encuentran repetidas de forma intraespecífica (en la misma especie), 571 están repetidas de forma interespecífica (entre dos o más especies), y 1121 son únicas de especie. La especie en que se encontró la mayor especificidad de secuencias, es decir, el menor porcentaje de redundancia con otras monocotiledóneas fue *B. distachyon* (7.32%), seguida por *O. sativa* (10%). Ambas especies tienen el mayor número de secuencias maduras reportadas en la miRBASE. Una excepción es *Aegilops tauschii*, que presenta un 0% de redundancia, aunque sólo tiene 2 secuencias reportadas (Tabla 18). Por otra parte, se cuantificó la auto-redundancia como el porcentaje de secuencias que se repiten de forma intraespecífica (en la misma especie) y que provienen de precursores diferentes, pero resultan en la misma secuencia madura. No se observó ninguna relación entre el patrón de auto-redundancia y el número de secuencias reportadas para cada especie (Tabla 18).

Después de eliminar secuencias repetidas, se obtuvieron 1165 secuencias únicas. Todas las secuencias fueron etiquetadas con el nombre de la especie en que fueron reportadas; así, algunas secuencias están etiquetadas con el nombre de más de una especie, mientras que otras pertenecen a una sola especie, tal como se han reportado en la base de datos pública. El índice de secuencias únicas se presenta en el Apéndice C.

Tabla 18. MicroRNAs reportados en la miRBASE en especies monocotiledóneas.

Especie	Número de secuencias de en miRBASE	Redundancia con otras monocotiledóneas (%)	Auto-redundancia (%)
<i>Aegilops tauschii</i>	2	0	0
<i>B. distachyon</i>	464	7.32	4.7
<i>Elaeis guineensis</i>	6	100	100
<i>Festuca arundinacea</i>	15	33.3	6.6
<i>H. vulgare</i>	69	11.59	4.3
<i>O. sativa</i>	713	10	10.65
<i>S. bicolor</i>	241	21.5	11.6
<i>S. officinarum</i>	16	31.25	12.5
<i>S. spp.</i>	20	55	10
<i>T. aestivum</i>	42	21.42	4.76
<i>T. turgidum</i>	1	100	0
<i>Z. mays</i>	321	19.9	18.69
Total	1910		

7.2 Análisis digital de la expresión

La cuantificación de las secuencias del índice en las bibliotecas de microRNAs, permitió obtener datos de la abundancia de cada microRNA en las 4 especies monocotiledóneas bajo estudio, en las bibliotecas construidas. De acuerdo a los datos obtenidos, se encontró que varias de las secuencias, si bien se encuentran en el índice, no habían sido asociadas a algunas de las plantas bajo estudio. Así, se encontró un total de 147 microRNAs adicionales en *S. bicolor*, 156 en *B.*

distachyon, 70 en *Z. mays* y 60 en *O. sativa*. La adición de nuevas secuencias de microRNAs maduros en estas plantas indica que la identificación y el descubrimiento de nuevos microRNAs de plantas se encuentran aún en proceso y están lejos de saturarse.

De acuerdo a los resultados, se lograron observar diferentes patrones de acumulación de microRNAs y se identificaron los 10 microRNAs más abundantes, así como los 10 menos abundantes en las plantas bajo estudio. Como se muestra en la figura 9, el microRNA más abundante en *Brachypodium* es miR396d, alcanzando un nivel de 250000 veces por millón (vpm). Esto indica que la cuarta parte de la población de ARNs pequeños en *Brachypodium* corresponde a osa-miR396d. Verificando en el índice (Apéndice C) se observa que osa-miR396d es equivalente a bdi-miR396a en *Brachypodium*.

El segundo microRNA más abundante en *Brachypodium* es osa-miR159a.1 con un máximo de 84,000 vpm, un nivel de expresión menor a la mitad de lo que presentó miR396a (Fig. 12).

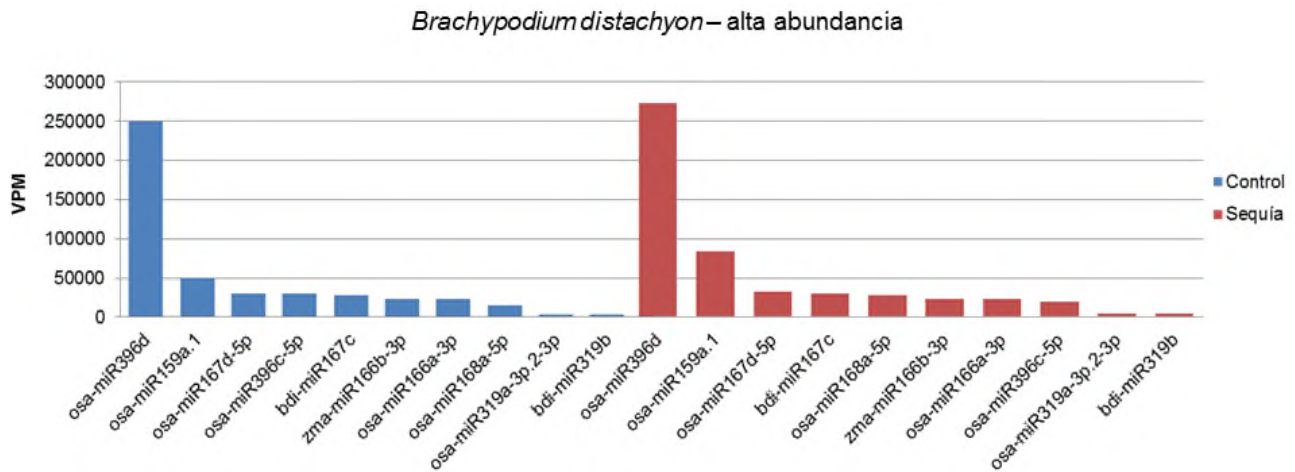


Figura 12. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de *B. distachyon*, expresados en “veces por millón”, vpm.

A partir del análisis de la biblioteca de estrés de *Brachypodium*, se puede notar que los 10 microRNAs más abundantes son los mismos que en la biblioteca control (Fig. 12). La población de microRNAs abundantes no sufre cambios; el nivel de expresión elevado de estos microRNAs persiste aún cuando *Brachypodium* se encuentra bajo estrés.

En la figura 10 se muestran los resultados del análisis de los 10 microRNAs más abundantes en *Z. mays*. Se observa que el microRNA más abundante en la condición control, al igual que en *Brachypodium*, es osa-miR396d. Sin embargo, su nivel de expresión es apenas poco más de una décima parte (28,055 vpm) de lo observado en *Brachypodium*.

Adicionalmente, se observa que a diferencia de *Brachypodium*, en *Z. mays* los microRNAs más abundantes sí experimentan alteraciones en el patrón de acumulación cuando se encuentra bajo estrés por sequía, llegando incluso a ser desplazados de la posición, como en el caso de miR169b. Aunque en general, sólo con excepción de miR169b, los microRNAs más abundantes son los mismos en ambas condiciones, se observan movimientos de lugar y alteraciones en la expresión en respuesta al estímulo de la sequía. Por ejemplo, miR396d disminuye su expresión por el estrés, mientras miR159a.1 la aumenta (Fig. 13).

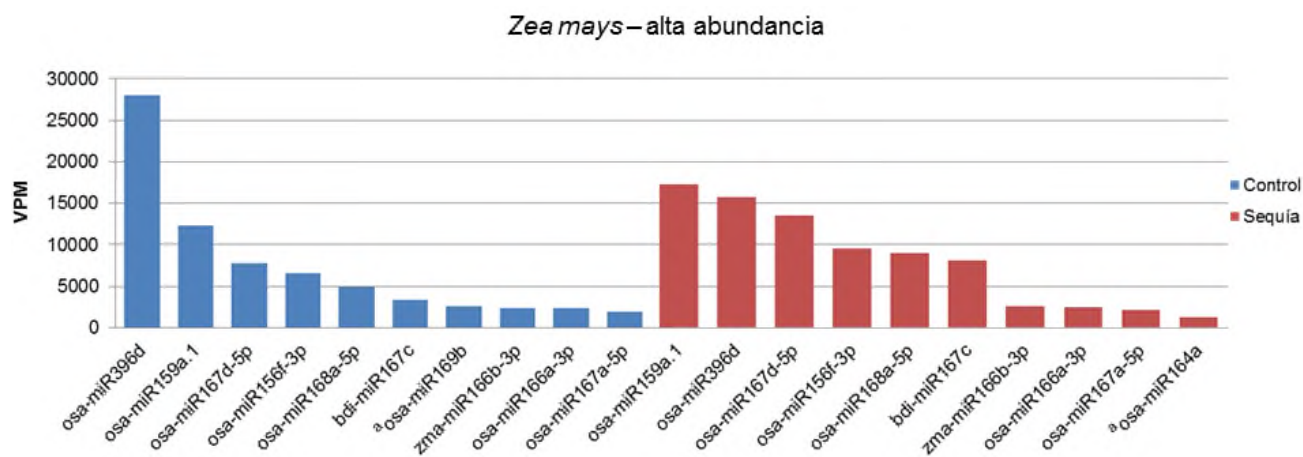


Figura 13. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de *Z. mays*, expresados como “veces por millón”, vpm. ^aMicroRNAs que fueron desplazados en alguno de los tratamientos.

En *S. bicolor*, el microRNA más abundante en la condición control es miR396d, seguido por miR167d-5p (Fig. 14). En esta especie, el patrón de acumulación de microRNAs abundantes es más dinámico en respuesta al estrés por sequía. MiR396d es desplazado de su lugar como microRNA más abundante y colocado en la cuarta posición cuando la planta está en sequía. Su lugar es tomado por miR167d-5p, que se ubica como el microRNA más abundante en la condición de estrés. La expresión de otra secuencia madura, miR396c-5p, también es reducida en la biblioteca de estrés (Fig. 14).

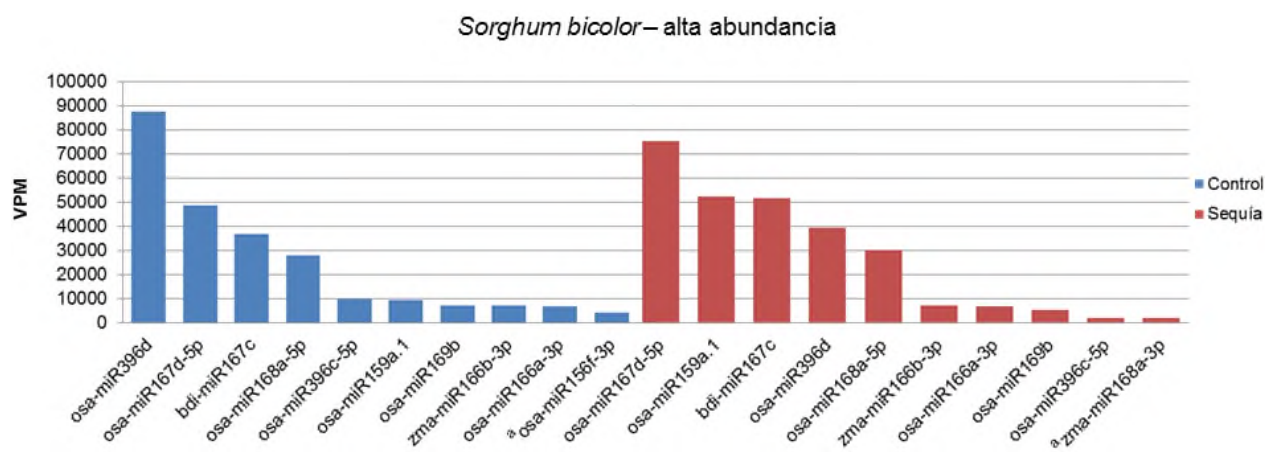


Figura 14. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de *S. bicolor*, expresados como “veces por millón”, vpm. ^aMicroRNAs que fueron desplazados.

Al analizar las bibliotecas de *O. sativa* se observa que se mantiene la identidad de los 10 microRNAs más abundantes (Fig. 15), con algunos cambios de posición mínimos. El microRNA más abundante es miR396d en la condición control, seguido por miR159a.1. Si bien, la gran mayoría de los microRNAs más abundantes son los mismos en ambas condiciones, se observa una tendencia a aumentar los niveles de acumulación en respuesta al estrés. Como ejemplo de esto, miR396d muestra un aumento mayor al 100% cuando pasa a la condición de sequía (Fig. 15).

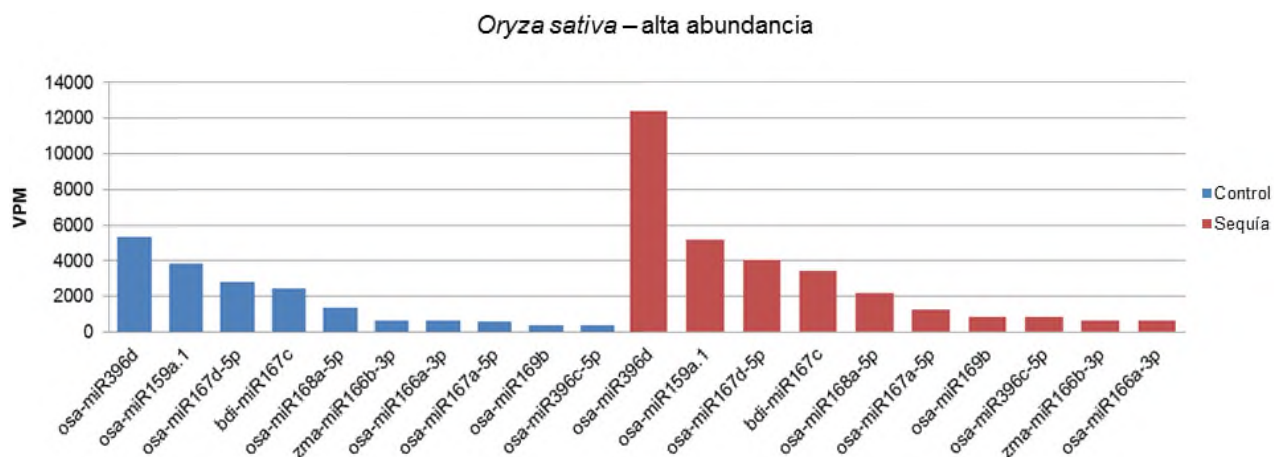


Figura 15. Los 10 microRNAs más abundantes en las bibliotecas de ARNs pequeños de *O. sativa*, expresados como “veces por millón”, vpm.

Se realizó un análisis similar para identificar a los microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas. Como resultado se observó que los microRNAs poco abundantes fueron más diversos que los abundantes. En las 8 bibliotecas se encontraron diferentes microRNAs de baja abundancia en las plantas. No se identificó un microRNA particular que mostrara un patrón de acumulación consistente en las 4 plantas.

En cuanto se refiere al estrés, no se observaron cambios importantes en la expresión de los microRNAs de baja abundancia en el tratamiento de sequía. El único efecto que se observó fue que varios de los microRNAs que se expresaron en baja abundancia en la condición control, fueron desplazados por otros en la condición de sequía.

Los resultados del análisis de las bibliotecas de *Brachypodium* muestran como menos abundantes a los microRNAs miR172b y estos microRNAs se mantienen aún en estrés por sequía solo moviéndose de posición (Fig. 16)

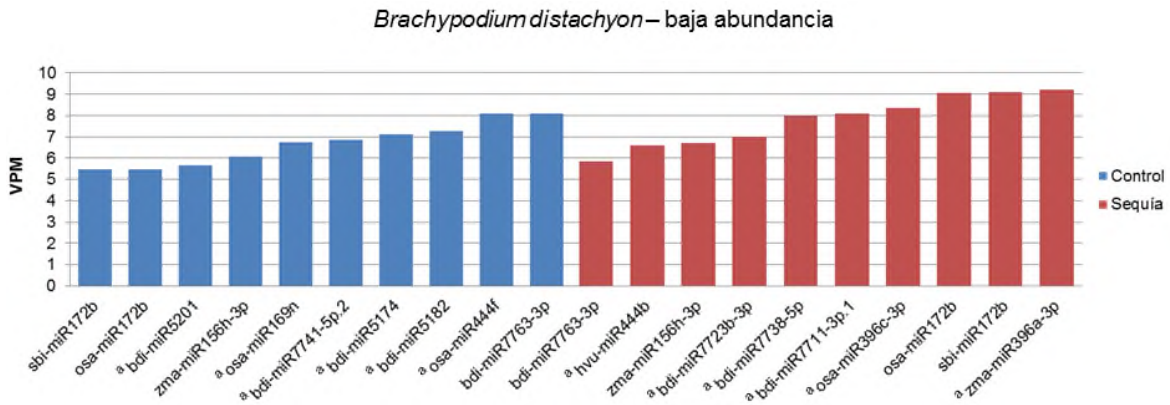


Figura 16. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de ARNs pequeños de *B. distachyon*, expresados en “veces por millón”, vpm.

En el caso de *Z. mays*, se puede apreciar que la mayoría de los microRNAs de baja abundancia corresponden a miembros de familias conservadas, como miR167, miR166, y miR159 (Fig. 17). Esto no representa la abundancia de la familia completa, sino sólo la de los miembros específicos.

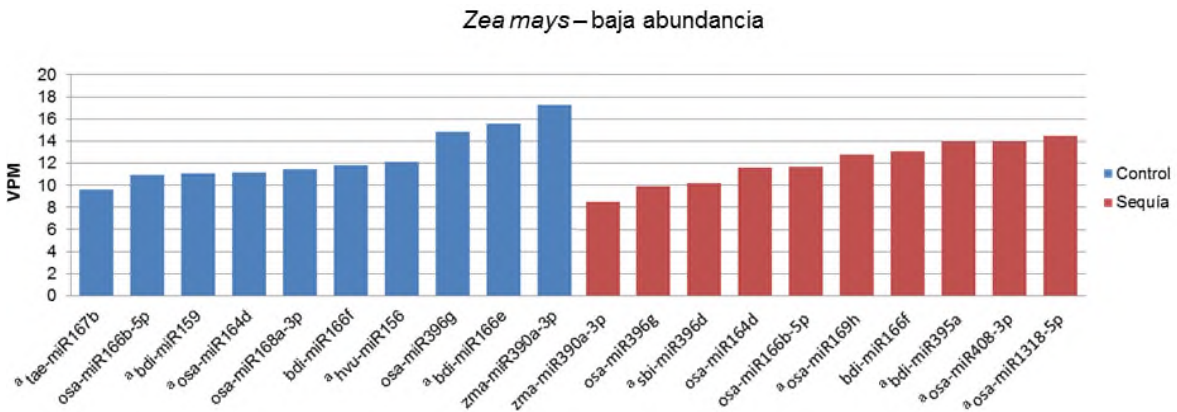


Figura 17. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de ARNs pequeños de *Z. mays*, expresados en “veces por millón”, vpm.

En la figura 18 se presentan los microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de sorgo. En esta planta se obtuvieron los niveles más bajos de abundancia, de hasta 5 vpm para miR162-3p, miR162a, miR169c y miR396g.

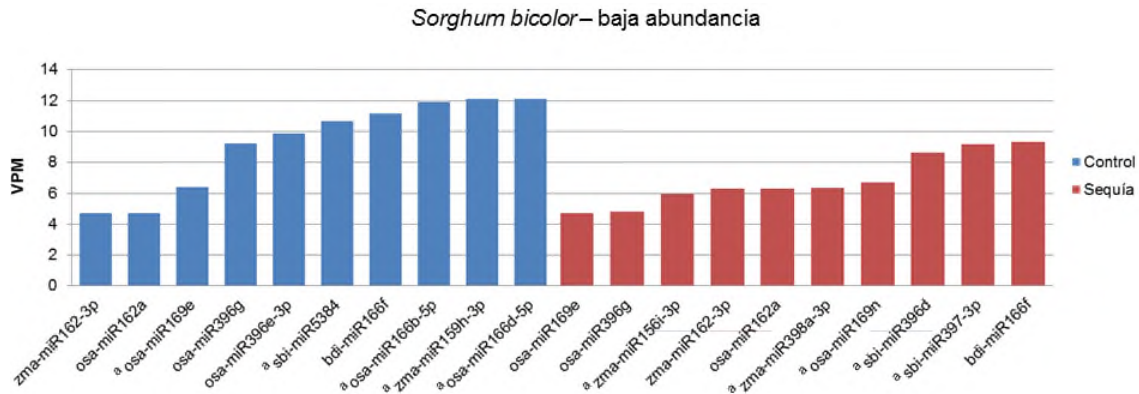


Figura 18. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de ARNs pequeños de *S. bicolor*, expresados en “veces por millón”, vpm.

En *O. sativa* los microRNAs menos abundantes se mantienen en su mayoría invariables en las condiciones control y de sequía (Fig. 19). Entre éstos se encuentran diversos miembros de familias conservadas.

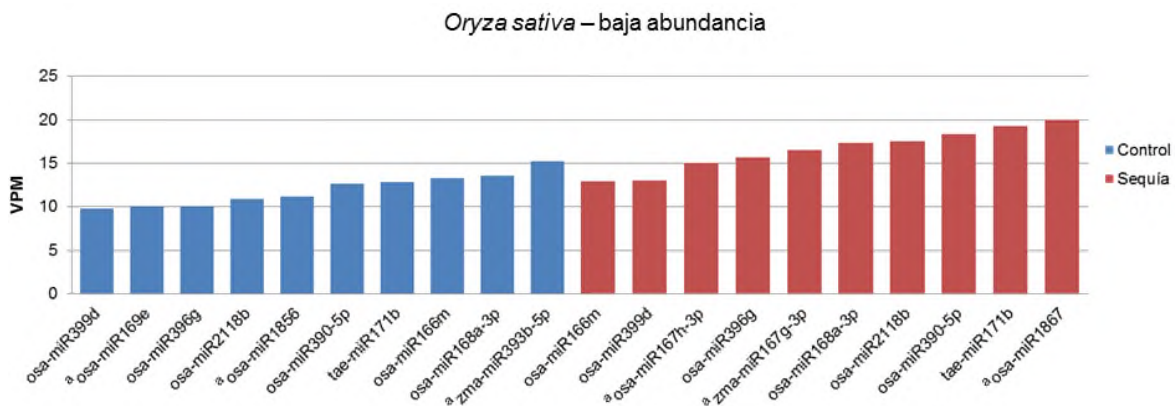


Figura 19. Los 10 microRNAs de menor abundancia en las bibliotecas de ARNs pequeños de *O. sativa*, expresados en “veces por millón”, vpm.

7.2.1 Análisis digital de la expresión diferencial

Para realizar un análisis digital de expresión diferencial e identificar microRNAs cuya acumulación aumenta o disminuye en respuesta al estrés por sequía se calculó el valor de la relación de expresión (RE), los datos de frecuencia de cada secuencia del índice. Los resultados del análisis de microRNAs inducidos son mostrados en la figura 20. Se observa que el mayor número de microRNAs

inducidos (54) se encuentra en una sola especie y que no existen microRNAs inducidos presentes en las 4 plantas bajo estudio.

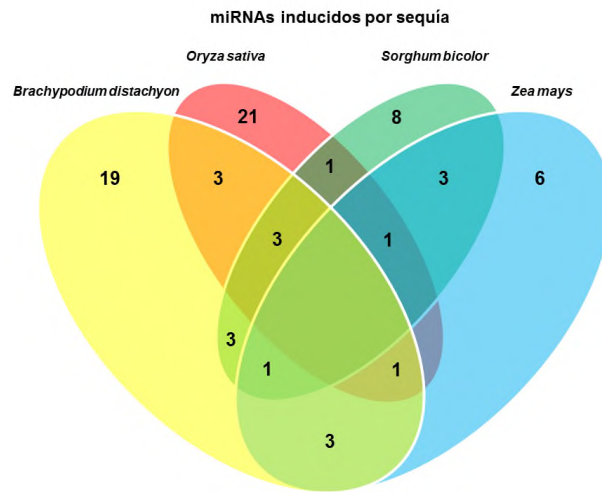


Figura 20. Diagrama de microRNAs inducidos por sequía en 4 especies monocotiledóneas.

Al realizar el análisis de microRNAs reprimidos por el estrés se observa un patrón similar al de los microRNAs inducidos (Fig. 21). La gran mayoría de los microRNAs reprimidos se encuentran en una sola especie (75), mientras que no se encuentran microRNAs comunes reprimidos en las 4 especies.

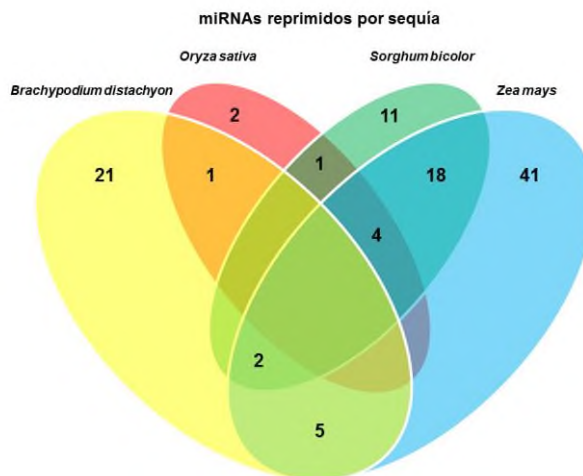


Figura 21. Diagrama de microRNAs reprimidos por sequía en 4 especies monocotiledóneas.

7.3 Selección de MicroRNAs para su validación experimental.

A partir de los resultados obtenidos del análisis de expresión diferencial mediante el cálculo de la relación de expresión en las bibliotecas de tratamiento control y de sequía, se seleccionaron los siguientes microRNAs para su validación experimental mediante qPCR como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. MicroRNAs seleccionados para análisis por qPCR y sus valores de expresión.

Id	Osa	Bdi	Zma	Sbi
miR166a-3p	1.01	1.01	1.08	1.02
miR168a-5p	1.58	1.85	1.83	1.09
miR396d	2.33	1.09	0.56	0.45
miR444b.2	2.62	1.22	1.87	3.54
miR444f	1.20	1.22	1.73	3.10
miR528-5p	0.66	0.94	0.34	0.28

En la Tabla 19 se incluye el microRNA miR166a-3p, que muestra niveles de expresión similares en los tratamientos control y sequía, equivalentes a relaciones de expresión cercanas a 1.0. Este microRNA tiene un perfil de expresión estable en las cuatro plantas en estudio, y no se altera por el estrés, es decir, tiene expresión constitutiva, por lo que se empleó como control en los ensayos de validación de la expresión. En la figura 22 se muestran las relaciones de expresión de dos miembros de la familia miR166.

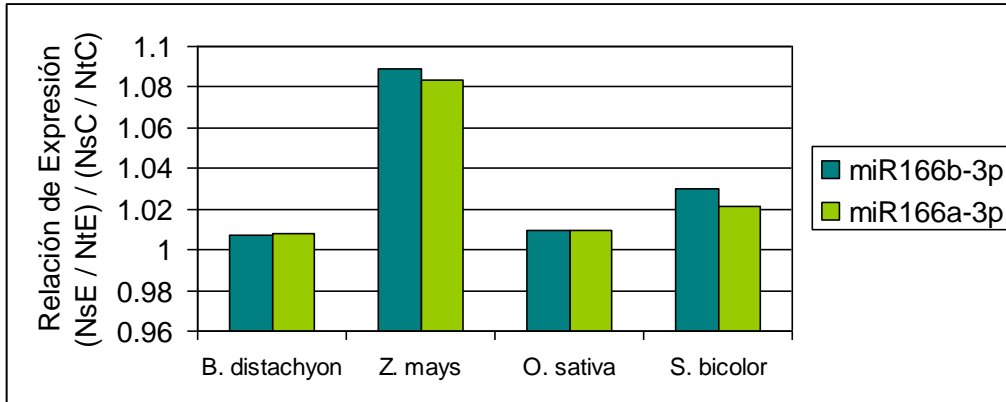


Figura 22. Relación de expresión (RE) de miR166b-3p y miR166a-3p en las especies bajo estudio.

7.4 Establecimiento del cultivo de 4 especies monocotiledóneas

Para realizar los objetivos de este trabajo, se implementaron sistemas para cultivar las especies monocotiledóneas de interés. Debido a que cada planta presentó sus propias preferencias para el cultivo, se probaron diferentes condiciones de crecimiento, diferentes sustratos y fertilizantes. Al final se lograron las mejores condiciones para el crecimiento de cada especie. En la figura 23 se muestran los espacios acondicionados para el cultivo de las plantas.



Figura 23. Izquierda: Cuarto de crecimiento acondicionado para el cultivo de *B. distachyon*. Derecha: Mini-invernadero móvil para el cultivo de sorgo, arroz y maíz.

7.5 Inducción del estrés y registro de parámetros fisiológicos

Una vez que se establecieron los cultivos de las monocotiledóneas, se indujo la sequía y se observó la aparición de síntomas de estrés. El enrollamiento de las hojas y la intensificación del color verde en las muestras bajo estrés fueron las primeras señales evidentes (Fig. 24).

A medida que avanzó el tiempo de tratamiento, se observó que 12 días de suspensión de riego fueron suficientes para notar los síntomas. Aunque al momento de la colecta, las señales de estrés eran inequívocas, se tomaron muestras para determinar el contenido relativo de agua en las hojas.

La técnica para medir el contenido relativo de agua en hojas es muy sencilla y es de gran utilidad para conocer el estado de hidratación del tejido vegetal. Está basada en la capacidad del tejido de recuperar el agua perdida cuando se le sumerge en agua desionizada durante 24 h. Sin embargo, la prueba no dio resultados concluyentes en el caso del arroz y *Brachypodium*, probablemente porque las hojas de estas plantas están densamente cubiertas de ceras y vellosidades que impiden que las células ingresen el agua de forma eficiente. En cambio, en el caso de maíz y sorgo, sí fue posible obtener registro del contenido relativo de agua en hojas (Fig. 25). De acuerdo a estos resultados, las plantas en tratamiento de estrés presentaban déficit hídrico con respecto a los controles.

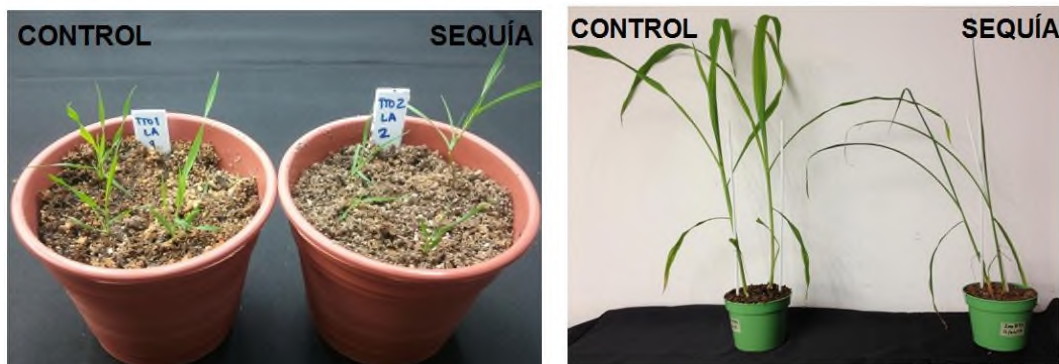


Figura 24. Derecha: Plantas de *Brachypodium* en condiciones normales (control) de humedad en suelo y en sequía. Izquierda: Plantas de maíz en condiciones normales y en sequía.

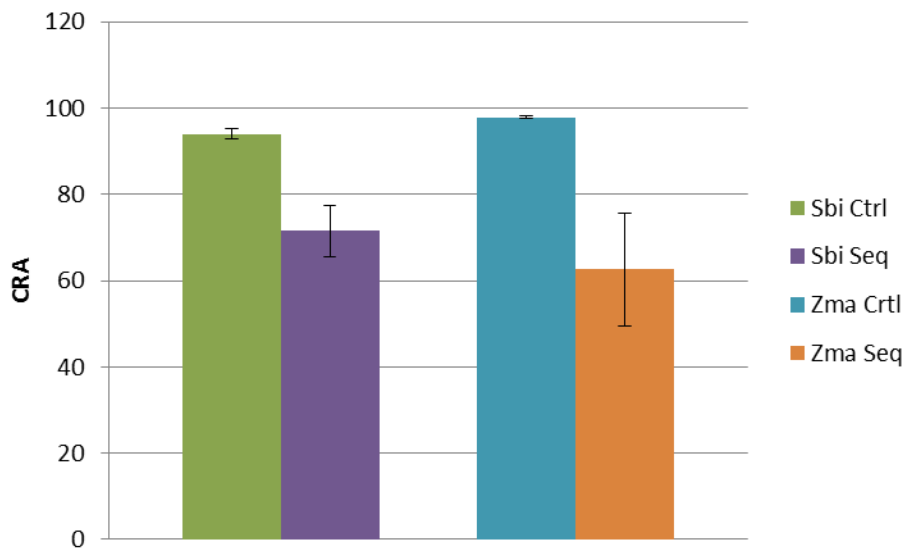


Figura 25. Contenido relativo de agua en hojas de sorgo (Sbi) y maíz (Zma) en condiciones control (Ctrl) y de sequía (Seq).

Como parámetro adicional para medir el estrés por sequía en las plantas, se determinó la fluorescencia de clorofila. Sin embargo, a través de mediciones repetitivas y con diferentes muestras, éste método no detectó diferencias en la fluorescencia de clorofila de las plantas estudiadas. En la figura 26 se muestran los datos obtenidos para las monocotiledóneas.

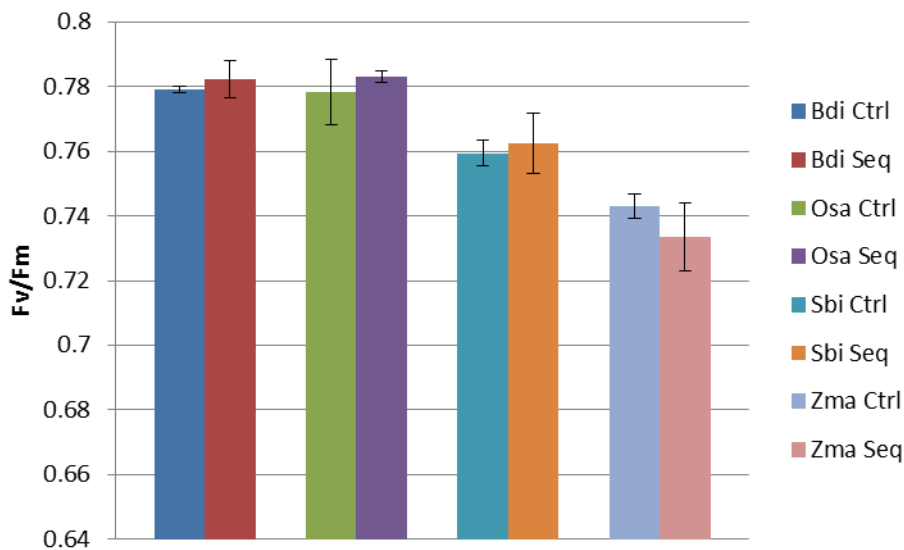


Figura 26. Fluorescencia de clorofila de las cuatro especies y sus tratamientos de control y sequía.

7.6 Extracción de ARN total

En la figura 27 se muestran imágenes de electroforesis en gel desnaturalizantes de agarosa que se realizaron para verificar la integridad de los ARNs purificados.

A partir de la imagen del gel se observa que los ARNs no muestran señales de degradación aparente y que por lo tanto pueden ser empleados para los ensayos posteriores de qPCR. Adicionalmente a la electroforesis, se midió la concentración y la pureza de los ARNs extraídos en un nanodrop. Las muestras obtenidas presentan una concentración de al menos 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de hasta 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

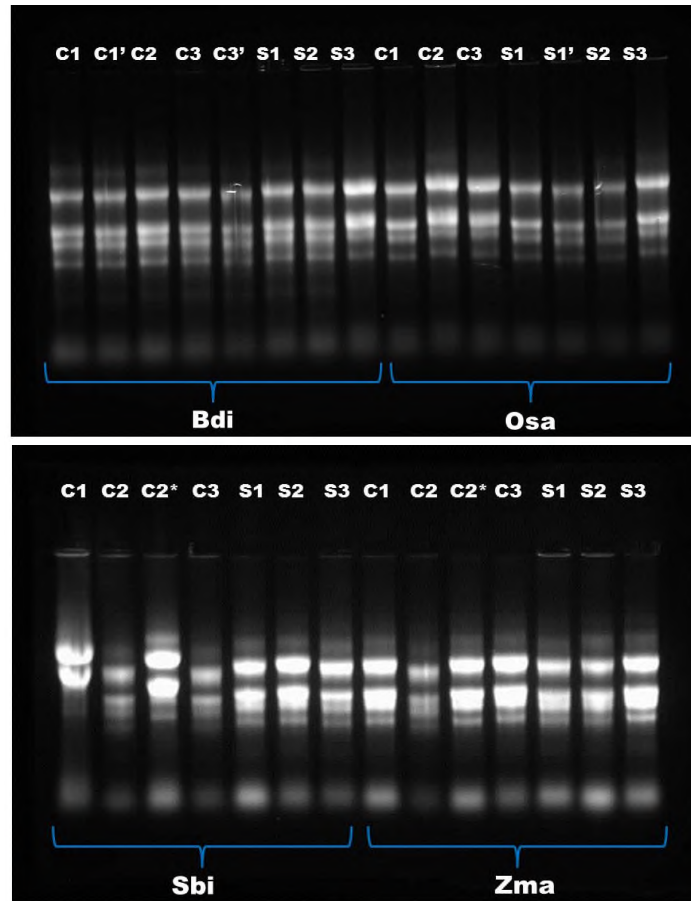


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa desnaturante de los ARNs extraídos de las plantas colectadas. Bdi: *Brachypodium*, Osa: Arroz, Sbi: Sorgo, Zma: Maíz. C1, C2, C3: Muestras control 1 al 3. S1, S2 y S3: Muestras de estrés 1 al 3. El apóstrofe (') indica una repetición de la extracción.

7.7 Análisis de expresión por qPCR.

7.7.1 Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos.

La temperatura de alineamiento óptima de todos los oligonucleótidos diseñados fue de 60 °C. En la figura 28 se muestran la electroforesis en gel desnaturantes de agarosa los productos de amplificación de tres microRNAs.

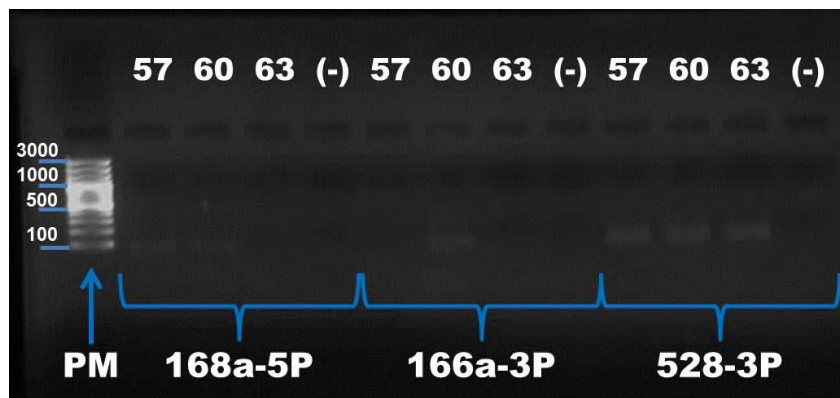


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos con los primers diseñados para amplificar el microRNA 168a-5p, 166a-3p y 529-3p en las pruebas de qPCR. En la parte superior de la imagen se especifican las temperaturas de alineamiento empleadas.

7.7.2 Diseño de un método para analizar la expresión de microRNAs mediante qPCR.

Los ensayos de expresión usados del kit comercial N-Code no dio resultados detectables por qPCR ni por electroforesis de agarosa. Se verificaron todos los componentes del kit y se encontró que la poliA polimerasa no realizaba la poliadenilación de forma eficiente. El resto del kit funcionaba bien, pero al no ocurrir la poliadenilación, no era posible generar el sitio para el primer dT. Por lo tanto, no ocurría la síntesis de ADNc.

A partir de esto se procedió de inmediato a diseñar un método distinto basado en la unión de un fragmento de DNA de secuencia conocida (adaptador) a la población total de ARNs en las muestras. El adaptador ocuparía el lugar del poli(A) del kit N-Code. El adaptador empleado es el linker 1 (Integrated DNA Technologies) que se usa para la construcción de bibliotecas de ARNs pequeños para secuenciación de Illumina. Con este método de ligación de un adaptador al extremo 3' de los ARNs pequeños pudo resolverse el problema y fue posible obtener productos de amplificación detectables mediante qPCR. El método diseñado en este trabajo se esquematiza en la figura 29.

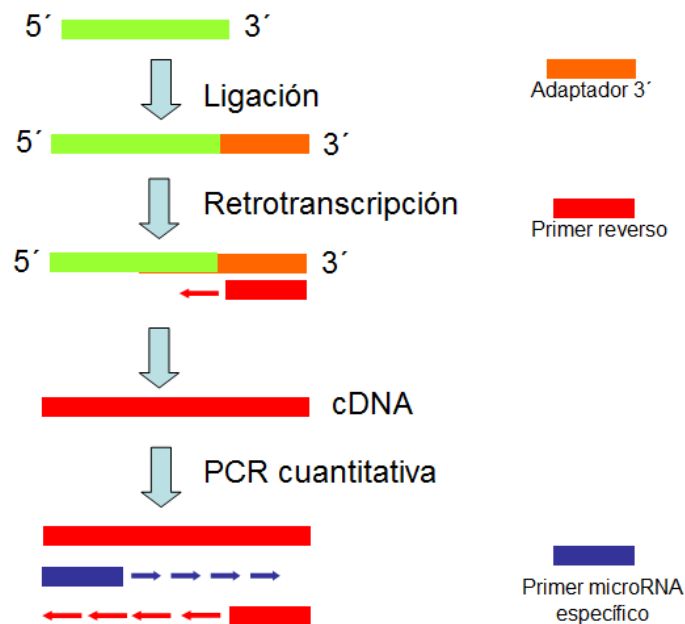


Figura 29. Procedimiento propuesto para la cuantificación de microRNAs, basado en el método de ligación 3'.

Aunque el fundamento del método que se propone ya se emplea de forma comercial en un kit (miQPCR, AMBION) con algunas variaciones, fue necesario tomar en cuenta que se emplearía un adaptador distinto al que usa el kit comercial, y que debían realizarse pruebas para verificar que el método funciona con las particularidades propias de los materiales disponibles.

Para esto se diseñaron los ensayos *spike-in* cuyos resultados de la amplificación se presentan en la figura 30. En líneas de color rojo y naranja se observa que la amplificación de la concentración de *spike* 1nM. En líneas verdes y azules se presenta la cinética de amplificación de *spike* 0.1 nM. Esto resultó en un Ct de amplificación promedio de 14.7 ciclos para 1 nM y 17.21 ciclos para 0.1 nM. El requerimiento de ~3 ciclos para alcanzar el nivel de fluorescencia de la muestra más concentrada indica que la prueba tiene la sensibilidad para detectar las diferencias.

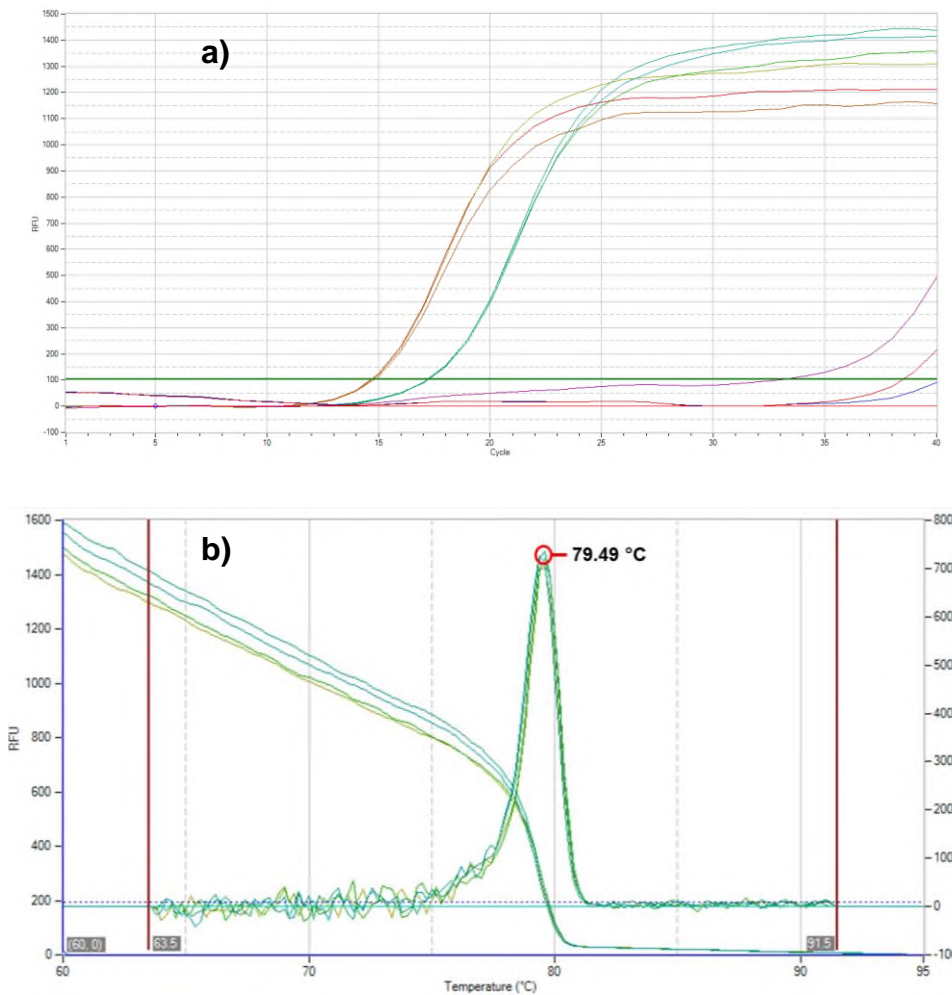


Figura 30. Análisis del ensayo del método propuesto con un *spike* de ARN. a) Cinética de amplificación; b) Curva de disociación que muestra la formación de un producto único.

7.7.3. Análisis de expresión de microRNAs selectos mediante qPCR.

Se seleccionaron cinco microRNAs para cuantificar su expresión en reacciones de qPCR. Los resultados crudos de la corrida de qPCR se emplearon para aplicar la ecuación $\Delta\Delta C_t$ [Ec. 1] empleando al microRNA166a-3p como gen de referencia (constitutivo). En la figura 31 se muestran los resultados de expresión de los microRNAs en respuesta al estrés por sequía.

Como se puede observar en la figura 31, los resultados obtenidos por qPCR indican que, en general, los microRNAs probados muestran patrones de expresión distintos a los que se obtuvieron en el análisis digital de expresión (Tabla 19). En la mayoría de los casos, los microRNAs no mostraron regulación en respuesta al estrés ($\Delta\Delta Ct$ cercano a 1.0), o bien, mostraron regulación contraria a lo esperado (inducción vs. represión, y viceversa). Un ejemplo claro de esto es miR396d, que de acuerdo a los datos digitales de expresión, se induciría en arroz y se reprimiría en maíz y sorgo (Tabla 19). En la PCR resultó lo contrario. No se observó algún caso en que un microRNA mostrara un patrón de expresión diferencial similar en más de una especie.

Las curvas de disociación de las reacciones cuantitativas (Fig. 32) muestran que son altamente específicas, puesto que se detecta un producto único para cada microRNA. Con esto queda establecida la eficiencia del método para realizar ensayos posteriores de cuantificación de los microRNAs bajo estudio.

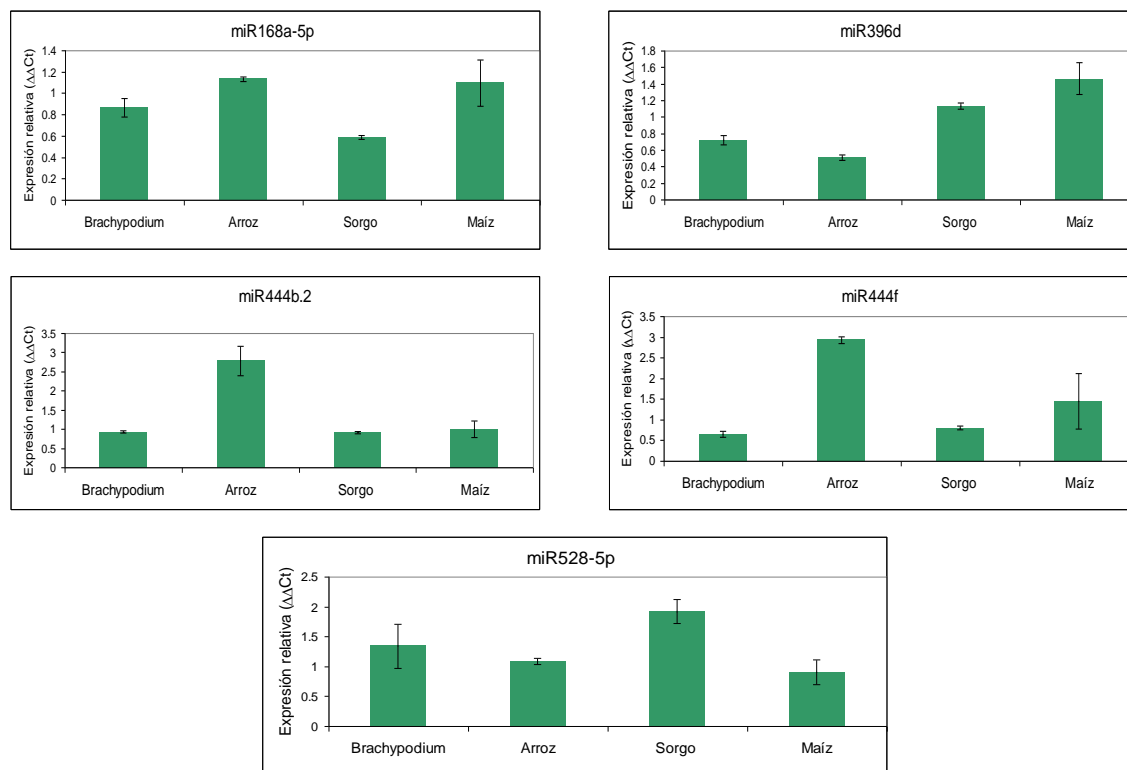


Figura 31. Resultados cuantitativos de expresión relativa obtenidos por qPCR para los microRNAs que se indican en el título de cada gráfico. MiR166a-3p se empleó como control de expresión constitutiva.

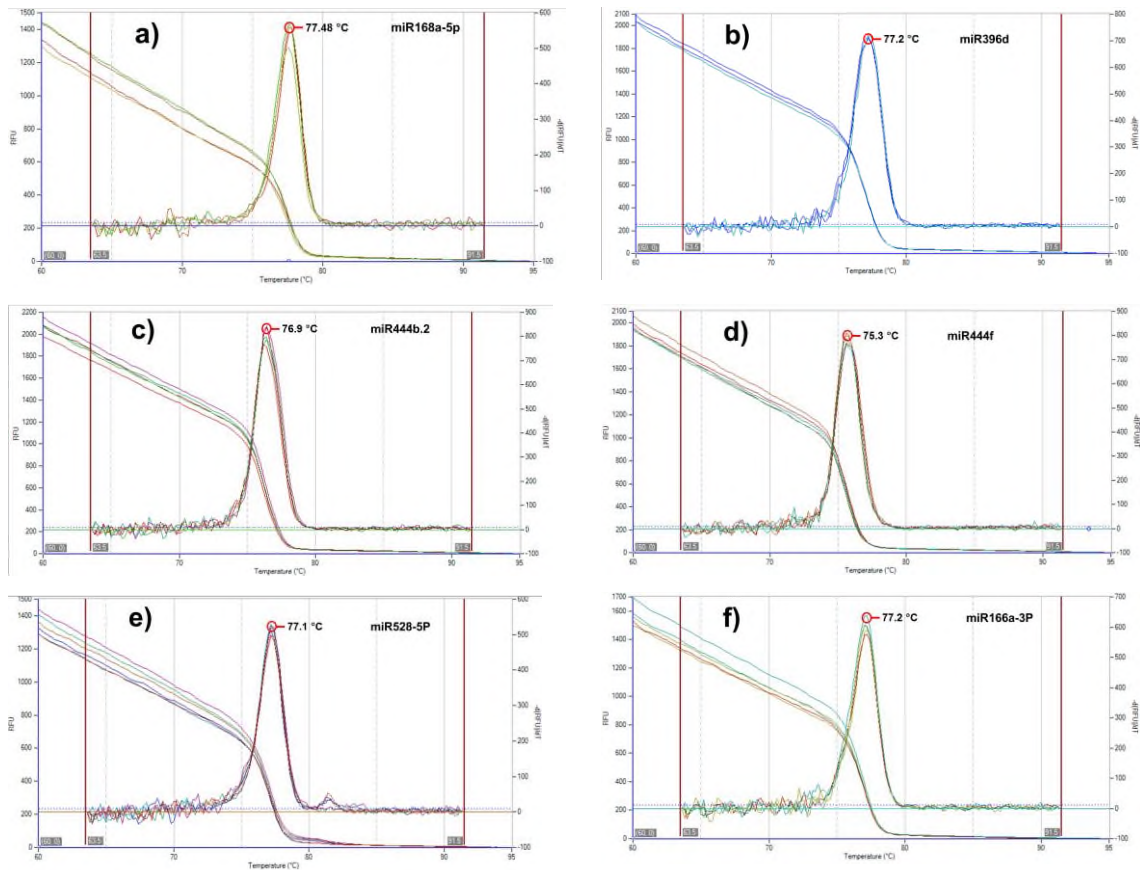


Figura 32. Curvas de disociación de los productos obtenidos en el qPCR. a) miR168a-5P; b) miR396d; c) miR444b.2; d) miR444f; e) miR528-5P; f) miR166a-3P

En el análisis de expresión de microRNAs se incluyeron dos miembros de la familia 444: miR444b.2 y mir444f. Ambos resultaron inducidos en arroz, donde probablemente actúen regulando la expresión de genes similares.

MiR444b.2 y miR444f poseen secuencias idénticas excepto por una base, por lo que se sospechó que podría estarse detectando una sola de las dos secuencias. Para eliminar esa sospecha, se analizaron las curvas de resolución de la PCR, encontrándose dos especies perfectamente definidas, tal como se muestra en la figura 33. Esto comprueba que los datos son específicos y que la técnica es sensible para detectar diferencias tan pequeñas como el cambio de una base.

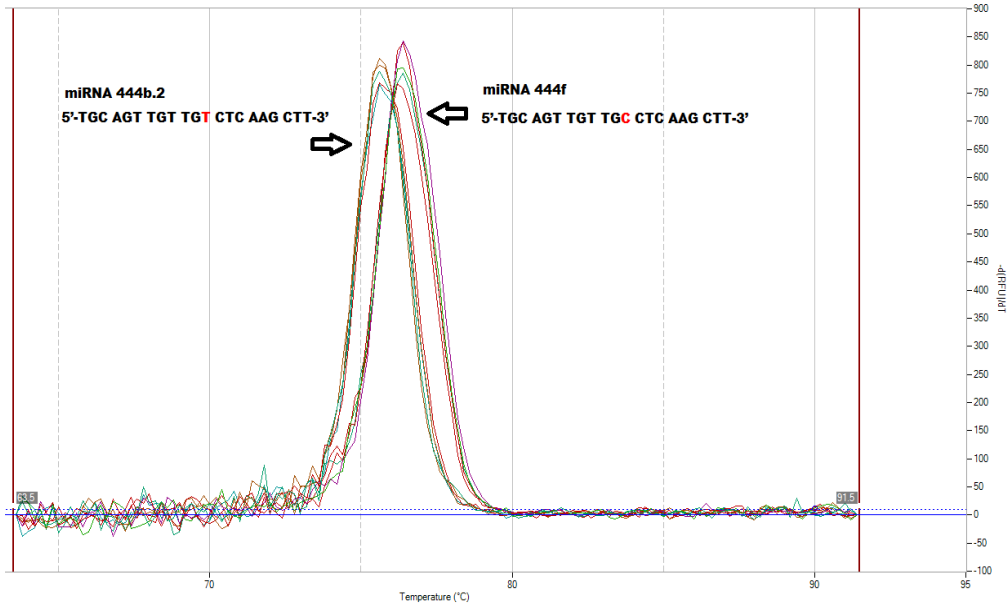


Figura 33. Curvas de disociación de los productos de miR444 en qPCR. La definición de dos picos muestra que la técnica detecta de forma específica a cada miembro de la familia de lado derecho. De lado derecho la temperatura de disociación es de 75.73 ± 0.04 y de lado izquierdo la temperatura es de 76.44 ± 0.05 ($t < 2.97E-08$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación de nuevos microRNAs

A lo largo del tiempo se han empleado diferentes estrategias para determinar la existencia de nuevos microRNAs en plantas, como la predicción de precursores a partir de secuencias genómicas o ARNs expresados. Sin embargo, la prueba final de que un microRNA existe es la demostración de que su secuencia madura, y su secuencia complementaria o microRNA*, existen también (Meyers *et al.*, 2008). La secuenciación masiva es una técnica valiosa para el descubrimiento de microRNAs en plantas y otros organismos (McGinn y Czech, 2014). En este trabajo fue posible identificar nuevas secuencias de microRNAs que no han sido aún reportadas para algunas especies. Su identificación dependió directamente de su detección en las bibliotecas.

Las nuevas secuencias identificadas probablemente no fueron encontradas previamente porque los métodos que se emplearon para secuenciar no tenían la profundidad suficiente. Esto es posible ya que año con año se mejoran los métodos de secuenciación, aumentando la profundidad y obteniendo como resultado un número cada vez mayor de secuencias. Otra razón podría ser que las bibliotecas que constituyen la base pública de datos de microRNAs han sido construidas principalmente a partir de plantas en condiciones normales, no bajo estrés. El estrés pudo haber revelado la presencia de microRNAs que se acumulan en respuesta al tratamiento, que no eran detectados en plantas bajo condiciones control. Independientemente del caso de que se trate, es importante señalar que la identificación de nuevos microRNAs es una aportación directa del análisis realizado en este trabajo.

8.2 Índice de microRNAs y cuantificación en bibliotecas de ARNs pequeños

La construcción de un índice de secuencias no redundantes resultó ser de gran utilidad en la búsqueda y cuantificación de microRNAs en bibliotecas. En este trabajo se puso énfasis en la recopilación de microRNAs de monocotiledóneas para contar con una base de secuencias que será útil en trabajos posteriores y se irá enriqueciendo a medida que más microRNAs sean reportados en estas plantas. El uso del índice en la cuantificación de microRNAs de las bibliotecas permitió analizar el nivel de redundancia de secuencias reportadas en cada planta. El hecho que las especies con la mayor especificidad de secuencias o menor porcentaje de redundancia sean aquellas que tienen más secuencias reportadas sugiere que los nuevos microRNAs que se identifiquen a futuro tenderán a ser específicos de especie. Esto sugiere que a mayor profundidad de secuenciación, mayor la probabilidad de encontrar microRNAs específicos, que en la mayoría de los casos, son además de mediana a baja abundancia.

Los microRNAs específicos, así como los conservados, tienen importancia desde el punto de vista funcional. Se espera que los conservados regulen procesos básicos para la supervivencia de las plantas, mientras que los específicos podrían también participar en ese tipo de procesos, pero adicionalmente en procesos específicos de especie o de grupo (Cuperus *et al.*, 2011).

El análisis de la abundancia de microRNAs en las bibliotecas reveló dinámicas de acumulación interesantes. Por ejemplo, la observación de que la población de microRNAs más abundantes en las plantas bajo estudio no sufrió variaciones cualitativas en respuesta al estrés (Figs. 12 a 15). En general, los microRNAs más abundantes en las plantas bajo estudio fueron miR396d, miR159a.1 y miR167d-5p. En contraste, en un estudio realizado en *O. sativa*, los microRNAs más abundantes fueron miR156 y miR168 (Yi *et al.*, 2013), mientras que en *B. distachyon* fue miR159 (Bertolini *et al.*, 2013). Estas variaciones podrían corresponder a los diferentes tipos de tejidos que se emplean para construir las bibliotecas.

En lo que respecta a los resultados de este trabajo, salvo raras excepciones, algún microRNA de la lista de los 10 más abundantes fue desplazado por otro en la condición de estrés. En otros casos, aunque la composición de microRNAs de alta abundancia no se alteró en respuesta al estrés, se observaron alteraciones cualitativas. Un ejemplo de esto es el de *O. sativa*, cuyo microRNA más abundante, miR396d se acumuló en niveles elevados en respuesta a la sequía (Fig. 15). En otro caso, el de *B. distachyon*, llama la atención que una cuarta parte de las secuencias de las bibliotecas son del microRNA396 (Apéndice C). Este nivel de acumulación es además independiente del estrés.

La función de la familia microRNA396 en plantas es el control de la expresión de proteínas involucradas en la regulación del crecimiento (Li *et al.*, 2010). Aunque, en general, miR396 es uno de los más abundantes en las plantas estudiadas, sólo en *B. distachyon* se alcanzan niveles de acumulación tan elevados. Aún queda por investigar las implicaciones funcionales de su acumulación a altos niveles en esta planta, o si esta acumulación responde a una situación particular, estado fisiológico o de desarrollo de la planta.

En contraste con los microRNAs abundantes, la población de microRNAs de baja abundancia es diversa y cambiante en respuesta a la condición de estrés (Figs. 16 a 19). Cabe cuestionar si la fluctuación de la expresión de estos microRNAs a niveles tan bajos representa alguna implicación funcional en la respuesta al estrés.

En cuanto a los microRNAs que se acumulan en el tratamiento de estrés, fue notable el hecho de que la gran mayoría de microRNAs inducidos (74%) o reprimidos (69%) en estrés se expresan diferencialmente en solo alguna de las especies (Fig. 14 y Fig. 15), mientras que solo una pequeña proporción se expresa en dos o tres especies, y ningún microRNA de respuesta se conserva en las cuatro. Esto indica que aún cuando se trata de especies del mismo grupo, es posible que respondan de forma específica al estrés, o bien, que las diferencias inherentes de cada especie, o la forma en que son afectadas por el estrés hayan contribuido a que la acumulación de microRNAs sea distinta.

A juzgar por los resultados del análisis de las bibliotecas, la respuesta al estrés por sequía es altamente específica en cada planta. Esto puede indicar el nivel de especialización que cada planta ha adquirido para responder al estrés. Aunque se trate de microRNAs conservados (que están presentes en todas las especies), el hecho de que cada especie esté expresando microRNAs diferentes en la respuesta al estrés podría indicar un nivel de especialización. Sin embargo, también se debe considerar que probablemente cada especie, al momento de la colecta de los tejidos para construir las bibliotecas, pudo haber estado experimentando diferentes niveles de respuesta al estrés, a través de mecanismos intrínsecos que no pueden controlarse fácilmente de forma externa, aún aplicando tratamientos idénticos.

Las diferencias en expresión entre especies son de esperarse; incluso, diferentes variedades de una misma especie pueden presentar diferencias en la respuesta molecular al estrés, tal como se ha observado en *Vigna unguiculata* (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011).

Derivado del análisis de expresión realizado en las bibliotecas, se pudo identificar una familia de microRNAs cuya expresión permaneció estable en los tratamientos aplicados y en todas las plantas estudiadas. La familia miR166 presentó características como estabilidad en la expresión y un buen nivel de abundancia para ser empleado como control constitutivo, o gen de referencia. Generalmente se emplean ARNs pequeños nucleolares o ARNs mensajeros como referencia para comparar la expresión de microRNAs (Xie *et al.*, 2005). Sin embargo, es deseable contar con un microRNA que pueda servir como referencia para realizar comparaciones más exactas.

En este trabajo se empleó al miR166a-3p con ese fin, aunque aún se requiere realizar más pruebas para asegurar que miR166a-3p es un buen microRNA constitutivo de referencia para ensayos de estrés por sequía. Para esto será necesario realizar cinéticas de expresión a lo largo de la duración del estrés y a lo largo de distintas etapas de desarrollo de la planta; además, será necesario compararlo con algunos de los controles constitutivos que se utilizan

rutinariamente en estos ensayos, como el ARN pequeño nucleolar U6 (Xie *et al.*, 2005).

8.3 Cuantificación de la expresión de microRNAs por qPCR

De acuerdo al análisis digital de la expresión en las bibliotecas, se seleccionaron 5 microRNAs para su validación experimental (Tabla 19). Estos microRNAs se seleccionaron debido a que:

- a) Se inducen (miR168-5p, miR396d, miR444b.2 y miR444f) o se reprimen (miR528-5p) en más de una especie.
- b) Son microRNAs conservados en plantas (miR168-5p y miR396d).
- c) Son específicos de monocotiledóneas (miR444b.2, miR444f y miR528-5p).

Después de que se eligieron los microRNAs con base en el análisis de su expresión relativa en las bibliotecas, fue necesario realizar la validación experimental de su expresión. Aunque la secuenciación de bibliotecas de ARNs pequeños y su análisis es suficiente para identificar microRNAs de respuesta a estrés, es recomendable realizar la verificación de la expresión por otros métodos. Para esto se estableció el cultivo de cada una de las especies monocotiledóneas bajo estudio, toda vez que se determinaron las condiciones óptimas para su crecimiento, así como los parámetros necesarios, como el tiempo necesario para inducir el estrés y determinar su intensidad y efectos.

A pesar de que los métodos empleados para estudiar la fisiología del estrés por sequía en las plantas en este trabajo (fluorescencia de clorofila y contenido relativo de agua en hojas) son técnicas estándar, no fue posible obtener resultados concluyentes a partir de éstas en todas las plantas. Por ejemplo, la fluorescencia de clorofila no mostró cambios cuando se compararon plantas en tratamiento control con plantas en tratamiento de estrés. El nivel de estrés que alcanzaban las plantas tratadas para los ensayos de expresión no era suficiente

para inducir cambios. Sólo niveles de estrés muy severos lograron cambios en la fluorescencia de clorofila. Sin embargo, tales niveles de estrés de deshidratación severa están fuera del límite de estrés fisiológico deseable para estudiar la respuesta molecular mediada por microRNAs en este trabajo. A diferencia, en el trabajo publicado por Luo *et al.*, (2011) sí se obtuvieron datos de fluorescencia de clorofila en *B. distachyon* que permitieron comparar el nivel de tolerancia a la sequía entre variantes naturales.

Por otra parte, la medición del contenido relativo de agua en hojas es también una técnica estándar. Sin embargo, las plantas cuya superficie foliar presenta abundancia de vellosidades, como es el caso de *O. sativa* y *B. distachyon*, dificultaron las determinaciones de este parámetro.

Una vez que se establecieron los sistemas biológicos de estudio y se aplicaron los tratamientos, se procedió al análisis molecular de la expresión de microRNAs seleccionados mediante dos estrategias: una comercial y otra de diseño. La estrategia comercial no rindió resultados. La enzima poli(A) polimerasa tenía escasa o nula actividad, por lo que no se formaba la cola de poliA necesaria para iniciar la síntesis del ADN complementario y la reacción de qPCR. Por tal razón, se diseñó la estrategia alternativa de ligación de un adaptador en el extremo 3' de los microRNAs. La estrategia de diseño fue validada y mediante su aplicación se observó que, en general, los microRNAs probados no reflejan los patrones de expresión que se obtuvieron en el análisis digital de expresión de las bibliotecas.

Si bien, esta discordancia no valida los resultados del análisis digital de expresión, tampoco los invalida. Ambos resultados son válidos. Las diferencias se pueden explicar analizando los siguientes puntos:

a) Regularmente, el grupo de investigación que construye las bibliotecas realiza también la confirmación experimental de los resultados, ya sea por Northern blot o qPCR (Ferreira *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2013). Esto aumenta las posibilidades de éxito para validar la información ya que se han estandarizado los métodos para la

preparación de los materiales vegetales, para inducir el estrés y para coleccionar las muestras en el momento adecuado.

En el presente trabajo se anticipaba que al tomar bibliotecas construidas de tejidos diversos, bajo condiciones de estrés ligeramente distintas, se podrían tener variaciones en los resultados. Sin embargo, se asumió el hecho de utilizar los resultados del análisis digital de la expresión en bibliotecas como una referencia para seleccionar microRNAs potenciales de ser validados mediante qPCR.

b) Para los casos en que no fue posible validar mediante qPCR los resultados del análisis de las bibliotecas, específicamente cuando se esperaba que un microRNA se expresara en respuesta a sequía en más de una variedad, es probable que en los experimentos realizados para la validación no se haya capturado la expresión en el tiempo en que todas las especies estaban acumulando a un microRNA específico.

c) Es posible que plantas de diferentes especies posean mecanismos de tolerancia constitutivos, que explicarían las diferencias en tamaño, ciclo de vida, grosor de las hojas, longitud de las raíces, entre otras adaptaciones. Estas diferencias constitutivas podrían producir diferencias en el nivel de estrés que experimenta cada especie. Aún cuando el estrés se lleve a cabo en experimentos lado a lado, y que cada especie sea expuesta al mismo número de días sin agua, es muy probable que en cada especie se lleven a cabo mecanismos del tipo constitutivo que resulten en diferentes capacidades para tolerar el estrés, de tal forma que al coleccionar, las plantas se encuentren experimentando diferentes fases de la respuesta al estrés, y por lo tanto, sean diferentes microRNAs lo que en ese momento se encuentran acumulados. Esto no significa que los microRNAs comunes no se acumulen en respuesta al estrés, sino que tal vez ya se acumularon y volvieron a niveles normales, o bien, que aún no se alcanza el nivel de la ruta de respuesta para inducirlos.

8.4 Importancia biológica de microRNAs de respuesta a sequía

La expresión de miR396d, miR444b.2, miR444f y miR528-5p en respuesta a sequía fue validada en el análisis de bibliotecas y en los ensayos de qPCR. MiR396 regula a una familia de 11 factores reguladores del crecimiento en arroz (Li *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010). Su acumulación en condiciones de estrés sugiere la represión de factores de crecimiento, probablemente para redirigir los recursos energéticos hacia otros aspectos del metabolismo, en donde se requieren para responder al estrés. Esto confirma que los procesos de crecimiento son altamente sensibles al estímulo de sequía y que los microRNAs participan en su regulación bajo condiciones de estrés.

MiR444b.2 y miR444f pertenecen a una familia de microRNAs de múltiples miembros que ha sido considerada como específica de monocotiledóneas (Sunkar y Jagadeeswaran, 2008), lo que hace interesante su estudio. La familia miR444 tiene por blanco a múltiples genes que codifican proteínas con caja MADS (MADS Box Factors), los cuales son factores de transcripción involucrados en una amplia gama de procesos (Li *et al.*, 2010). Aún no se han investigado las implicaciones adaptativas que tiene la conservación de la familia miR444 en monocotiledóneas y la regulación de sus blancos, por lo que se espera que en trabajos futuros pueda ampliarse su estudio, especialmente en lo que respecta a la respuesta a la sequía.

Por otra parte, miR528-5p es un microRNA conservado en monocotiledóneas que tiene como blancos a varios genes de funciones no relacionadas (Li *et al.*, 2010). Su expresión y su actividad sobre genes blanco ha sido estudiada principalmente en embriones de arroz (Xue *et al.*, 2009), por lo que aún está pendiente explorar sus implicaciones funcionales en monocotiledóneas en respuesta a la sequía.

8.5 Consideraciones finales

El presente trabajo permitió la identificación de 4 microRNAs de respuesta a sequía; uno de ellos perteneciente a la familia miR396, ampliamente conservada en plantas, y tres conservados únicamente en monocotiledóneas. Adicionalmente, ha evidenciado la dificultad de establecer un sistema de estudio que permita la comparación entre especies en la respuesta molecular a un estímulo, especialmente si el muestreo se realiza en un punto estático de la progresión del estrés. De cualquier forma, aquellos microRNAs que han sido identificados por su respuesta diferencial al estrés en diferentes especies en el análisis de las bibliotecas son fidedignos, propiamente verdaderos positivos. Sin embargo, aquellos que se acumulan en una sola especie, podrían ser falsos negativos, pues es probable que en otro punto de la dinámica del estrés puedan alterar su nivel de expresión en las otras especies. Por su parte, los microRNAs que alteraron sus niveles en respuesta al estrés por sequía en las pruebas de qPCR, como es el caso de miR444b.2 y miR444f, también son fidedignos.

Por lo que respecta a la duración del estrés, es importante señalar que la mayor parte de los trabajos en los que se han identificado microRNAs de expresión en estrés, se basan en tratamientos del tipo choque, es decir, tratamientos cortos, progresivos y severos, como sacar las plantas de su maceta y dejarlas secar sobre un papel filtro, o bien, cultivarlas en sustratos o soportes con muy baja retención de agua, en los que bastan unos cuantos días para inducir el estrés.

Cabe señalar que en este trabajo se ha empleado un estrés prolongado que progresa lentamente, no un tratamiento de choque. El emplear un tratamiento de choque tiene la ventaja de acortar los tiempos y detectar en forma muy reproducible un tipo de respuesta inmediata al estrés. Sin embargo, esta respuesta es muy rápida y se aleja de lo que ocurre en condiciones naturales. No podría interpretarse como una respuesta adaptativa natural, sino de emergencia. En cambio, un tratamiento de estrés más prolongado, con disminución gradual de la humedad en el suelo se asemeja más a lo que ocurre con las plantas en el campo. No obstante, por otra parte, al ampliar la ventana de tiempo del estrés,

también se corre el riesgo de encontrarse en etapas diferentes de la respuesta, complicando la comparación entre especies y experimentos.

Debido a la naturaleza y a las perspectivas de investigación a futuro, se optó por un estrés más similar al que ocurre en el ambiente natural, por lo que se asumen las dificultades provocadas por este diseño experimental al momento de interpretar los resultados.

9. CONCLUSIONES

- En monocotiledóneas se identificó a miR444a, miR444f y miR528-5p como microRNAs específicos cuyo patrón de expresión diferencial se encuentra conservado en respuesta al déficit hídrico. Por lo tanto, se acepta la hipótesis.
- El análisis de bibliotecas de ARNs pequeños de plantas monocotiledóneas permitió la identificación de microRNAs en especies en las que no se habían reportado.
- Los microRNAs 396d, 159a.1 y 167d-5p son los más abundantes en las plantas estudiadas, independientemente del tratamiento de estrés.
- MiR166a-3p se propone como gen de referencia modelo, ya que muestra expresión estable entre tratamientos y especies.
- El método de ligación de adaptador propuesto en este trabajo es adecuado para analizar la expresión de microRNAs por qPCR.
- El análisis de expresión de un microRNA en un punto estático de la progresión del estrés, ya sea por construcción de bibliotecas o qPCR, no es prueba suficiente para descartar que el microRNA altere su expresión en respuesta al estrés.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar microRNAs adicionales que participen en la respuesta al estrés, por ejemplo, miR164a, miR159a.1, miR396c-5p y miR408-3p.
- Analizar la expresión de microRNAs en varios puntos de una cinética de estrés para concluir sobre la conservación de la respuesta en monocotiledóneas.
- Caracterizar funcionalmente a la familia miR444, sus genes blanco y su papel en la respuesta y la tolerancia al estrés por sequía

11. REFERENCIAS

1. Agilent (2012) Introduction to quantitative PCR. Methods and application guide.
http://www.chem.agilent.com/library/brochures/Brochure_Guide%20to%20QPCR_IN70200C.pdf
2. AGROASEMEX (2006) La experiencia mexicana en el desarrollo y operación de seguros paramétricos aplicados a la agricultura. Agroasemex.
<http://www.agroasemex.gob.mx>, pp. 42.
3. Apel, K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
4. Arenas-Huertero C, Pérez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Mol Biol*, 70: 385-401.
5. ASERCA (2013) MASAGRO por la seguridad alimentaria y el desarrollo agrícola sustentable de México. *Claridades Agropecuarias*, 237.
6. Audic S, Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 7: 986-995.
7. Axtell MJ, Bowman JL (2008) Evolution of plants microRNAs and their targets. *Trends Plants Sci* 13:343-9.
8. Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu Z, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu JK, Renyi L (2011) Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology* 11: 127.
9. Barrera-Figueroa BE, Gao L, Wu Z, Zhou X, Zhu J, Jin H, Liu R, Zhu JK (2012) High throughput sequencing reveals novel and abiotic stress-regulated microRNAs in the inflorescences of rice. *BMC Plant Biology*, 12: 132.
10. Barrera-Figueroa BE, Peña-Castro JM, Acosta-Gallegos JA, Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B (2007) Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Functional Plant Biology* 34: 368-381.
11. Barrs C, Weatheley PE (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Science* 15, 413-428.

12. Bartel B (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.
13. Benavides MA (2002) Ecofisiología y química del estrés en plantas. Departamento de agricultura/UAAAN.
14. Benes V, Castoldi M (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50 (2010) 244–249.
15. Bertolini E, Verelst W, Horner DS, Gianfranceschi L, Piccolo V, Inzé D, Pè ME, Mica E (2013) Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Mol. Plant* 6: 423-443.
16. Bidinger FR, Hash CT (2004) En: *Physiology and Biotechnology Integration for Plant Breeding*. Editado por Henry T. Nguyen y Abraham Blum. Ed. Marcel Dekker, Inc.
17. Blum A (1989) Breeding methods for drought resistance. En: *H.G. Jones, T.J. Flowers y M.B. Jones (eds.). Plants Under Stress*. Society for Exp. Biol. Seminar series 39. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
18. Bohnert HJ, Sheveleva E, (1998) Plant stress adaptations making metabolism move. *Curr. Op. Plant Biol.* 1:267-274.
19. Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-447.
20. Bray EA (2007) Plant response to water-deficit stress. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0001298.pub2]
21. Campos-De Quiroz (2002) Plant genomics: an overview. *Biol. Res* 35: 385-399.
22. CENAPRED (2012) Atlas nacional de riesgos http://www.atlasnacionalderiesgos.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=80&Itemid=192
23. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33: e179.
24. Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579: 5923- 5931.
25. Chitwood DH, Guo MJ, Nogueira FTS, Timmermans MCP (2007) Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex. *Development* 134: 813-823.

26. CNA (2013) Consejo Nacional Agropecuario. En LAROUCHE PAC. <http://spanish.larouchepac.com/node/19435>
27. CNN-México (2012) La sequía en México causa pérdidas millonarias en el campo mexicano. <http://mexico.cnn.com/nacional/2012/02/09/la-sequia-en-mexico-causa-perdidas-millonarias-en-el-campo-mexicano>
28. CONAGUA (2013) http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=236&Itemid=74
29. Covarrubias-Robles AA (2007) Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología* V14, CS3: 253-262.
30. Cuperus NT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of miRNA genes. *The Plant Cell* 23:431- 442.
31. Cutler DF, Alvin KL, Price CE (1982) *The Plant Cuticle*. Academic Press, London.
32. Dalmay T (2006) Short RNAs in environmental adaptation. *Proc. of The Royal Soc*, 273: 1579-1585.
33. Dure III L (1993) Structural motifs in Lea proteins. pp. 91-103. En: Close, T.J. y E. Bray (eds.). *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
34. *El economista* (2011) <http://eleconomista.com.mx/estados/2013/06/16/40-mexico-afectado-sequia>
35. *El economista* (2012) <http://eleconomista.com.mx/finanzas-publicas/2012/02/09/sequia-propicia-grandes-perdidas>
36. FAO (2008) FAOSTAT Base de Datos Estadísticos. <http://faostat.fao.org/>
37. FAO (2009) How to feed the World in 2050? Resumen ejecutivo. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
38. FAOSTAT (2011) Food and Agricultural Commodities Production. Faostat, FAO, Dirección de Estadística.
39. Ferreira TH, Gentile A, Vilela RD, Costa GG, Dias LI, Endres L, Menossi M (2012) MicroRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum spp.*). *PLoS One* 7: e46703.
40. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews- Genetics* 9: 102-114.

41. Financiera Rural (2011) Monografía del Sorgo Grano.
42. Galarza MJM, Miramontes PJ, Castillo M, Rebolledo MA (2004) Situación Actual y Perspectivas de la Producción de Sorgo en México 1992-2003. SIAP, SAGARPA. México. Pp.93.
43. Geiger DR, Servaites JC (1991) Carbon allocation and response to stress. In response of plants to hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. J. Biol. Chem. 275(8):5668-5674.
44. Gentile A, Ferreira TH, Mattos RS, Dias LI, Hoshino AA, Carneiro MS, Souza GM, Calsa T Jr, Nogueira RM, Endres L, Menossi M (2013) Effects of drought on the microtranscriptome of field-grown sugarcane plants. Planta 237(3): 783-98.
45. Gibson AC (1996) Structure-Function Relations of Warm Desert Plants. Adaptations of desert organisms. Springer-Verlag Berlin.
46. Gutiérrez-Bonilla LA, Montfort GF, López FE (2006) Impacto económico en el sector agrícola. En: Inundaciones 2005 en el estado de Veracruz. Eds. Tejeda MA, Welsh RC. Universidad Veracruzana p. 135-158.
47. Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M, Guo ZF (2011) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. Mol. Biol. Rep.
48. IBI (2010) International *Brachypodium* Initiative (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Nature 463:763-768.
49. Informador (2013) <http://www.informador.com.mx/economia/2013/458000/6/sequia-afecta-a-128-millones-hectareas-en-el-pais-conafor.htm>
50. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu. Rev. Plant Biol, 57: 19–53.
51. Kantar M, Lucas S, Budak H (2011) MiRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. Planta, 233: 471-484.
52. Kantar M, Unver T, Budak H (2010) Regulation of barley miRNAs upon dehydration stress correlated with target gene expression. Funct Integr Genomics 10(4):493-507.
53. Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2011) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1819: 137-48.

54. Kramer PJ (1983) "Drought Tolerance and Water Efficiency", en: Water Relations of Plants, Nueva York, Academy Press, pp. 390-415p.
55. Kültz D (2005) Molecular and evolutionary basis of cellular stress response. *Annu Rev Physiol.* 67: 225-257.
56. La Jornada (2013) Tamaulipas ha perdido por sequía 90 mil hectáreas de cultivos. <http://www.jornada.unam.mx/2013/04/13/estados/026n2est>
57. LaRouche (2013) Resumen ejecutivo. La sequía en México exige el "NAWAPA-Plus" http://www.larouchepub.com/spanish/pdfs/2013/0625-water_for_mexico.pdf
58. Lelandais-Brière C, Sorin C, Declerck M, Benslimane A, Crespi M, Hartmann C (2010) Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Curr. Genomics* 11(1): 14-23.
59. Li JS, Fu FL, An M, Zhou SF, She YH, Li WC (2013) Differential expression of microRNAs in response to drought stress in maize. *J. Integr. Agric.* 12: 1414-1422.
60. Li WX, Oono Y, Zhu J, He X J, Wu J M, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008) The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance, *Plant Cell* 20: 2238–2251.
61. Li YF, Zheng Y, Addo-Quaye C, Zhang L, Saini A, Jagadeeswaran G, Axtell MJ, Zhang W, Sunkar R (2010) Transcriptome-wide identification of microRNA targets in rice. *Plant Journal* 62: 742-759.
62. Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14: 836-843.
63. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25(4): 402-408.
64. Lu SF, Sun YH, Chiang VL (2008) Stress-responsive microRNAs in *Populus*, *Plant J.* 55: 131–151.
65. Luo N, Liu J, Yu X, Jiang Y (2011) Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141: 19-29.
66. Luo Y, Guo Z, Li L (2013) Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Dev Biol.* 380(2): 133-44.
67. Lv S, Nie X, Wang L, Du X, Biradar SS, Jia X, Weining S (2012) Identification and characterization of microRNAs from barley (*Hordeum vulgare* L.) by high-throughput sequencing. *Int. J. Mol. Sci.* 13(3): 2973-2984.

68. Maurel C, Chrispeel MJ (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125:135-138.
69. McGinn J, Czech B (2014) Small RNA library construction for high-throughput sequencing. *Methods in Molecular Biology* 1093: 195-208.
70. Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu JK (2008) Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20:3186-3190.
71. Nilsen ET, DM Orcutt (1996) *Physiology of plants under stress. Abiotic factors.* John Wiley and Sons, New York, NY.
72. NOAA (2006) North American drought monitor. National Oceanic and Atmospheric Administration. USA. <http://www.ncdc.noaa.gov/oa/climate/monitoring/drought/nadm>
73. Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH (2008) *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci.* 13: 172-177.
74. Ortega-Gaucin D (2012) Sequía en Nuevo León: vulnerabilidad, impactos y estrategias de mitigación. Instituto del Agua del Estado de Nuevo León. Apodaca, N.I. 222 pp.
75. Pinhero RG, Rao MV, Palyath G, Murr DP, Fletcher RA (2001) Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 695-704.
76. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes and Development* 16;1616-1626.
77. Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal* 49: 592-606.
78. Saldaña-Zorrilla SO (2007) Socioeconomic vulnerability to natural disasters in Mexico: rural poor, trade and public response. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. United Nations Publication. 64 pp.
79. Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yan L (2004) A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acid Research* 32: e43.
80. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C (2008) Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44: 31-38.

81. Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a Full-Length cDNA macroarray. *The Plant Cell* 13, 61-72.
82. SIAP (2010) Situación actual y perspectiva del arroz en México. 1990-2010. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Arroz.pdf
83. SIAP (2012) Índice de maíz. Portal OEIDRUS <http://www.campomexiquense.gob.mx/docs/maiz.pdf>
84. SIAP (2013) Atlas Agroalimentario. <http://www.siap.gob.mx/atlas2013/index.html>
85. SIAP-SIACON (2011) Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México.
86. SIL (2012) Sistema de Información Legislativa http://sil.gobernacion.gob.mx/Archivos/Documentos/2012/03/asun_2863068_20120322_1332429560.pdf
87. Singh KB (1998) Transcriptional regulation in plants: The importance of combinatorial control. *Plant Physiology* 118: 1111-1120.
88. Sinha (2004) *Modern Plant Physiology*. Alpha Science International Ltd. pp. 556.
89. SPEI Global Drought Monitor (2014) <http://sac.csic.es/spei/map/maps.html>
90. Sun G, Stewart CN, Xiao P, Zhang B (2012) MicroRNA expression analysis in the cellulosic biofuel crop Switchgrass (*Panicum virgatum*) under abiotic stress. *PLoS One* 7(3): e32017.
91. Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biology* 8: 37.
92. Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2001-2019.
93. Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. Second Edition. Ed. Sinauer Associates, Inc. USA. pp. 792.
94. Tamura T, Hara K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131, 454-462.

95. Trindade I, Capitaó C, Dalmay T, Feveireiro M, Santos D (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231: 705-716.
96. Turner NC (1986) Adaptation to water deficits: a changing in perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 175-190.
97. UNESCO (2006)
http://www.unesco.org/bpi/pdf/memobpi40_desertification_es.pdf
98. Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes and Development* 20: 759-771.
99. Wang L, Gu X, Xu D, Wang W, Wang H, Zeng M, Chang Z, Huang H, Cui X (2010) MiR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62: 761-773.
100. Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y. (2010) Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. *Funct. Integr. Genomics*, 10:533-546.
101. Wei LY, Zhang DF, Xiang F, Zhang ZX (2009) Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *Int. J. Plant Sci.* 170: 979–989.
102. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology* 138: 2145-2154.
103. Xue LJ, Zhang JJ, Xue HW (2009) Characterization and expression profiles of miRNAs in rice seeds. *Nucleic Acids Research* 37: 916-930.
104. Yancey, PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus PD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214-1217.
105. Yang L, Zheng B, Mao C, Qi X, Liu F, Wu P (2004) Analysis of transcripts that are differentially expressed in three sectors of the rice root system under water deficit. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 433-442.
106. Yi R, Zhu Z, Hu J, Qian Q, Dai J, Ding Y (2013) Identification and expression analysis of microRNAs at the grain filling stage in rice (*Oryza sativa* L.) via deep sequencing. *PLOS One* 8: e57863.
107. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology* 289: 3-16.

108. Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 585-590.
109. Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*, *J. Exp. Bot.* 61: 4157–4168.
110. Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247–273.

12. APÉNDICES

APÉNDICE A: Formulación de soluciones empleadas

- Amortiguador TBE 10X

Componente	Volumen (1000 mL)
TRIS base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA (0.5 M)	40 mL
Agua desionizada	Aforar a 1000 mL

Para prepara un litro de amortiguador, diluir TRIS base en 100 mL de agua desionizada, después agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente. Agregar EDTA y aforar a 200 mL. Almacenar a temperatura ambiente. Para preparar TBE 5X agregar 50 mL de TBE 10X en 50 mL de agua desionizada.

- Gel acrilamida 6% nativo

Componente	Volumen (10 mL)
Agua desionizada	6.4 mL
5X TBE	2 mL
Acrilamida 40 % (bis)	1.5 mL
APS 10 % *	100 µL
TEMED	10 µL

*Añadir 100 mg de persulfato de amonio en un microtubo de 1.5 mL, posteriormente agregar 1 mL de agua desionizada agitar, hasta disolver la sal. Almacenar a 4 °C.

Agregar los primeros cuatro componentes a un tubo cónico de 15 mL y agitar suavemente mediante inclinación del tubo durante 5-10 s. Agregar el TEMED al tubo y agitar de la misma forma durante 5 s. Se debe tener preparada la cámara de electroforesis donde se va a vaciar la solución ya que la adición del TEMED produce la polimerización casi inmediata. La agitación mediante inclinación se usa para evitar la formación de burbujas en el gel.

- EDTA 0.5 M pH 8.0

Componente	Volumen (50 mL)
EDTA	9.305 g
NaOH	Suficiente para pH 8.0
Agua desionizada	Aforar a 50 mL

Agregar el EDTA a 40 mL de agua desionizada. Ajustar a pH 8.0 con NaOH mientras se agita hasta disolver el EDTA. Aforar a 50 mL. Si es para muestras de ARN usar agua DEPC. Almacenar cerrado a temperatura ambiente.

- TAE 10X

Componente	Volumen (1000 mL)
TRIS base	48.5 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
EDTA (0.5 M)	20 mL
Agua desionizada	Aforar a 1000 mL

Disolver el TRIS, ácido acético y EDTA en 800 mL de agua. Aforar a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente. Para preparar 1 litro de TAE 1X agregar 100 mL de TAE 10X y 900 mL de agua desionizada.

- Agarosa 1 %

Componente	Volumen (100 mL)
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL

En un frasco con tapa de 250 mL añadir 100 mL de TAE 1X y 1g de agarosa. Calentar y agitar la solución en microondas o una parrilla hasta disolver la agarosa, evitar la ebullición.

- Agua DEPC

Componente	Volumen (1000 mL)
Dietil pirocarbonato	1 mL
Agua desionizada	1000 mL

Agregar el volumen de DEPC al agua desionizada y mantener en agitación de 12 a 24 h. Esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min. Mantener a temperatura ambiente.

- NaOH 2 N

Componente	Volumen (100 mL)
NaOH	8 g
Agua desionizada	100 mL

Agregar 8 g de NaOH a 100 mL de agua desionizada en un frasco y mezclar hasta disolver. Almacenar a temperatura ambiente.

- MOPS 10X pH 7.0

Componente	Volumen (500 mL)
MOPS	20.927 g
Acetato de sodio	5.44 g
EDTA (0.5 M)	10 mL
NaOH (2 N)	Suficiente para pH 7.0
Agua DEPC	Aforar a 500 mL

Disolver el acetato de sodio en 370 mL de agua DEPC. Adicionar al MOPS y disolver. Agregar el EDTA. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 2 N. Aforar a 500 mL con agua DEPC. Almacenar a temperatura ambiente. Para prepara MOPS 5X agregar 50 mL de MOPS 10X en 50 mL de agua desionizada.

- Buffer de carga para RNA 5X

Componente	Volumen (10 mL)
Formamida	3084 μ L
Formaldehido	720 μ L
MOPS 10X	4 mL
EDTA (0.5 M)	80 μ L
Azul de bromofenol	16 μ L
Bromuro de etidio	10 mg
Glicerol	2 mL
Agua DEPC	Aforar a 10 mL

Agregar en un tubo cónico con tapa cada uno de los componentes y mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas. Almacenar a 4 °C.

APÉNDICE B: Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Ta (°C)
mir166a-3p	TCG GAC CAG GCT TCA TTC CCC	61.7
mir168a-5p	TCG CTT GGT GCA GAT CGG GAC	62.1
mir396d	TCC ACA GGC TTT CTT GAA CTG	55.2
mir444b.2	TGC AGT TGT TGT CTC AAG CTT	55.1
mir444f	TGC AGT TGT TGC CTC AAG CTT	57.9
mir528-5p	TGG AAG GGG CAT GCA GAG GAG	61.8
ILLUM ADAPTER	GUU CAG AGU UCU ACA GUC	52.5
ILLUMINA PCR 5' PRIMER	AATGATACGGCGACCACCGACAGGTTTCAG AGTTCTACAGTCCGA	68
SBS3	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA TTG AT	62.1

Ta: temperatura de alineamiento

APENDICE C: índice y abundancia de microRNAs

Identificación	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
ata-miR169	TAGCCAAGGATGAATTGCCAG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ata-miR172	TGAGAATCTTGATGATGCTGCAT	0.05	0.06	0.00	0.00	0.18	0.44	2.94	3.22
bdi-miR1122	TAGATACATCCGTATTTGGA	1.96	1.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR1127	AACTACTCCCTCCGTCCGATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR1135	TTTCGACAAGTAATTCCGACCGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR1139	GAGTAACATACACTAGTAACA	0.22	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR159	CTTGGATTGAAGGGAGCTCT	147.39	300.27	26.80	33.60	13.37	66.44	11.10	17.33
bdi-miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCGG	0.16	0.06	0.10	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00
bdi-miR164f	TGGAGAAGAAGGGCACATGCA	1.58	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
bdi-miR166e	CTCGGACCAGGCTTCATTCCC	73.75	100.74	6.39	7.54	17.37	17.93	15.60	16.19
bdi-miR166f	TCTCGGACCAGGCTTCATTCC	65.27	89.85	5.82	7.28	11.17	9.31	11.81	13.11
bdi-miR166g	TGTGGTGATCTCGGACCAGGC	35.54	58.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR167c, bdi-miR167d	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	27896.41	30766.43	2467.63	3416.00	36921.23	51919.37	3340.82	8093.32
bdi-miR169i	CCAGCCAAGAATGGCTTGCCCTA	3.97	6.88	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
bdi-miR169j	TAGCCAGGAATGGCTTGCCCTA	0.05	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR169k	TAGCCAAGGATGATTTGCCTGT	115.92	111.51	5.82	8.69	11.21	2.28	0.00	0.00
bdi-miR172d	AGAATCCTGATGATGCTGCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR1878	ATTTGTAGTGTTTCAGATTGAGTTT	72.39	45.50	44.63	31.94	0.69	0.13	0.00	0.00
bdi-miR319a	TGAGGGAGCTTTCTTCTGTCC	0.33	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR319b	TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT	3107.23	4060.74	169.26	187.30	41.55	113.32	22.13	14.61
bdi-miR395a, bdi-miR395b, bdi-miR395c	TGAAGTGTTTGGGGAACTC	101.47	208.53	2.67	3.58	17.92	158.97	22.84	13.97
bdi-miR395d	AAGTGTTTGGGGAACTCTAGG	50.05	74.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR398b	CAGGAGTGCTCACTGAGAACACA	0.38	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR399a	TGCCAAAGGAGAATTACCCTG	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR408	CAGGGATGGAGCAGAGCATGG	16.79	31.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR437	GAACCTAGAGAAGTTTGACTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5054	TCCCCACGGTCCGGCGCCA	3.10	5.21	9.25	13.67	4.37	6.24	1.50	1.43
bdi-miR5055	TCTCGCTGCTGAGCTCGGCGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5056	AGGAAGAACCGGTAATAAGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
bdi-miR5057	AAATTTCAAATCATTTTGACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5058	AACAGTTGAGGGATGAAAAACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5059	CGGCCTGGGCAGCACCACCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5060	CGGCTAGCTAGAGACCGCCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5061	TCTGTTCTGCTCTGCTCGGTA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5062a	TGAACCTTGGGGAAAAGCCGCCT	0.22	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR5063	TCCACTGGAAAAGGCTTTTGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5064	CGAATTTGTCCATAGCATCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5065	TAGGCAATTCACCTTATACT	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5066	AAGTGTATAAGTGGAGTGCCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5067	TCAGCGACAATAATATGGAT	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5068	ATCGGGTAGAGCGGGTATGGGTAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5069	TAGGTTATTGATTTGACCAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5070	AACTAAGTAGGGTCAGAGGGT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5163	TTAGGTATTTTAGGTTAGGTG	2085.92	2113.86	0.00	0.00	0.05	0.13	0.00	0.00
bdi-miR5164	CGCAACTTTGTCTAGATACGC	1.03	2.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5165	ATCTTGGGCTCTAGGTAGGTT	1.79	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5166	TGCCACCAGGGTTTCGATCCA	0.98	4.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5167	CCACTTTGGGTGTCATTGGTA	0.82	2.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5169	TTTGACCAAGTTGTAGAACA	4.46	7.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5170	TCATCAAGTTGAGTGACCGTA	0.22	2.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5171	ACTTAATATGGGACGGAAGAA	0.33	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5172	TGATCTACTAGCTCCTCGGCA	3.32	4.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5173	TCTCGTATATGCGGATGTACC	1.20	2.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5174	CTCCGTTCCATAAAGATTGGC	7.12	11.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5175a	AAGAATTTAGGAACGAGGGGA	22.83	19.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5175b	CCTCTGTTCTAAATTCCTGT	0.05	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5176-3p	TGTGATGATGTGGCATAGAAT	51.63	74.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5176-5p	TATGCCATGTCGTCACATATC	2.34	3.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5177	TGAGGTTGAAAACAGACAGT	9.78	19.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5178	TCTGACCGGTGGGCCTGAGCG	1.09	2.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5180a, bdi-miR5180b	TAAGTGTCTCAGTTTTGAAC	0.33	1.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5181a	TGATCCATAATAAGTGTGAGG	43.53	66.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5181b	TCCGATCCATAATAAGTGTGCG	1.79	1.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5182	TGATGATCTTGGAAACAGTGC	7.28	9.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5183	TATTTGGACAAATTTGAGTCA	3.91	1.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5184	TTCTAACATTATGCACATCTA	0.82	1.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5185a, bdi-miR5185b	TTCTAGTTCATTTTTCAAATC	2.39	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5198	GGGAAAAGAGATTGAGGGAG	0.27	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5199	TGTTCATACGGTTGATAGCAC	0.87	1.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5200	TGTAGATACTCTCTAAGGCTT	0.38	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5201	AGGGCGAGGCAAATGATCAAA	5.65	10.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR5202	TTACGTGAGTTAAATCGTCGA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR5203	ACTTATTATGGACCGGAGGGA	0.87	1.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7707-3p	TTTGATCGATGTATGGCTGAACGG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7707-5p	GTTTCAGCCATACATCGATCGAAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7708a-3p	TGTAATGGTACTGAACAAAGACGC	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7708a-5p	GTTTTTCCTCAGTACCGTTACAAT	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7708b-3p	AAATGGCCCGAGAATTGTAATGGT	0.49	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7708b-5p	CATTACAATTCTTGGGACATTTGC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7709-3p	TGTGCCTAGTCGTAATTTGAT	1.85	3.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7709-5p	TAAAGTATGACTAGGCACACG	1.36	2.87	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7710-3p	ATTGATGTCACAACTATAGTAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7710-5p	TACTACAGATCGTGATGTCAACTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-3p.1	AGATTGTTAAAGAGGCCAAGTATT	12.50	8.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-3p.3	TATGAGTCGATTTCTCTTATGGCT	67.66	44.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-3p.4	TATCCTAGCCATAAAAATTCAGTAT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-5p.1	TACTTAGCCTCTTTGACAATCTTG	6.52	4.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-5p.2	ATGATAGAATTTCTAAATTAGAAG	1.90	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-5p.3	CCATAAGTGAAATCAACTCATTCT	1.47	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7711-5p.4	TCTGAATTTTATGACCAAGATAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7712-3p	TTATTGTGGTAACTTTAAGATGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7712-5p	TAGAGCTCTGAAGTTACCACCCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7713-3p	TTGAGACTGGCAGCATTAGCAAGC	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7713-5p	TAGGAATTGATGGAACAGCTCACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7714-3p	CTAATATGTATCGAAGGGAGTAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7714-5p	TATTTTCTCGGATCAATTAATTCTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7715-3p	TAAGAAAACCCACCTTTGATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7715-5p	TCAAAGATGGGATTTCTGAAC	0.49	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7716-3p	TTCGTTCTTCTCCAGTAATTGACC	0.16	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7716-5p	TCAGTTGCTAGAGAAGAACGAAAC	2.23	1.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717a-3p	GATGGATACGATTGTGCGACTGAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717a-5p	TCATTGAGATTCGTGTAATTA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717b-3p	AACTATTTTTAAGTTGACCGAGAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717b-5p	TCTAAGACGACTGAGAAATAACTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717c-3p	TTAGTTGACTGAGAAATAGACGGT	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7717c-5p	TTGCTATTTCTTGGGCGACTGAGA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7718-3p	ATCGCCTTAGACGAATAAATGAGG	56.25	49.17	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7718-5p	TCATTTATTCGTCCATGGCGATGG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7719-3p	TAGAAGCATATATGGCGAAGA	3.32	3.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR7719-5p	TCCGCCATACATGTTTCTATC	4.13	5.73	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7720-3p	TTTTACACATGATTTGGGTTGGAC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7720-5p	TCGAAATTGATCGTGCGGAGAAGC	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7721-3p	AAAGTTTGGCATAGAATTC AATGC	0.05	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7721-5p	ACGGGATTTTATAACGGACTTTGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7722-3p	GAAGGGTATCGGGATGAGAGG	2.83	3.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7722-5p	TCTCCTCCCGGTACCCTTCTT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7723a-3p	GAGGGCCAAGGTAGTTGTTTCACA	1.03	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7723a-5p	TGAAACAAC TATCTTGGCCTTCTC	5.65	4.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7723b-3p	ATGAAGGTAGTAGTTTCAA AATGG	8.70	6.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7723b-5p	ATTTTGATACTACTACCTTCATCA	0.27	0.80	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7724a-3p, bdi-miR7724b-3p	TTGGCCACATTGACATGTT CACC	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7724a-5p, bdi-miR7724b-5p	TGAACATGTACATGCTGGCCAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725a-3p	TGCAACAATGTGATTT CGTCAAG	0.49	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725a-5p	TGACGAGATCACATCGTTTGCACA	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725b-3p.1	TGAAAACCATATTCCTAGCTC	0.05	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725b-3p.2	CAAATAAGAGGAGACGAGACATAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725b-5p.1	ACTAGGGAGATGGTTTTCGCT	0.33	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7725b-5p.2	ATGCTCCACCTCATATTTGAC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7726a-3p	TGCGAATCTGTCACCGTTGTCCCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7726a-5p	TGATGATGGTACGGACGTCGCGGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7726b-3p	TGCGATACGTCACCTCACCGAAAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7726b-5p	TTTGATGACATGACGTACGGCGGC	0.27	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7727-3p	CCAAGTCGATTGGA ACTAATGAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7727-5p	TGATTAGTTTCAGTTGGTCTGGGC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7728-3p	AAATACACTCAATTC AAGCAG	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7728-5p	TGCTCGGATTGAGTGTATTTT	4.73	9.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7729a-3p, bdi-miR7729b-3p	AGCAATGGTGGTGGTTTGGAGGAG	0.38	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7729a-5p, bdi-miR7729b-5p	TGTTTTCATAGGCCATGTAGAGC	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7730-3p	AACTTTCTCCCGCAGCTGTTCTGT	2.07	3.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7730-5p	AGAACAGCCACGGTTGAAAGTTAT	4.02	4.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7731-3p	AGGTTTGCTCTGGACTTTGGAATC	97.01	51.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7731-5p	TTCCAAATTCCTGAGCAAACATAT	13.86	14.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7732-3p	GATCGAGATCGTGGAGGAACC	4.62	3.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7732-5p	TTCTCCAAGATCTCGGAGACTC	0.49	1.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7733-3p	CCTGCGTTGGCGAAGGCGAGAAGC	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7733-5p	TTCTCGCCATTGCCAAACCAGGGC	0.11	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR7734-3p	TTAACCTAGTCACATTCAACG	0.33	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7734-5p	TTGAACGTGACTGGGTTAACG	4.35	7.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7735-3p	CCGGTCGGAGCCAAGAGACGCGGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7735-5p	TTGTTTTCTTCTGCACTCCCGGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7736-3p	TGACATATCTGATGGTAAAGG	0.60	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7736-5p	TTACTATCTGGGATGTCACA	0.22	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7737-3p	ACTTGAGACGGACTGTATTAATAA	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7737-5p	TTTCGGTCAATGTATTTCAAGCAG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7738-3p	GTGCTTGACAGACGACTCTGG	79.95	69.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7738-5p	AGAGTCGTTTGCAAGCTCGG	9.51	7.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7739-3p	TTGAGTCTGAGAAGTATTTCTG	0.22	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7739-5p	AGATGCGTCGAAGCGGACTGGATC	0.33	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7740-3p	GAGACAGAGGTTGTTCCGGATG	0.38	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7740-5p	TTTGAACAACCTCGGTCTCAT	0.16	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7741-3p.1	AGATCTTCCATGAGTAAAAAT	0.05	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7741-3p.2	TGCATGTGGAACCTCCAGATC	10.49	20.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7741-5p.1	TTTTAATTGTGGAAGCTCTTG	818.15	609.76	0.00	0.00	0.09	0.04	0.00	0.00
bdi-miR7741-5p.2	TCTTGAAGTTTCGCATGCAGT	6.85	17.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7742-3p	TGTGTGTTTCGAGTGAATGAGT	3.64	6.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7742-5p	TCATTGCTCATTACACACAGT	0.71	2.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7743-3p	TTTGAACTTTTGTATTGGATCTTT	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7743-5p	AGCATCTACTGATAGTTTGACTGC	0.16	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7744-3p	CATCGACAACCTTTGCCATCCTTA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7744-5p	AGGATGGCAAGATTTATCGATGGG	8.04	5.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7745-3p	TTGTTGTTACTTAAGTCTTGGTAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7745-5p	AGTAAGGCTTTAGTAACAAGAGAT	0.33	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7746-3p	TTCTATTGGAACCTTAATCTATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7746-5p	ATAGACTAAGAGTTCCAACAGAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7747-3p	ATCCTATAACAAAACAAACTGATC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7747-5p	ATCAGATTGTTTTGTTGTAGGATG	0.33	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7748a-3p	AATATGTTTTCTATTGTTGGACGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7748a-5p	ATCCAACAACAAGGGACGTGTTAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7748b-3p	TTGGTCAAAGAAAATCTAATACGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7748b-5p	ATGTTAGGATTTCGGTTGACCAAGC	0.43	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7749-3p	TGGAATGGGCGCTCTCAGGGAAGC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7749-5p	ATCGTCGAGGGCGGAGATTGCGGC	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7750-3p	CATGGTCGGCAATGATACAGACGA	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR7750-5p	ATCTGAATCATTGCCGACCATGCA	0.16	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7751-3p	TTTGGTGCACCCGGCTGGAGATGG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7751-5p	ATCTTCCTCGTGACAAGCGGTAG	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7752-3p	AAAATGATAGTTTGAAGAACACGC	0.38	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7752-5p	ATGCTCTTCCCACTGTCATTTTCC	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7753-3p	TGAGCAAGGGAGAAGACATGG	1.20	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7753-5p	ATGTCTTCTTCTTGCTCATC	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7754-3p	TTCTCTCGGCTAAGGAACTGC	39.95	50.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7754-5p	ATGTTCTCTCGGCTGAGGAAC	0.00	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7755-3p	TCAATTTACGGTGTAGAATTG	0.49	1.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7755-5p	ATTCCACACTGTAAATTGAAT	0.27	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7756-3p	TGGAGATGTTGGCATTGAATTGGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7756-5p	CAATGCAATGCCAAGTCTTTCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7757-3p.1	GGTAGTTGAATGTTTTGTTTA	159.62	73.35	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7757-3p.2	AGATAACTTGATATGTAAGTG	26.58	20.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7757-5p.1	CACAAAACCTCAGCTACCCA	340.60	765.46	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
bdi-miR7757-5p.2	CTTCCATATCAAATCATCTCT	42.34	48.94	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7758-3p	TAGCGGTCAACTAAGTGTAGTGGC	0.49	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7758-5p	CACTACCGTTAGTTGACCGTTAAG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7759-3p	GGCTTATGCCGACGTGGCTAC	1.90	1.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7759-5p	CAGCCACGTCGGCATAAGCGAG	0.87	1.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7760-3p	GGCTTTGCTCGGAGTGCTGTGGC	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7760-5p	CAGCGGACAGAATGGAGCAAGCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7761-3p	TCTTGATCAAGAGACGGCTCTGGC	0.11	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7761-5p	CAGTGCCGTCTCTTCCCAAGTTC	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7762-3p	CTCGGAATTTGGTCATCAACTGGC	0.43	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7762-5p	CAGTTGATGACCAAGTTCTCGAGA	1.52	1.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7763-3p	ATTCCCGTACGTCAAGATTGC	8.10	5.84	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7763-5p	AATCTTGATGTGCGGGGATAG	18.48	14.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7764-3p	AAATAGATCTTGGCGTTATGGG	0.43	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7764-5p	CATAACCTAGATCTGTATCA	0.16	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7765-3p	TTACAAGAAGTTGGACTAAAATGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7765-5p	CATTTTAGTCCAACAAGTTGCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7766-3p	CGAGGCTGACTGGGACTAAGCGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7766-5p	CCAAGTGGGCCAGTCGGCTGGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7767-3p	AGGAGCAAGCAGCTTGAAGGT	0.98	0.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7767-5p	CCCCAAGCTGAGAGCTCTCCC	0.33	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR7768a-3p, bdi-miR7768b-3p	CGGCGCCGTCCTCGACCGGGAG	0.65	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7768a-5p, bdi-miR7768b-5p	CCCGGTCGAGGACGGCCCCGC	1.79	2.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7769-3p	TGTCATGTTGGCACTGATGGG	1.09	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7769-5p	CCGTCAGTGCCAACATGCCAG	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7770-3p	TCTAGACGGGCCTTCAAAGAG	1.74	1.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7770-5p	CCTTGAAAGCCTGTCTAGACA	0.38	0.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7771-3p	ATGTGTACTATAGAAGTCAAGGT	4.67	2.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7771-5p	CCTTGACTCCTATAGTACACATTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7772-3p	AGATCTCCATGAACTGAGAAACGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7772-5p	CGCTTTTCGGTCCGTGGAGACGCA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7773-3p	TTTTTCCTTCGGCTGACACGT	85.16	114.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7773-5p	CGGGTCAACGAAGGAAAAATT	27.28	18.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7774-3p	GAGCGAACGTTAAATTCCGTGGGG	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7774-5p	ACTATGGTCTGTGAGGATGGCAAC	0.16	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7775-3p	CTAGTGCTTAGACAAAACCCGGTT	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7775-5p	ACCGGTTTATTCTGAAGCACCAGT	0.43	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7776-3p.1	AAAGATATCAGAGGGCAACG	0.54	0.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7776-3p.2	TTGATAATGGGTTGAATGCGC	26.09	26.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7776-5p.1	CTTGCCCTCTGATATCTTGG	0.49	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7776-5p.2	ACATTCAACTCATTATTAATG	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7777-3p.1	TTGTTCCACCCAACAGAAGAT	0.33	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7777-3p.2	TGAGATGGTGTCTGTTGAAGG	0.38	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7777-5p.1	CTTTGGTTGGGTAGAACTACC	0.76	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7777-5p.2	TCTGACAAACACCATCGCAAC	2.61	4.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7778-3p	CTGCGCCGCGACTTTCGGACGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7778-5p	GAGCATCGTGTCCGGCTGCGCGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7779-3p	TTCTCGATCTGTAGACCGATCTAG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7779-5p	GAGGTCATTGTCAGACATGGGAAG	3.21	1.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7780-3p	GTAGGGACCTTGCTGAAGACGTTT	0.87	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7780-5p	GATAATTTAGTGGCCTTCTACTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7781-3p	CATGTCTGTAGTCAGAAAAATCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7781-5p	GATTTTTCTGACGACGGACATGGC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7782-3p	ACCTGCTCTGATACCATGTTGTGA	1500.54	1505.47	0.00	0.00	0.09	0.04	0.00	0.00
bdi-miR7782-5p	GCGGCATGGTATTAGAGCAAGTTG	38.53	22.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7783-3p	AGCTCTGATACCATGTGGATGAGA	49.57	44.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7783-5p	GCGTCTACTTGGTATCCAAGCTTA	0.60	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7784a-3p, bdi-miR7784b-3p	CATAGACTTATGAGACGAGTACAT	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
bdi-miR7784a-5p, bdi-miR7784b-5p	GTACATGAACTTATAAGACGAGTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7785-3p	TTTCTTCTGTGAGCCTGACTGAGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7785-5p	GTAGAATGGGTGATGGGAGAAGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7786-3p	TGCACAAACTGTGGAGTAGTCGGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7786-5p	GTCTATGTCTATGTCTGTGCACGC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7787-3p	TGCTTCGGTCTGTGCTTGGGCACG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
bdi-miR7787-5p	GTGCTCGTCCACAAGAGAAGCAGG	0.11	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
far-miR1119	TGGCACGGCGTGATGCTTAGTCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
far-miR1134	CGACAACAACAAGAAGAAGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
far-miR156b	TTGACAGAAGAGAGAGACAC	39.29	74.27	0.57	1.28	0.46	1.14	0.39	1.93
far-miR164a, far-miR164b	TGGAGAAGCAGGGCACTTGCT	0.00	0.00	0.10	0.13	0.05	0.22	0.00	0.72
far-miR166	CCGGACCAGGCTTCATCCCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
far-miR437	AAACATAGAGAAGTTTGACTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
far-miR529	AGAAGAGAGAGACACAGCTT	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR1120	ACATTCTTATATTATGGGACGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR1130	TCTGTAACCTTAATATAAGACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR156, tae-miR156, ssp-miR156	TGACAGAAGAGAGTGAGCACA	35.65	98.33	6.29	7.54	24.36	18.89	12.14	32.30
hvu-miR169	AAGCCAAGGATGAGTTGCCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR171-5p	TGTTGGCTCGACTCACTCAGA	59.08	28.14	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
hvu-miR397	CCGTTGAGTGCAGCGTTGATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR399	TGCCAAAGGAGATTTGCCCCG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR444b	TGCAGTTGCTGTCTCAAGCTT	10.60	6.59	0.48	0.38	2.02	7.29	0.52	0.93
hvu-miR5048a, hvu-miR5048b	TATTTGCAGGTTTTAGGTCTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049a	TCCTAAATACTTGTTGTTGGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049b	AGTATTTAGGTACAGAGGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049c	AGACAATTATTTGGGACGGAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049d	TACAATTATTTAGGAACGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049e	AATTATTTAGGTACAGAGGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5049f	AATTAATATGGATCGGAGGGA	3.70	2.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5050	TTGAGGTCGTTCAACCAGCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5051	TTTGGCACCTTGAACTGGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5052	ACCGGCTGGACGGTAGGCATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR5053	CGCAGCTGTAGTCGCCGGCGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6176	GAAGCTGTAGTGCAGCCGGCGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6177	TACCATGGACAGAAGGCACTTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6178	CACGGAAGTGGCGGTTGCACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6179	AACCAGTCGAGGCCAGGGGGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
hvu-miR6180	AGGGTGGAAAGAAAGAGGGCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6181	TGCTCTTCATGGACTGCGGCGCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6182	TGAGTGTGTGATGGATGGCTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6183	TGAGCGAGTTGGCTGCAAGTTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6184	CGGCGTCGGATCTGGCCGCCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6185	TCTGGCAGCGACGGGAACATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6186	CGAGGAAGGCGCTGAGAGAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6187	TGAACAGGTTTCGGCGACCTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6188	GGTGGATCGATGAACCCGGCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6189	AGGTGATGCTGTGGTGATCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6190	CGAGGAAAGGAAGAAGCCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6191	TAGATTTGTCTAGATATGAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6192	TAGGAGAGGGGGGAAGGGATCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6193	CTCTGCCACCGGTCCATGACGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6194	TATGGGGATCTGACAGACGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6195	TGAGTACGTAGTAGGGATGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6196	AGGACGAGGAGATGGAGAGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6197	TCTGTTCTAAATGTAAGACG	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6198	GCTCTGTCTTGGATGGTCATTTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6199	CCACAGAATTCTCACAGTGATGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6200	TTTGGCCAACTAGATCTATGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6201	TGACCCTGAGGCACTCATACCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6202	TGAAGATTTTAAGCATTGAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6203	AGACGATTAAGAAGACCTGCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6204	AGGAGAATAATTAGAGCTGTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6205	AGGATGTTTGGATACGTTTTAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6206	GGCACACGGGCTGCAGGCATAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6207	TGGACGACCTGGGCGCCGACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6208	GTGCATCAAGATCGGCTCATCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6209	TGAGATCAGAAAGATGTGCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6210	ACTCCTTGTTATCAACTTCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6211	CAGATCAAGACGCTCCGGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6212	ATACAGTTTACAATGCACGAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6213	ACAGATTGCTACAGACTGGTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
hvu-miR6214	CGACGACGACGAGCAGACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1317-3p	GAAATGATCTTGGACGTAATCTAG	0.00	0.00	26.32	21.85	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR1317-5p	TAGGGAACCCCATTCCTATAAA	0.00	0.00	2.10	3.07	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR1318-3p	CAGGTGTCATCTCCCCTGAAC	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1318-5p	TCAGGAGAGATGACACCGAC	197.61	203.20	23.74	23.64	259.52	81.02	34.46	14.47
osa-miR1319a	AACCGGCATCTGTAATATATTATA	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1319b	CCTTTAATATATTATAGGTGTCGG	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1320-3p	TGTA AAAATTCATTCGTTCCAA	0.00	0.00	0.48	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1320-5p	TGGAACGGAGGAATTTTATAG	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1423a-3p	AGCGCCAAGCGGTAGTTGTC	0.00	0.00	14.40	11.88	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1423a-5p	AGGCAACTACACGTTGGGCGCTCG	0.00	0.00	1.91	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1423b	CAACTACACGTTGGGCGCTCGA	0.00	0.00	6.01	3.96	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1424	ATGCACACTGATGCTGATTGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1425-3p	CAGCAAGAACTGGATCTTAAT	0.00	0.00	3.91	3.07	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1425-5p	TAGGATTCAATCCTTGCTGCT	0.00	0.11	127.01	203.65	0.05	0.04	0.00	0.07
osa-miR1426	AGAATCTTGATGATGATTA AA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1427	TGCGGAACCGTGCGGTGGCGC	0.00	0.00	5.34	5.62	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1428a-3p	TAAGATAAAGCCGTGAATTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1428a-5p	CGTTTTGCAAATTCGAGGCC	0.00	0.00	0.29	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1428b, osa-miR1428c, osa-miR1428d	TAAGATAATGCCATGAATTCG	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1428e-3p	TAAGATAATGCCATGAATTTG	0.00	0.00	33.37	5.11	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1428e-5p, osa-miR1428f-5p, osa-miR1428g-5p	AATTCACAGGCCCTATCTTG TG	0.00	0.00	49.59	8.56	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR1429-3p	GTTGCACGGGTTTGTATGTTG	0.00	0.00	8.01	6.52	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1429-5p	GTAATATACTAATCCGTGCAT	0.00	0.00	30.23	29.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1430	TGGTGAGCCTCCTGGCTAAG	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1431	TTTGCGAGTTGGCCCGCTTGC	0.00	0.00	1.53	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1432	ATCAGGAGAGATGACACCGAC	0.05	0.29	21.36	22.10	0.14	0.00	0.00	0.00
osa-miR1433	TGGCAAGTCTCCTCGGCTACC	0.00	0.00	0.76	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1435	TTTCTTAAGTCAAACTTTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1436, hvu-miR1436	ACATTATGGGACGGAGGGAGT	0.00	0.00	0.57	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1437	TCCGGCGCCGCACTAGGGCACTG	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1438	AGGGTAATTTTATCATTTTTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1439	TTTTGGAACGGAGTGAGTATT	0.05	0.06	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1440a	TGCTCAAATACCACTCTCCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1440b	TTTAGGAGAGTGGTATTTGAG	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1441	ACCGGATGTCGGAAAAGGTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1442	ATTCATAGTACTAGATGTGT	0.00	0.00	1.33	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR156a, osa-miR156b-5p, osa-miR156c-5p	TGACAGAAGAGAGCGAGCAC	225.87	342.62	1.43	2.56	386.09	548.79	74.08	135.64
osa-miR156b-3p	GCTCACTCTCTATCTGTCAGC	0.00	0.06	8.96	3.07	65.44	53.56	0.00	0.00
osa-miR156c-3p, osa-miR156g-3p	GCTCACTTCTCTCTGTCAGC	78.86	75.01	49.87	26.83	73.21	38.14	65.40	62.02

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR156f-3p, osa-miR156l-3p, zma-miR156f-3p	GCTCACTTCTCTTTCTGTCAAGC	131.52	141.31	68.75	137.47	4094.54	1845.12	6549.86	9497.60
osa-miR156h-3p, osa-miR156j-3p	GCTCGCTCCTCTTTCTGTCAAGC	1.74	1.95	22.98	26.45	0.92	0.35	1.24	1.79
osa-miR156k, zma-miR156j-5p, sbi-miR156k	TGACAGAAGAGAGAGAGCACACA	2.28	3.32	0.00	0.51	0.14	0.22	0.20	0.36
osa-miR156l-5p	CGACAGAAGAGAGTGTGAGCATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR159a.1, osa-miR159b, zma-miR159a.1	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTG	49760.76	84101.31	3851.91	5197.90	9613.45	52733.73	12297.02	17275.37
osa-miR159a.2	TTGCATGCCCCAGGAGCTGCA	0.00	0.00	0.48	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR159c	ATTGGATTGAAGGGAGCTCCA	0.11	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR159d	ATTGGATTGAAGGGAGCTCCG	1.36	1.72	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.14
osa-miR159e	ATTGGATTGAAGGGAGCTCCT	0.27	0.23	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR159f	CTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	0.43	0.23	0.10	0.13	0.00	0.00	0.07	0.21
osa-miR160a-3p, osa-miR160b-3p, zma-miR160a-3p	GCGTGCAAGGAGCCAAGCATG	1.58	1.09	2.86	1.02	3.68	3.52	5.68	4.58
osa-miR160a-5p, osa-miR160b-5p, osa-miR160a-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	121.41	515.33	32.04	41.52	355.58	344.00	151.68	160.28
osa-miR160c-3p	GCGTGACGGAGCCAAGCATA	2.45	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR160d-3p	GCGTGCGAGGAGCCAAGCATG	15.22	1.03	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
osa-miR160e-3p	GCGTGCGAGGTGCCAAGCATG	0.00	0.00	0.10	0.00	3.08	5.05	0.00	0.64
osa-miR160e-5p, zma-miR160f-5p	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCG	0.05	0.17	28.89	43.18	0.18	0.13	0.20	0.29
osa-miR160f-3p	GCATTGAGGGAGTCATGCAGG	73.15	65.55	0.38	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR160f-5p, sbi-miR160f, bdi-miR160f	TGCCTGGCTCCCTGAATGCCA	1087.83	2632.97	23.08	62.99	22.89	43.85	0.07	0.50
osa-miR162a, sbi-miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	0.16	0.40	67.89	95.44	4.73	6.28	111.15	148.25
osa-miR162b	TCGATAAGCCTCTGCATCCAG	0.00	0.00	20.02	27.85	0.05	0.00	0.20	0.36
osa-miR164a, osa-miR164b, osa-miR164c	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCA	1295.76	2707.12	86.77	148.84	426.81	783.47	882.72	1223.30
osa-miR164c	TGGAGAAGCAGGGTACGTGCA	3.59	8.14	2.48	5.37	0.87	1.36	0.00	2.65
osa-miR164d, zma-miR164f-5p, sbi-miR164d	TGGAGAAGCAGGGCACGTGCT	37.39	66.53	18.21	29.51	201.99	554.46	11.16	11.60
osa-miR164e	TGGAGAAGCAGGGCACGTGAG	0.00	0.00	6.87	1.53	0.00	0.00	0.33	0.50
osa-miR166a-3p, osa-miR166b-3p, osa-miR166a-3p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	23138.70	23301.53	640.60	646.74	7027.57	7180.41	2323.65	2517.15
osa-miR166a-5p, osa-miR166e-5p, zma-miR166a-5p	GGAATGTTGTCTGGTTCAAGG	160.00	20.51	11.54	2.81	111.45	149.39	71.99	17.19
osa-miR166b-5p, zma-miR166a-5p	GGAATGTTGTCTGGCTCGGGG	28.15	25.84	9.92	3.19	11.90	35.15	10.96	11.67
osa-miR166c-5p	GGAATGTTGTCTGGTCCGAG	0.00	0.00	17.74	2.81	0.00	0.00	0.07	0.00
osa-miR166d-5p, zma-miR166c-5p	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG	14.13	84.18	4.39	2.68	12.13	87.09	38.96	45.98
osa-miR166e-3p	TCGAACCAGGCTTCATTCCCC	13.70	10.77	4.00	4.73	4.92	3.69	2.22	3.72
osa-miR166g-3p, osa-miR166h-3p, zma-miR166g-3p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	223.75	213.86	192.14	215.41	488.99	349.09	313.60	263.41
osa-miR166g-5p	AATGGAGGCTGATCCAAGATC	1.09	0.34	0.00	0.13	0.51	2.11	0.00	0.00
osa-miR166h-5p, zma-miR166m-5p	GGAATGTTGGCTGGCTCGAGG	0.11	0.80	8.11	0.77	1.15	1.49	1.89	0.36
osa-miR166i-3p, osa-miR166j-3p	TCGGATCAGGCTTCATTCCCTC	0.98	0.63	0.48	0.51	0.83	0.70	0.72	1.00
osa-miR166i-5p, osa-miR166j-5p	AATGCAGTTTGTATCCAAGATC	0.00	0.00	0.38	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR166k-3p, osa-miR166l-3p, zma-miR166k-3p	TCGGACCAGGCTTCATCCCT	531.79	640.82	141.03	151.53	136.08	129.84	228.82	183.84
osa-miR166k-5p	GGTTTGTCTGGCTCGAGG	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR166l-5p	GGATTGTTGTCTGGTTCAAGG	0.00	0.06	4.00	0.51	0.05	0.00	0.00	0.07
osa-miR166m	TCGGACCAGGCTTCATCCCT	211.03	244.40	13.25	12.90	94.63	151.46	34.59	37.24
osa-miR166n-5p	GAATGACGTCGGGTCTGAAGA	0.00	0.00	1.81	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR167a-3p	ATCATGCATGACAGCCTCATTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR167a-5p, osa-miR167b, osa-	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA	2986.79	3368.12	600.55	1256.29	1458.94	837.38	1968.41	2135.64
osa-miR167c-3p	GGTCATGCTGCGGCAGCCTCACT	2.77	1.03	0.10	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00
osa-miR167d-3p, zma-miR167e-3p	GATCATGCTGTGCAGTTTCATC	1.36	0.29	0.00	0.13	2.25	0.97	1.31	0.57
osa-miR167d-5p, osa-miR167e-5p, o	TGAAGCTGCCAGCATGATCTG	29797.72	32980.98	2829.31	4058.13	48904.04	75632.54	7736.20	13535.92
osa-miR167e-3p, osa-miR167i-3p	AGATCATGTTGCAGCTTCACT	4.24	3.95	1.72	1.15	78.82	37.26	30.48	48.20
osa-miR167h-3p	AGGTCATGCTGTAGTTTCATC	0.22	0.11	30.42	15.08	125.88	81.59	4.89	1.00
osa-miR168a-3p, hvu-miR168-3p	GATCCCGCCTTGCACCAAGTGAAT	7.12	4.47	13.54	17.38	20.50	29.35	11.42	19.19
osa-miR168a-5p, zma-miR168a-5p, z	TCGCTTGGTGCAGATCGGGAC	15030.05	27819.55	1366.26	2163.54	27953.12	30423.09	4919.33	9015.54
osa-miR168b	AGGCTTGGTGCAGCTCGGGAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR169a, zma-miR169a-5p, zma	CAGCCAAGGATGACTTGCCGA	161.14	277.18	37.76	85.35	384.16	291.23	72.44	28.58
osa-miR169b, osa-miR169c, zma-miR	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	1816.41	2211.68	408.70	838.64	7232.13	5425.50	2628.25	834.85
osa-miR169d	TAGCCAAGGATGAATTGCCGG	1.68	0.69	0.38	1.15	0.09	0.22	0.07	0.07
osa-miR169e, zma-miR169p-5p, bdi-	TAGCCAAGGATGACTTGCCGG	150.00	150.71	10.11	28.36	6.39	4.70	4.89	3.08
osa-miR169f.1, osa-miR169g, zma-m	TAGCCAAGGATGACTTGCCCTA	14.73	32.83	4.00	10.60	197.99	53.61	80.80	34.95
osa-miR169f.2	TGAGGACAAGAGCTGATTCGG	0.00	0.00	1.53	1.92	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR169h, osa-miR169i-5p.1, osa	TAGCCAAGGATGACTTGCCCTG	19.62	33.92	1.81	3.71	71.79	43.10	26.95	12.75
osa-miR169i-3p	TGAGTCGCTTATCACTCATG	0.00	0.00	1.53	3.58	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR169i-5p.2	TGGTGATAAGGGTGTAGCTCTG	0.00	0.00	1.24	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR169n, osa-miR169o, zma-miR	TAGCCAAGAATGACTTGCCCTA	6.74	18.62	2.19	6.26	14.16	6.68	0.00	0.07
osa-miR169p	TAGCCAAGGACAACTTGCCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR169q	TAGCCAAGGAGACTGCCCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR171a, zma-miR171n-3p, sbi-r	TGATTGAGCCGCGCCAATATC	7.99	5.56	0.10	0.00	3.31	4.48	2.35	3.15
osa-miR171b, osa-miR171c-3p, osa-r	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	176.47	122.34	20.31	33.73	222.48	301.46	222.23	227.89
osa-miR171c-5p	GGATATTGGTGCAGTTCAATC	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR171d-5p	TGTTGGCCGGCTCACTCAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.04	0.13	0.07
osa-miR171e-5p, zma-miR171d-5p, z	TGTTGGCTCGGCTCACTCAGA	0.16	0.23	1.62	0.89	32.35	88.98	44.38	19.34
osa-miR171f-5p	TGTTGGCATGTTCAATCAAA	0.00	0.00	10.11	7.28	2.39	14.85	0.00	0.00
osa-miR171g, zma-miR171g-3p, sbi-r	GAGGTGAGCCGAGCCAATATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR171h, zma-miR171h-3p, zma	GTGAGCCGAACCAATATCACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.13	0.36
osa-miR171i-3p, zma-miR171i-3p, zn	GGATTGAGCCGCTCAATATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00
osa-miR171i-5p	AGGTATTGGCGTGCCTCAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.14
osa-miR172a, osa-miR172d-3p, bdi-r	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	267.28	440.83	0.86	2.17	256.86	532.32	127.59	132.21
osa-miR172b, zma-miR172e, bdi-miR	GGAATCTTGATGATGCTGCAT	5.49	9.05	0.95	0.89	0.18	0.09	0.07	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR172c, sbi-miR172e, egu-miR	TGAATCTTGATGATGCTGCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
osa-miR172d-5p	GCAGCACCATCAAGATTCAC	1.03	0.46	0.57	0.00	4.27	0.35	1.57	1.15
osa-miR1846a-3p, osa-miR1846b-3p	TGACCCCGTTCTCCTCGCCGG	0.00	0.00	2.10	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1846a-5p, osa-miR1846b-5p	AGTGAGGAGGCCGGGGCCGCT	0.00	0.00	0.19	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1846c-3p	TGACCCCGGTCTGCTCGCTGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1846d-3p	TATCCGGCGCCGCAGGGAGG	0.00	0.00	0.38	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1846d-5p	TCCCACCGAGCAGCCGGATCTC	0.00	0.00	3.53	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1846e	CAACGAGGAGGCCGGGACCA	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1847.1	TGCAGTTTGCAGTTGTGGCAC	0.00	0.00	0.76	2.17	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1847.2	TGGCCACATGTTAGTGCCACAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1848	CCTCGCCGGCGCGCGCTGCA	0.00	0.00	0.76	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1849	TATCGTATCCTAGGTTGGTTT	0.00	0.00	0.95	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1850.1	TGGAAAGTTGGGAGATTGGGG	0.05	0.00	52.92	7.79	0.00	0.00	0.00	0.07
osa-miR1850.2	TTGTGTGTGAACTAAACGTGG	0.00	0.00	11.06	5.75	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1850.3	CTGTTTAGTTCACATCAATCTT	0.00	0.00	2.29	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1851	CGTCTGGGATGGCATTGTTGGC	0.00	0.00	0.00	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1852	ATATGGATTGAGAATGCAGGT	0.00	0.00	0.48	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1853-3p	TAATTGGGGATGTTTCGGTTGCT	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1853-5p	AGCATTCAAACATTCCAATTACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1854-3p	TCCAATTTGGGGATTTGCTGAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1854-5p	TGGTGAATTTGTAGATTGGA	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1855	AGCACTGGAGTAGCCAAGAGA	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1856	TATGCGTAAGACGGATTCGTA	0.00	0.00	11.16	20.95	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1857-3p	TCATGCTCCAAGAAAACCAGG	0.00	0.00	2.10	4.98	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1857-5p	TGGTTTTTTTGGAGCATGAGG	0.00	0.00	0.95	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1858a, osa-miR1858b	GAGAGGAGGACGGAGTGGGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1859	TTTCCTATGACGTCCATTCCAA	0.00	0.00	5.53	8.05	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1860-3p	ATCTGGAAGCTAGGTTTTCTCT	0.00	0.00	1.72	3.19	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1860-5p	AGAAAACCAGCTCCAGATCT	0.00	0.00	1.43	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861a	TGATCTTGAGGCAGAACTGAG	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861b, osa-miR1861f, osa-m	CGATCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	2.10	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861c	CGATCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861d	TGGTCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	0.57	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861e, osa-miR1861k, osa-m	CGGTCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	3.81	3.96	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861g	CAGTCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861h, osa-miR1861j	CGGTCTTGAGGCAGGAAGTCTGAG	0.00	0.00	39.95	34.75	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1861n	CGATCTTGAGGCAGGAGCTGAG	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR1862a, osa-miR1862b, osa-miR1862c	ACGAGGTTGGTTTATTTTGGGACG	0.00	0.00	6.39	4.09	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1862d	ACTAGGTTTGTATTTTGGGACG	0.00	0.00	79.72	67.71	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR1862e	CTAGATTTGTTTATTTTGGGACGG	0.00	0.00	6.87	7.92	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1862f, osa-miR1862g	ATGAGGTTGGTTTATTTTGG	0.00	0.00	0.10	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1863a	AGCTCTGATACCATGTTAGATTAG	0.00	0.00	22.31	22.49	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1863b	AGCTCTGATACCATGTTAACTGTT	0.00	0.00	0.29	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1863b.2	AGAGACTTGGCTGATGCATTACT	0.00	0.00	2.67	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1863c	TAGAACTTGGCTGATGCATTACT	0.00	0.00	2.57	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1864	TTGTAGTAACGTGATGGTCAATGT	0.00	0.00	1.62	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1865-3p	CGAAGAATCGCAGTCACTAGTTGT	0.00	0.00	0.48	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1865-5p	TGCTAGTGATGGTGATTCTTCGAC	0.00	0.00	1.14	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1866-3p	TGAAATTCCTGTAAATTCCTG	0.00	0.00	53.21	4.47	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1866-5p	GAGGGATTTGCGGGAATTCACG	0.00	0.06	127.21	4.85	0.00	0.04	0.07	0.07
osa-miR1867	TTTTTTTCTAGGACAGAGGGAGT	0.00	0.00	34.61	20.06	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1868	TCACGGAAAACGAGGGAGCAGCCA	0.00	0.00	1.62	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1869	TGAGAACAATAGGCATGGGAGGTA	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1870-3p	TTTAGGGCTAATTCAGCATGAACA	0.00	0.00	3.81	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1870-5p	TGCTGAATTAGACCTAGTGGGCAT	0.00	0.00	2.77	1.66	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1871	ATGGCTCTGATATCATGTTGGTTT	0.00	0.00	109.18	84.32	0.05	0.00	0.00	0.00
osa-miR1872	GAAGTGTAAAGTCTGTGACGGGTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1873	TCAACATGGTATCAGAGCTGGAAG	0.00	0.00	2.19	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1874-3p	TATGGATGGAGGTGTAACCCGATG	0.00	0.00	89.16	9.71	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1874-5p	TAGGGCTACTACCCATCCATAAG	0.00	0.00	6.96	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1875	ACAATGGAGTGAAGTGCAACAGAA	0.00	0.00	0.48	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1876	ATAAGTGGGTTTGTGGGCTGGCCC	0.00	0.00	12.97	9.71	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1877	AGATGACATGTGAATGATGAGGGG	0.00	0.00	51.59	4.22	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1878	ACTTAATCTGGACACTATAAAAAGA	0.00	0.00	6.96	4.98	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1879	GTGTTTGGTTTAGGGATGAGGTGG	0.00	0.00	1.14	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1880	TTCCAAGCGGGCCACTTAAGCATT	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1881	AATGTTATTGTAGCGTGGTGGTGT	0.00	0.00	2.29	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1882a, osa-miR1882b, osa-miR1882c	AGATTGCTTTCAAGGTCATTTCTT	0.00	0.00	44.63	43.57	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR1883a, osa-miR1883b	ACCTGTGACGGGCCGAGAATGGAA	0.00	0.00	1.14	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2055	TTTCCTTGGGAAGGTGGTTTC	0.00	0.00	1.62	2.68	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2090	AACTCTGATTCTAGAATTTTTG	0.00	0.00	6.67	10.35	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2091-3p	CATACATTGCCTCCTAGGCTTG	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2091-5p	TCAACCGAGCCGAGGAGGAGG	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2092-3p	ACCAGCATTCCATTGGCAGAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR2092-5p	CAACTGAAGTCGGTGTTTACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2093-3p	ACATCTTCCAATTAATGCAT	0.00	0.00	0.57	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2093-5p	GTGCATTAATTGGAAGAACA	0.00	0.00	1.91	1.79	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2094-3p	CAGAGCTGTGGCATCCACGTCG	0.00	0.00	0.67	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2094-5p	TGGCTGCTAGGCTCCTGGGTG	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2095-3p	CTTCCATTTATGATAAGTAT	0.00	0.00	4.39	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2095-5p	CTGATAATTTTACGATGAATAG	0.00	0.00	2.10	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2096-3p	CCTGAGGGGAAATCGGCGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2096-5p	TGCCGATTTCCCTCGGGCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2097-3p	TTCTCTTCTCGTGTGCATTT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2097-5p	AGAGATGGGACGGGCAGGAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2098-3p	CGGTTTGTCAAGCGGAGTGC	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2098-5p	TCCCGTGGAGGCAGCCGATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2099-3p	ACAAAGCTGTAGCGTTATTC	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2099-5p	TGAATATGTTTGTACAAGCTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2100-3p	AACCGCTGTTTAGCGGAGTGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2100-5p	TTCTCTCAAGTTGCCAAACAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2101-3p	ATTTAACTCAAGTGAGCATTGT	0.00	0.00	23.08	21.34	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2101-5p	ACATGTTTACAAGTTAAAATGT	0.00	0.00	0.48	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2102-3p	CATGGTGCCGTTCCGGTGGCG	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2102-5p	GGGCAAGCCGCCGCCGCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2103	TTCCCTCTCCGTGCGCGCTCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2104	GCGGCGAGGGGATGCGAGCGTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2105	TTGTGATGTGAATGATTCAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2106	CCGAGGTTTTCTGGATACATT	0.00	0.00	0.86	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118a	TTCTCGATGCCTCCCATTCCTA	0.00	0.00	0.19	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118b, osa-miR2118n, zma-r	TTCCCGATGCCTCCCATTCCTA	0.00	0.00	10.87	17.50	0.00	0.00	0.52	1.07
osa-miR2118c, osa-miR2118q	TTCCCGATGCCTCCTATTCCCTA	0.33	0.00	1.81	3.07	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118d, zma-miR2118d, sbi-m	TTCCTGATGCCTCCCATGCCTA	2.12	2.69	1.14	5.24	2.94	1.45	0.33	0.29
osa-miR2118e, osa-miR2118r	TTCCAATGCCTCCCATGCCTA	0.16	0.06	1.62	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118f, osa-miR2118j, osa-mi	TTCCTGATGCCTCCCATTCCTA	1.14	1.20	2.29	6.52	0.46	0.66	0.00	0.00
osa-miR2118g, zma-miR2118c	TTCCTAATGCCTCCCATTCCTA	0.05	0.00	0.57	2.30	0.00	0.00	0.00	0.07
osa-miR2118h, osa-miR2118k, zma-r	TTCCTGATGCCTCTCATTCCTA	0.43	0.11	0.38	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118i	TTCCTAGTGCCTCCCATTCCTA	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118l	TTCCTAATGCTTCCCATTCCTA	0.00	0.00	2.48	5.88	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118o	CTCCTGATGCCTCCCAAGCCTA	0.00	0.00	6.29	7.92	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2118p	TTCCCGATGCCTCCCATGCCTA	0.05	0.06	0.38	0.51	0.28	0.04	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR2120	AAAGATCTTTAGTCCCGTTGTTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2121a, osa-miR2121b	AAAACGGAGCGGTCCATTAGCGCG	0.00	0.00	172.79	336.40	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2122	TTTCAAAAATAACCTTTTGTTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2275a, osa-miR2275b	TTTGTTTTCTCCAATATCTCA	2.23	8.08	0.95	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2275c	AGAATTGGAGGAAAACAACTGA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2275d	CTTGTTTTCTCCAATATCTCA	0.11	0.06	109.47	304.59	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR2863a	TTGTCCATTCTAGTTTAGCT	0.00	0.00	0.29	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2863b	TTCGTTTATTTGGACTAGAGT	0.00	0.00	0.86	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2863c	TTAGTAGGACTAGAATGGGCCAAA	0.00	0.00	1.24	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2864.1	TTTTGCTGCCCTTGTTCGCA	0.00	0.00	0.57	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2864.2	TTGTTTTGCATTGTATAGGTA	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2865	CTCAGCAGTCGACTGTACCGTG	0.00	0.00	0.38	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2866	TCTAGTTTGTGTTTCAGCATC	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2867-3p	CCAGGACGTGTGGGATGGCA	0.00	0.00	0.57	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2867-5p	TGTGCCATCCACACATCCCGA	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2868	TTGGTTTTGTGTAGTAGAAA	0.00	0.00	0.10	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2869	TCCCGACATTAAATTCTGGGC	0.00	0.00	0.38	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2870	TAATCAGTTTGGGGAGACAAA	0.00	0.00	0.38	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2871a-3p, osa-miR2871b	TATTTTAGTTTCTATGGTCAC	0.00	0.00	6.10	11.12	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2871a-5p	GACCGTAGAACTAGCATAGAAAA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2872	TGGGGTTCTACAAACCGAACT	0.00	0.00	0.10	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2873a	AAGTTTGGACTTAAATTTGGTAAC	0.00	0.00	2.38	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2873b	TTGGACTTGAGATTTGGTATG	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2873c	CAAATGAAGTTGAGTTTGGAC	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2874	ATGTGAACAGTGTCAAACAGTGTC	0.00	0.00	2.86	2.68	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2875	ATTTACAGTCATATACAGTTTATA	0.00	0.00	0.48	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2876-3p	TTCCTATATGAACACTGTTGC	0.00	0.00	1.91	2.68	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2876-5p	AATTGCTGGCAGCACTGTTTA	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2877	TTGCATCTCTGCACTTTGGGCCT	0.00	0.00	1.62	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2878-3p	CAGGATTTTATACATGTAAAGAAT	0.00	0.00	6.01	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2878-5p	TACATGTATAAAATTCTGAGGATG	0.00	0.00	10.78	9.97	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2879	GCCAGATGTGTTAAATAATGACC	0.00	0.00	0.29	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2880	ACGGTATCCCGTTCGGACAGGATG	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2905	TACATGTCAGTGACAAAGGCA	0.00	0.00	0.19	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2907a, osa-miR2907b, osa-n	GGCAGCCGAGCGAGGGCCTCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2918	ATCCGTGTTGTCTGCGCTTTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2919	AAGGGGGGGGGGGAAAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR2920	AAACAACAATATAACATTTCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2921	AAGAACTTAATATAACTTTAAAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2922	AATAAGTGATTACCGAAATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2923	AGACAAAAATATAAATAACAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2924	CTCGCTTGCTCCGCGCCGCCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2925	TGGCGGCCGCGGGCTTCGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2926	AGGTCGTCGACGTTGGTGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2927	TGTCGTCGTCGATGGAGCCCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2928	AAGAAGACGACATTTTGTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2929	CTCAAGGGTGTTGTGAAATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2930	TTCTCTTCTCTCGCGCGTGCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2931	CTTTATTGTTGATGTCAAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR2932	AGTATGCCCACTACCTATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR319a-3p	ACTGGATGACGCGGGAGCTAA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR319a-3p,2-3p, osa-miR319b,	TTGGACTGAAGGGTGCTCCC	3646.68	4679.73	183.85	198.54	45.08	126.68	25.06	17.19
osa-miR319a-5p	AGCTGCCGAATCATCCATTCA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.07	0.07
osa-miR390-3p	CGCTATCTATCCTGAGCTCC	7.55	1.89	8.87	5.49	4.83	0.26	32.70	14.90
osa-miR390-5p, zma-miR390a-5p, zma-	AAGCTCAGGAGGGATAGCGCC	97.88	62.52	12.68	18.40	92.01	94.78	341.86	221.80
osa-miR393a, sbi-miR393a, sbi-miR393b,	TCCAAAGGGATCGCATTGATC	163.80	446.34	18.59	46.76	1101.75	1478.89	113.56	90.24
osa-miR393b-3p	TCAGTGCAATCCCTTTGGAAT	1052.50	1220.45	121.87	246.33	2053.40	1303.97	256.17	206.12
osa-miR393b-5p, zma-miR393a-5p, zma-	TCCAAAGGGATCGCATTGATCT	58.70	181.54	2.57	7.67	983.18	1332.22	78.12	60.16
osa-miR394, zma-miR394a-5p, zma-	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	230.98	285.66	18.40	21.98	257.59	413.16	28.06	18.19
osa-miR395a, sbi-miR395l	GTGAAGTGCTTGGGGAACTC	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395b, osa-miR395d, osa-miR395e,	GTGAAGTGTTGGGGAACTC	1.90	2.69	0.19	0.00	0.18	0.70	0.20	0.21
osa-miR395c, zma-miR395c-3p, zma-	GTGAAGTGTTGGAGGAACTC	0.22	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
osa-miR395f	GTGAATTGTTGGGGAACTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395o	ATGAAGTGTTGGAGGAACTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395t	GTGAAGTGTTGGGGAACTC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395u	GTGAAGCGTTGGGGGAAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395v	GTGAAGTATTTGGCGGAACTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395w	GTGAAGTGTTGGGGATTCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR395x	GTGAAGTGTTGGAGTAGCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR396a-3p, osa-miR396b-3p	GTTCAATAAAGCTGTGGGAA	11.20	11.75	2.29	0.64	0.64	0.40	36.29	53.28
osa-miR396a-5p, osa-miR396b-5p, zma-	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT	2057.83	1331.96	117.38	192.79	231.12	196.98	1331.81	818.45
osa-miR396c-3p, zma-miR396f-3p	GGTCAAGAAAGCTGTGGGAAAG	97.99	8.37	1.62	1.15	5.33	2.02	0.07	12.53
osa-miR396c-5p, zma-miR396e-5p, zma-	TTCCACAGCTTTCTTGAAGT	29726.52	19186.64	393.44	834.80	9866.31	2404.32	973.11	499.46
osa-miR396d, osa-miR396e-5p, bdi-n	TCCACAGGCTTTCTTGAAGT	250009.51	273318.09	5327.93	12399.13	87588.12	39507.18	28056.13	15750.48

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR396e-3p	ATGGTTCAAGAAAGCCCATGGAAA	2.88	0.86	4.77	2.30	9.88	11.12	24.80	16.40
osa-miR396f-3p	ATAGTTCAAGAAAGTCTTGGAAA	0.00	0.00	7.15	5.88	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR396f-5p	TCTCCACAGGCTTTCTTGAAC	90.38	70.20	0.86	5.37	4.23	1.67	4.89	3.22
osa-miR396g, osa-miR396h, osa-miR396i	TCCACAGGCTTTCTTGAACGG	65.11	43.44	10.11	15.71	9.24	4.79	14.82	9.88
osa-miR3979-3p	CTTCGGGGGAGGAGAGAAGC	0.00	0.00	2.67	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3979-5p	TCTCTCTCCCTTGAAGGC	0.11	0.17	7.91	3.19	0.28	0.04	0.00	0.00
osa-miR397a, sbi-miR397-5p, bdi-miR397	TCATTGAGTGCAGCGTTGATG	0.16	0.40	2.00	3.19	2.62	1.49	0.00	0.00
osa-miR397b	TTATTGAGTGCAGCGTTGATG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3980a-3p, osa-miR3980b-3p	CTGGCCGAGGCCGTCGATTCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3980a-5p, osa-miR3980b-5p	AATCGACGGCCTCAGTCAGGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3981-3p	AGTATTAGGATACGTCTCATC	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3981-5p	TGGGACGTATCCTATTACTAT	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3982-3p	AGTTGCCTACATGGAGCGCCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR3982-5p	GCGCTCCACGTAGGCAACAAT	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR398a	TGTGTTCTCAGGTCACCCCTT	0.00	0.00	0.29	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR398b, bdi-miR398a	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCTG	0.98	0.80	0.10	0.13	0.00	0.00	0.13	0.00
osa-miR399a, osa-miR399b, osa-miR399c	TGCCAAAGGAGAATTGCCCTG	36.03	16.79	0.57	0.77	0.60	0.48	0.07	0.29
osa-miR399d, zma-miR399e-3p, zma-miR399e-5p	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG	20.33	12.03	9.82	13.03	16.04	22.41	7.57	4.58
osa-miR399e, osa-miR399f, osa-miR399g	TGCCAAAGGAGATTTGCCCAG	0.05	0.06	0.19	0.77	0.09	0.04	0.00	0.00
osa-miR399h	TGCCAAAGGAGACTTGCCCAG	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR399i, zma-miR399d-3p, sbi-miR399d	TGCCAAAGGAGAGCTGCCCTG	0.43	0.11	2.38	0.51	0.55	0.31	0.07	0.14
osa-miR399j	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTA	0.05	0.00	5.34	5.24	0.05	0.00	0.00	0.07
osa-miR399k, zma-miR399f-3p, sbi-miR399f	TGCCAAAGGAAATTTGCCCCG	0.38	0.11	0.86	0.38	0.14	0.13	0.52	0.14
osa-miR408-3p, zma-miR408a, zma-miR408b	CTGCACTGCCTCTTCCCTGGC	19.24	72.89	11.35	9.71	329.24	173.56	26.17	13.97
osa-miR408-5p	CAGGGATGAGGCAGAGCATGG	0.00	0.00	1.24	0.26	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR413	CTAGTTTCACTTGTTCTGCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR414	TCATCCTCATCATCATCGTCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR415	AACAGAACAGAAGCAGAGCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR416	TGTTTCGTCCTGACTGTTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR417	GAATGTAGTGAATTTGTTCCA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR418	TAATGTGATGATGAAATGACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR419	TGATGAATGCTGACGATGTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR426	TTTTGGAAGTTTGTCTTACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR435	TTATCCGGTATTGGAGTTGA	0.00	0.00	10.68	11.50	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR437, sbi-miR437a, sbi-miR437b	AAAGTTAGAGAAGTTTGA	0.00	0.00	5.53	8.69	4.27	8.57	0.00	0.00
osa-miR438	TTCCACGCGTTATAGTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR439a, osa-miR439b, osa-miR439c	TGTCGAACCGGGTTGTTCCA	0.00	0.00	3.34	5.88	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR440	AGTGTCTCCTGATGATCGGGACAA	0.00	0.00	0.67	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR443	ATCACAATAACAATAAATCTGGA	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR444a-3p.1, osa-miR444d.1, b	TTGCTGCCTCAAGCTTGCTGC	0.05	0.00	0.76	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR444a-3p.2, osa-miR444d.2, c	TGCAGTTGCTGCCTCAAGCTT	25.16	29.97	28.80	39.48	12.32	58.48	2.15	2.44
osa-miR444a-5p	GCTAGAGGTGGCAACTGCATA	0.00	0.00	1.05	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR444b.1, osa-miR444c.1	TGTTGTCTCAAGCTTGCTGCC	423.42	457.62	76.95	101.19	0.69	2.02	200.10	356.94
osa-miR444b.2, osa-miR444c.2, zma	TGCAGTTGTTGTCTCAAGCTT	232.88	284.45	102.03	267.02	434.17	1536.32	70.81	132.42
osa-miR444d.3, ssp-miR444b.1	TTGTGGCTTTCTTGCAAGTTG	887.28	928.26	56.07	112.56	279.88	361.57	109.58	99.62
osa-miR444f, ssp-miR444a, ssp-miR4	TGCAGTTGTTGCCTCAAGCTT	8.10	9.86	2.67	3.19	251.25	777.89	207.28	358.38
osa-miR5071	TCAAGCATCATATCGTGACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5072	CGATTCCCCAGCGGAGTCGCCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5073	GTTTGGTGAATCGGAACTATTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5074	GAAGGCCACCGTCGGATCGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5075	TTCTCCGTCGCCGCCGTCGCCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5076	GAAATGGGAGCAGAGCAGGTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5077	GTTTCGCTCGGGTTCACCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5078	CCTCGTTCGACCGTGGCATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5079	TTTGATCTGTTATTTTGGTAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5080	AAAAGGATCATACCGTGACAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5081	TAATTTGTAGCAAATTGATAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5082	TGCGATGATGGCCGCGGGTTC	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5083	AGACTACAATTATCTGATCA	0.71	0.80	0.95	0.89	0.78	0.04	0.91	0.43
osa-miR5143a, osa-miR5143b	TGTGGTATGTTGGCAATGTAGGAA	0.00	0.00	1.24	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5144-3p	TCTCCTCAGCAGCACAGAAG	0.00	0.00	0.67	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5144-5p	TTCTTGTGCTGCTGAAGAGAC	0.00	0.00	33.85	38.84	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5145	ACCTGTTTGGATTCTTGAGGGCTA	0.00	0.00	0.29	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5146	TTTAACTAATGAACCGGCACCTAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5147	ACAACCTCTTGTTGGATGGAGGG	0.00	0.00	2.57	5.62	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5148a, osa-miR5148b, osa-m	TGAGGGGTAGAAATGTCATATCAT	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5149	GAGGAGCTGTGACGATTTGGGA	0.00	0.00	1.33	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5150-3p	AGAAGCTGCAGCTGTCAGAAGCTC	0.00	0.00	6.77	7.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5150-5p	AGCTTCTGACAGCTGCAGTTTCTC	0.00	0.00	3.62	4.98	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5151	TAATGATGTGGGTACGAATGAA	0.00	0.00	0.38	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5152-3p	AGACCATGCCTATACCTACCA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5152-5p	GTAGGGATAGGCATGATCTCT	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5153	TGGATTCCACTGACACGTAGACGT	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5154	AGCACCAGTTGACGTGACGCTGAG	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR5155	ACTTTAATACCATTGGAAGATTGC	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5156	AGCCTGTAAAAC TGCAAAAAGGAA	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5157a-3p, osa-miR5157b-3p	AGAAGTTGTGGCTATCAAAAAGTT	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5157a-5p, osa-miR5157b-5p	AACTTTTTAATAGCTACAAC TTCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5158	TGAGCCACTGGGATGAGGATGAAT	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5159	AACTAGAGTGGGTCAACGGGTACC	0.00	0.00	2.19	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5160	CGAGATCGATGGTATATTCTG	0.00	0.00	0.19	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5161	TCTGGATCAGAGGGAGTATA	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5162	AAATGACCAAAATACCCCTAGAAC	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5179, bdi-miR5179	TTTTGCTCAAGACCGCGCAAC	55.33	60.17	1.05	2.94	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR528-3p	CCTGTGCTTGCCCTTCCATT	0.05	0.06	0.00	0.51	0.05	0.00	0.00	0.00
osa-miR528-5p, zma-miR528a-5p, zma-miR528b-5p	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	2811.36	2634.06	40.24	26.57	670.48	190.25	73.36	25.28
osa-miR529a, sbi-miR529	CTGTACCCTCTCTCTTCTTC	84.35	54.84	23.27	10.48	0.55	0.00	0.00	0.00
osa-miR529b	AGAAGAGAGAGAGTACAGCTT	3.53	3.95	3.24	3.45	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR530-3p	AGGTGCAGAGGCAGATGCAAC	0.00	0.00	12.01	4.34	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR530-5p	TGCATTTGCACCTGCACCTA	0.82	2.46	4.96	10.86	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR531a	CTCGCCGGGGCTGCGTGCCGCCAT	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR531b	CTCGCCGGGGCTGCGTGCCG	0.00	0.00	6.77	5.88	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5337a	AAATTACTTGTCTGTTCTAGCT	0.00	0.00	0.76	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5337b	CTAGAACGGCAAGCAATTTGA	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5338	TGAAGCTTCAGTTGGTTGTAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5339	CAGATAGAGAATCTTCTCAGA	1.03	0.63	3.81	3.19	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5340	TGATGACGTGGATGAATTTCAA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR535-3p	GTGCTTTCTCCC GTTG TCACT	0.00	0.00	53.30	57.62	0.09	0.04	0.00	0.07
osa-miR535-5p	TGACAACGAGAGAGACACGC	0.05	0.06	211.60	253.86	0.05	0.00	0.00	0.00
osa-miR5484	AACCGAGCGCGCTGTTGATTA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5485	TGACAAC TGGTAGCAGAGCAA	0.00	0.00	0.67	2.56	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5486	AGGGGCTTGCATATTCTACCA	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5487	AAAGATGTGCATGTAGTCCG	0.00	0.00	0.10	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5488	TGAAGGCGACTGATGATTTCA	0.00	0.00	0.19	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5489	CAGGTGTTCTCGATGGCTTCC	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5490	TTGGATTTTTATTAGGACGG	0.00	0.00	0.19	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5491	TGAAATGGAGGCTCGTTGTAC	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5492	AGAAGGAGAATAGATATGGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5493	AGCCGGGCTCGGTCGCGCGTG	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5494	TTATAGGAGGTATAGACGGTA	0.00	0.00	0.57	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5495	AGAGGTCCGGATCGAACGTAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR5496	CCAGCCGGTGGCATAGTTCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5497	CAGAAATATCTGGGACGAGCAT	0.00	0.00	0.48	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5498	TGAGCTGTAACACTTGAAGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5499	GAAGGAAGAATCGTTATGGAA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5500	ATCACTGATGAAATCTTGCGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5501	TCTTGTGGCTAGAAGGGTGAG	0.00	0.00	0.57	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5502	TACGGATACGGATACGCGATAC	0.00	0.00	0.38	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5503	TTCGGATCTTTCTAGAGGCATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5504	AGTGACGGGAGGACTGCAAGG	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5505	GAGGATTCGGTATTGATCGCTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5506	TGGATCGCTTCGTCTGATGGT	0.00	0.00	0.86	2.30	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5507	AATGAGAATGATGACCCGGTG	0.00	0.00	0.38	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5508	TAGATGGCTGATCTGGTGTGG	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5509	TAGGCATTTTCTCTGGCATG	0.00	0.00	0.57	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5510	AGGCTGATCCACTCCAGAGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5511	CATATCCCAGCTGTTTCGGCC	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5512a, osa-miR5512b	TAGGATATGGTAATGCTAAAA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5513	TAACAAAGGACAACAGACTGA	0.00	0.00	0.76	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5514	TCCCAGAGCTTTGGCCGTCGC	0.00	0.00	0.76	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5515	CCGATGGTTGTTCTACAGGTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5516a, osa-miR5516b	CTCATTGCTTCGGTAGGCTGG	0.00	0.00	0.10	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5517	TGCATCACGGCGCATATGTAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5518	ATACTCAAACAGGGCATTGCA	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5519	TGGCAGAAAGTACTGGACTTAG	0.00	0.00	0.86	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5521	AGTGGCTGCATATCTGATGAG	0.00	0.00	0.29	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5522	AACAATAGGAATGGGAGGCAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5523	TGAGGAGGAACATATTTACTAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.07	0.00
osa-miR5524	TGGAAAATGTGTTTCATGACGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5525	TGAACCTTGGGAGCGATCTGAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5526	AAAGGTAGAGTCAGGTATGAG	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5527	TCTCAGCCAGGGCAGTAACAG	0.00	0.00	0.38	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5528	AAGACGGTTTTAGATGTTGCC	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5529	GTTTCATCCATGGACACCGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5530	AGTGGTGTCTGATTACCTGCC	0.00	0.00	0.29	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5531	ACTGACTGCCTTGAGCTCCGGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5532	ATGGAATATATGACAAAGGTGG	0.00	0.00	0.10	0.13	0.05	0.00	0.20	0.00
osa-miR5533	CTTGGCCAGAAGCCCTCATGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR5534a	TGACGACAACAGCTAGAATGG	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5534b	CGATGACAACAGCTAGAATGG	0.00	0.00	0.29	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5535	TCTGCGTGATTGAAGTCTGCAT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5536	AATGGTAGTGACATTATGGTAG	0.00	0.00	0.38	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5537	AATGTTTGTATGGATCGTTTGT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5538	ACTGAACTCAATCACTTGCTGC	0.05	0.06	0.00	0.00	0.05	0.00	0.52	0.79
osa-miR5539	AAGAAAACGGATGCGCGTGCTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5540	TTGTGCGAGATCGACGGTATA	0.00	0.00	0.29	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5541	TCAAGTGGTGTACTCTAAAGA	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5542	TTTGAGAAGGTATCATGAGAT	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5543	TATGAATGGTATATTTTCTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5544	AGAACACGGAGTAGAAGTTGGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5788	TGGATGTGACATACTCTAGTA	0.00	0.00	25.94	44.72	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5789	TGACTGAGCTTCGTTCCGGTAT	0.00	0.00	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5790	AAGACGATCCTAGCAGAGCTTCAT	0.00	0.00	1.24	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5791	TTGCAGGAGACTAGAGACCAG	0.00	0.00	2.10	4.85	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5792	GATGACAGCGGTGGTTCCGGACATC	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5793	CGAGGACGAGATACAGTGCAG	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5794	TGAGGAATCACTAGTAGTCGT	0.05	0.00	45.96	120.35	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR5795	ATGTCGAGGTCGAGTTCCCGGC	0.05	0.00	11.63	10.99	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5796	TCATTCAGGATTGAAGCCGCC	0.00	0.00	0.48	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5797	TCGTGGGATTTATGCAGTTAA	0.00	0.00	0.10	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5798	CTGGACTACAAGATCCCGGAT	0.00	0.00	0.38	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5799	AAGACGAATAATCAAACGTTGGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5800	CCCGGCTATCGGAACGGCTGC	0.00	0.00	0.48	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5801	ACCAAATCGTTTTTCGATCGTTGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5802	ATGGACTGTACTTTGTAAAGCGGA	0.00	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5803	ACCACTGTAGACGCTACGTGTGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5804	TGCGAAGTAGAGATGCCGACT	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5805	ACGAGTGATGGCGGCGTATACCTG	0.00	0.00	0.57	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5806	ACAGGCAAAGACAATGACGGC	0.00	0.00	0.57	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5807	AGGAGGTCTGGAGAGTTATGTGGC	0.00	0.00	2.29	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5808	ACTAAATCGTTTCTGATCGTTGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5809	TCGTCGCCGCGCACACAGC	0.00	0.00	0.48	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5810	ACGGAACCCTAATGGCGATGGCAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5811	CCTAACCTAGGAGTTCGATGGGAC	0.00	0.00	0.19	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5812	AGCAACGATTTTAAGATTGTGGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR5813	AAGCAGCGACTCTGGTCATGGA	0.00	0.00	0.48	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5814	AATCAAGTTAGGAACCATGCAAGT	0.00	0.00	2.96	2.17	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5815	AATGTTATGGACACTAGATGACAT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5816	TAGGAGTGTTTGTAGGAGCGCCAC	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5817	ATCGAATTTGAAAGAAAAAGGTAT	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5818	TCGAACTAGAAGGGCCAGGTT	0.00	0.00	0.57	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5819	AGGACGAGGGGAACGCGCGCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5820	TGGCAGAGATTGATCGAGGAA	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5821	TGGACGGAGCGATGGTGGGCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5822	TGTCTGCTCGATGTCAGGTTG	0.00	0.00	0.48	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5823	AAGGAATTGGGTCTAATCTCTTCC	0.00	0.00	0.38	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5824	AGTCTGATAAGAAGTCAATGGCGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5825	AAAACATCTGATAACCTGAAACGG	0.00	0.00	2.96	3.45	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5826	TAGCCCAAAGTGAGAAGAGTGGGT	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5827	TTTGTTGCAATTTGGACTACC	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5828	TTACGGCATAAAAAGTAAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5829	ATCAGGACCAGTAGGCGATGGTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5830	ATGTAGATGAGGTGATGTTACACA	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5831	TAGTCAAACCTTAGAATAGTTGGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5832	TTGGCGGAGCGGTTGCTGTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5833	TCCTCCTCGGGCTCATCGGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5834	ACGGATGTAGAAATTGGTGAT	0.00	0.00	0.00	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5835	ACGAAACCATAGGGATTTGGCAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5836	TGAGCAGCCGGACCATGGGAT	0.00	0.00	0.19	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5837.1	ATGTTGGAATGACATGCAGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR5837.2	GGTGATGTGGAGCGTTCCGGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6245	AGTATAGGTGTCGGCTCTATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6246	TTGGGGATTTCTGCCGGAGGAA	0.00	0.00	0.76	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6247	TGGCTGATTGACCTAATGGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6248	TATTTGAGGATGGAGGTAGTA	0.00	0.00	0.19	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6249	CGTGAAGAGCTCGCCGGCGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6250	GGGATAGATCGACGCGTCAAG	0.05	0.06	0.57	1.79	0.09	0.04	0.00	0.00
osa-miR6251	TGTGTAGCCACATTGTAAGGG	0.00	0.00	8.11	9.58	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6252	ATTCGTTGTATTAAGAGAGGGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6253	GAGGAAAGTGGGCAGTTGGGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6254	TGCTCCGATATTATGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR6255	TGGGAAAAATGGGCAGTTGAGT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
osa-miR6256	GTAGTACTCGGTTGTAGGTGTA	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7692-3p	TGACTTGGCATGCTTACGTGGCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7692-5p	GATCCAAAAAAGTGCCACGTGAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7693-3p	GACGTCCATCGATGAAGAGCGA	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7693-5p	GTTTCCGCTCTTCATCGATGGCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7694-3p	CCATATTCGTAGTGCTAGGTGG	0.00	0.00	0.76	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7694-5p	AACCTAGTACTGGATTAGTCACCA	0.00	0.00	0.95	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7695-3p	ACGTGATGTGCCACGTAGGCA	0.00	0.00	1.81	3.83	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR7695-5p	TGCCTATGTGGCACGCCACGTGAA	0.00	0.00	0.38	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR810a	TCATAAGCCCACCACATGTGG	0.00	0.00	7.34	11.50	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR810b.1	TGAACACCGATATGCGTCATC	0.00	0.06	18.88	35.39	0.00	0.04	0.00	0.00
osa-miR810b.2	AAGTGATTTAATTATGCCGTT	0.00	0.06	35.95	82.79	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812a, osa-miR812b, osa-miR812c	GACGGACGGTTAAACGTTGGAC	0.00	0.00	0.10	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812f	ACGGATGATTAAGTTGGACACGG	0.00	0.00	0.38	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812g, osa-miR812h, osa-miR812i	AAGACGGATGATTAAGTTGGACA	0.00	0.00	3.24	2.04	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812k, osa-miR812l, osa-miR812m	ACGAACGGTTAAAGTTGGACGCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812n-3p, osa-miR812t, osa-miR812u	ACGGAAAATCATGGCTGCACTTAA	0.00	0.00	0.19	0.38	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812n-5p	AAGTGCAGCCATGAGTTTCCGTGC	0.00	0.00	3.15	3.71	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812o-3p	GAACGGTCAAATGTTAGACACGGA	0.00	0.00	0.29	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812o-5p	CGTGTTCAACGTTTACTGTC	0.00	0.00	0.48	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812p	GACGGACGATTAAGTTGGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812q	ACGTTGGGTACGAATATCTACGGC	0.00	0.00	0.48	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812r	ACGTTAGACACGAATTTCTACGGC	0.00	0.00	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812s	AAGACGGACAATCAAACGTTGGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR812v	ATGGCTGCACTTAAATGGGACGG	0.00	0.00	0.10	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR814a, osa-miR814b, osa-miR814c	CACCTTCATAGTACAACGAATCT	0.00	0.00	0.29	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR815a, osa-miR815b, osa-miR815c	AAGGGGATTGAGGAGATTGGG	0.00	0.00	1.43	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR816	GTGACATATTTTACTACAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR817	TCCAACCTTGAGGCCCGATTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR818a, osa-miR818b, osa-miR818c	AATCCCTTATATTATGGGACGG	0.00	0.00	4.10	6.52	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR818f	GGGAGCATGTAGGATGGCCAT	0.00	0.00	0.19	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR820a, osa-miR820b, osa-miR820c	TCGGCCTCGTGGATGGACCAG	0.05	0.06	135.12	117.93	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR821a, osa-miR821b, osa-miR821c	AAGTCATCAACAAAAAAGTTGAAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
osa-miR827a, osa-miR827b, zma-miR827c	TTAGATGACCATCAGCAAACA	27.34	29.17	18.12	31.69	809.64	368.03	138.23	86.16
osa-miR827c	TAAGATGACCATCAGCGAAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR1435a	TTTCTTAAGTCAAACCTTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR1435b	TTTCTTAAGTCAAACCTTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
sbi-miR166k	TCGGACCAGGCTTCATTCCT	1042.17	1017.08	197.86	220.26	517.67	375.94	323.91	275.66
sbi-miR169o	TAGCCAAGGATGATTTGCCTG	118.48	113.63	5.91	8.69	11.31	2.46	0.13	0.00
sbi-miR169r-3p	GGCGGTACCTTGGCTAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	15.40	2.02	0.00	0.00
sbi-miR169r-5p	TAGCCAAGGATGACTTGCCT	36.79	75.01	6.39	15.46	288.02	107.03	112.26	49.70
sbi-miR171f	ATGAGCCGAACCAATATCACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR172b	GGAATCTTGATGATGCTGCA	5.49	9.11	0.95	1.15	0.18	0.09	0.07	0.00
sbi-miR172f	AGAATCCTGATGATGCTGCAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR2118-5p	GGCATGGGAACATGTAGGAAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.35	0.00	0.00
sbi-miR395f	ATGAAGTGTGGGGGAAGCTC	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR396d	CTCCACAGGCTTCTTGAAGTG	249.18	214.60	3.53	14.18	24.22	8.66	22.58	10.17
sbi-miR397-3p	TCACCGCGCTGCACTCAATT	0.00	0.00	0.00	0.00	38.01	9.18	0.00	0.00
sbi-miR437x-3p	ATTTGACTGACACGGATTCTAGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.00	0.00
sbi-miR437x-5p	TAGAGTTGTCTTAAGTCAAACCTTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.13	0.00	0.00
sbi-miR5381	AAGATCTGTGGCGCCGAGC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.41	0.75	34.59	32.37
sbi-miR5382	CCAATCTAAACAGGCCCT	0.00	0.00	0.00	0.00	1.70	0.26	0.00	0.00
sbi-miR5383	ATGACAGAGCTCCGGCAGAGATAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.31	0.00	0.00
sbi-miR5384	CGCGCCGCGTCCAGCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	10.66	9.58	0.00	0.00
sbi-miR5385	ACCACCAACCCACCGCTTCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5386	CGTCGCTGTCGCGCGCGCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5387a	TAACACGAACCGGTGCTAAAGGATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5387b	CGTGGCTCTGACCGGTGCTAAAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5388	ATCTTTGCCGGGTGTCTCTGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28	0.04	0.00	0.00
sbi-miR5389	GCTTGAGTTTATCAGCCGAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5564a	TGGGGAAGCAATTCGTCAACA	0.00	0.00	0.00	0.00	936.16	409.29	0.00	0.14
sbi-miR5564b	GCAATTCGTCAACAGCTTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	37.78	42.40	0.00	0.00
sbi-miR5564c-3p	ACGCGAGCTGTTTGGCGAATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
sbi-miR5564c-5p	AATTCGTCAACAGCTGCAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5565a, sbi-miR5565b	AACACATGTGGATTGAGGCGAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.40	0.00	0.00
sbi-miR5565c	TACACATGTGGATTGAGGTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5565d	ACTTCAATCCATGTATGTTGGTGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5565e	TTGTTTGGATGTTGTCCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	4.14	8.26	0.00	0.00
sbi-miR5565f	TAGTCGGATTTATATCAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5565g-3p	ACACATGTGGATTGAGATGAATAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
sbi-miR5565g-5p	TTCACATCAATCCACATATGTTGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5566	TCAGCATCACCTCCCTGTTGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5567	TTAATGATTCATGTATGTGTCCAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5568a	CAGAGCGACTTACAATTTGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28	0.26	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
sbi-miR5568b-3p	ACTATGTATCTAGAAAAGCTA	0.00	0.00	0.00	0.00	2.90	5.18	0.00	0.00
sbi-miR5568b-5p	TTTCTAGGTACATAGCTTTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	1.24	0.40	0.20	0.36
sbi-miR5568c-3p	ACTTACAGTTTGAACGGAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	1.05	0.00	0.00
sbi-miR5568c-5p	TCTGTTCCAAATTGTAAGTCG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00
sbi-miR5568d-3p	AAAGTTGTGTATCTAGAAAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.87	0.26	0.00	0.00
sbi-miR5568d-5p	TGGCTTTTCTAGATACATAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41	0.22	0.13	0.07
sbi-miR5568e-3p	TATCTAGAAAAGCTAAAACGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5568e-5p	GATGTTTTGGGTTTTCTAGAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5568f-3p	GTCTTATAATTTGGAATGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.09	0.07	0.00
sbi-miR5568f-5p	TCCATTCCAAATTGTAAGATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5568g-3p	AAAACGTCTTATAATTTGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5568g-5p	CAAATTATAAGATGTTTTGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.31	0.39	0.50
sbi-miR5569	TATTGCATGCTTGAACATGGTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR5570	AAAAGACAAATCAGCATGTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	2.99	2.64	0.00	0.00
sbi-miR6217a-3p, sbi-miR6217b-3p	AAAATTATCGTAAATAGAGGTGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6217a-5p, sbi-miR6217b-5p	TAGCCACTTTGAGTTACGATAATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6218-3p	ACAAGTTTTCGTGATTTTTGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.14
sbi-miR6218-5p	CGAAAATCACGAAACTTGTCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6219-3p	AGTCCCGAAACCTTAGTCCCGGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6219-5p	GAACCGGGACTAAAGGTGGGACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.09	0.00	0.00
sbi-miR6220-3p	ATGCCTTATAATTTGGGATGGAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6220-5p	CTCCATCCTAAATTATAAGACATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6221-3p	CCGGGGCCAGATCTCAGAAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.35	0.00	0.21
sbi-miR6221-5p	TTCTGACTTCTGGCCCCTGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.26	0.07	0.07
sbi-miR6222-3p	CTAGCTGATCCAAACAGGCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6222-5p	CCTGTTTGATCAGCCAAGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6223-3p	CTAGCATGTTCTCCTAAGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	14.02	4.22	0.00	0.00
sbi-miR6223-5p	TTCTTGGGAGGAGCATGCTAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.62	0.00	0.00
sbi-miR6224a-3p, sbi-miR6224b-3p, sbi-miR6224c-3p	CTTATATACTAGGACGGAGGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.26	0.21
sbi-miR6224a-5p, sbi-miR6224b-5p, sbi-miR6224c-5p	CTCCGTCCTAATATATAAGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6225-3p	GAAACGAATCTTTTAAGTCTAATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6225-5p	AACTAGACTCAAAAGATTCATCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.26	0.00	0.00
sbi-miR6226-3p	GATTAGTCACGATTAGTCGTCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.09	0.00	0.00
sbi-miR6226-5p	AGATCGGACGACTAATCGCGATTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6227-3p	CTCACAACACTTGCTATTTGGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6227-5p	GGGCCCAAATAGCAAGTGTGTGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6228-3p	GTGGCAGTAGAATTAATGAAGGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
sbi-miR6228-5p	TTCTATCTCTATTAATTGTGTTGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6229-3p	GTTTTTCTCGCCGGGTGAGAAGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6229-5p	ATTCTCACTTGGGCGACGGAAAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.22	0.00	0.00
sbi-miR6230-3p	TAACAAGTTTATGGGATCTAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.13	0.00	0.00
sbi-miR6230-5p	TTTTGGGTCCCTAAACTTGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	1.47	1.05	0.00	0.00
sbi-miR6231-3p	TATTTGTGGACTCATGGACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.09	0.00	0.00
sbi-miR6231-5p	GTCCGTGAGTCCACAAATAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6232a-3p	TGGATGTACCAAAAAAGTCAAAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.35	0.00	0.00
sbi-miR6232a-5p	GTCGCTTTGACTTTTTTGGTACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6232b-3p	AATTCGATGTACCAAAAAAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6232b-5p	TTTTTGGTACATTGAATTTGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.04	0.00	0.00
sbi-miR6233-3p	CAAGTTTGGTTTTGGTAATTAATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6233-5p	TGTTGAGGCTGGAGCGAAACTCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.13	0.14
sbi-miR6234a-3p, sbi-miR6234b-3p	TTAGCGTCAAGAGACGAACACACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.09	0.00	0.00
sbi-miR6234a-5p, sbi-miR6234b-5p	AAGTGTGTTTCTCTATTTGACGCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6235-3p	AACGAACAGTATTTTTCTCTTACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR6235-5p	TTGTGAGAGAAAAATACTGTTGGC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.00	0.00
sbi-miR821a, sbi-miR821c	AAGTCATCAACATAAAAAGTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
sbi-miR821b	AAGTTATGAACATAAAAAGTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sbi-miR821d	AAGTCATCAACAACAAAAGTTG	0.00	0.00	2.00	2.04	0.05	0.00	0.00	0.00
sbi-miR821e	AAGTCATCAAAAATAAAAAGTTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sof-miR159e	TTTGGATTGAAAGGAGCTCTT	0.60	0.63	0.00	0.38	0.00	0.09	0.33	0.50
sof-miR168b	TCGCTTGGGCAGATCGGGAC	0.60	1.09	0.00	0.00	0.37	0.57	0.07	0.07
sof-miR408e	CTGCACTGACTCTTCCCTGGC	0.43	0.57	0.10	0.00	0.41	0.48	0.00	0.00
ssp-miR1128	TACTACTCCCTCCGTCCCAA	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ssp-miR1432	CTCAGGAAAGATGACACCGAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00
ssp-miR437b	AAAGTTAGACAAGTTTGACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ssp-miR437c	AAAGTTAGAGAAGTCTGACTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00
tae-miR1117	TAGTACCGTTTCGTGGCACGAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1118	CACTACATTATGGAATGGAGGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1119	TGGCACGGCGTGATGCTGAGTCAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1120	ACATTCTTATATTATGAGACGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1121	AGTAGTGATCTAAACGCTCTTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1122, far-miR1122	TAGATACATCCGTATCTAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1123	TCCGTGAGACCTGGTCTCATAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1124	GCAGGACGTGAAGAGCGAGTCC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1125	AACCAACGAGACCAACTGCGGCGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
tae-miR1127	TCCTTCCGTTCCGGAATTAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1128	TACTACTCCCTCCGTCGAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1129	CAGCGAGCCAGCGGAGACCGGAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1130	CCTCCGTCCTCGTAATGTAAGACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1131	TAGTACCGGTTTCGTGGCTAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1133	CATATACTCCCTCCGTCGAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1134	CAACAACAACAAGAAGAAGAAGAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1135	CTGCGACAAGTAATTCGAACGGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1136	TTGTGCGAGGTATGGATGTATCTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1137	TAGTACAAAGTTGAGTCATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1138	GCTTAGATGTGACATCCTTAAAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1139	AGAGTAACATACACTAGTAACA	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR1433	GGGCAAGTCACCCTGGGCTACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR167b	TGAAGCTGACAGCATGATCTA	29.73	31.34	8.68	17.89	3.49	2.42	9.59	18.76
tae-miR171b	TTGAGCCGTGCCAATATCAGG	19.89	27.05	12.87	19.29	31.71	16.26	3.07	2.29
tae-miR319	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT	57.23	53.81	0.48	0.26	0.05	0.75	0.07	0.36
tae-miR399	TGCCAAAGGAGAATTGCC	36.47	16.90	0.57	0.77	0.60	0.48	0.07	0.29
tae-miR5084	ATACAGTACTGCAGAGGATCCTAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR5085	AAGGACATTTTTTGTGGCCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tae-miR5086	ACATTGGTGGAAAGGCGTGGTA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR1432-3p	GGGTGTCATCTCGCCTGAAGCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.51	0.04	0.26	0.07
zma-miR1432-5p, sbi-miR1432	CTCAGGAGAGATGACACCGAC	0.05	0.11	0.19	0.51	210.72	67.36	0.52	0.21
zma-miR156a-3p	GCTCACTTCTCTCTGTGTCAGT	0.22	0.06	0.00	0.00	0.18	0.09	4.11	3.37
zma-miR156b-3p	GCTCACCTCTATCTGTGTCAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.70	3.08
zma-miR156e-3p	GCTCACTGCTCTCTGTGTCATC	0.87	1.03	0.29	0.00	1.01	0.31	72.44	81.57
zma-miR156h-3p	GCTCACTGCTCTTTCTGTGTCATC	6.09	6.70	7.25	5.49	144.08	27.37	1.37	0.79
zma-miR156i-3p	GCTCACTGCTCTATCTGTGTCATC	0.60	0.29	0.00	0.00	17.79	5.93	3.85	13.68
zma-miR156j-3p	TGCTCTGCTCTCACTGTGTCATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR156k-3p	GCTCGTTCTCTTTCTGTGTCAGC	0.16	1.49	0.29	0.13	413.62	442.20	783.38	1061.59
zma-miR156l-3p	GCTCACTGCTCTATCTGTGTCACC	1.30	1.95	0.00	0.00	0.00	0.00	3.85	6.45
zma-miR159a-5p	GAGCTCCTATCATTCCAATGA	287.34	491.26	0.00	0.00	100.33	47.72	21.60	39.96
zma-miR159b-5p, zma-miR159j-5p, zma-miR159c-3p, zma-miR159d-3p, zma-miR159c-5p, zma-miR159d-5p	GTGCTCCCTTCAAACCAATAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	CTTGGATTGAAGGGAGCTCCT	4.18	6.70	0.19	0.00	0.00	0.79	0.59	1.50
	GAGCTCCCTTCGATCCAATCC	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
zma-miR159e-3p	ATTGGTTTGAAGGGAGCTCCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR159e-5p	CAGCTCCTGCAGCATCTGTTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR159f-5p	GAGCTCCTCTCATTCCAATGA	2.45	3.61	0.00	0.00	0.83	0.26	8.94	6.59

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
zma-miR159g-3p	TTTGGAGTGAAGGGAGTTCTG	0.82	0.74	0.19	0.13	0.05	0.18	0.00	0.07
zma-miR159g-5p, zma-miR159h-5p,	GTGCTCCCTTCACACCAATAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR159h-3p, zma-miR159i-3p	TTTGGAGTGAAGGGAGCTCTG	291.74	386.85	10.68	8.18	12.09	53.03	4.50	6.02
zma-miR160a-3p	GCGTGCAAGGGGCCAAGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	1.38	1.89	0.13	0.00
zma-miR160c-3p	GCGTGCGATGGTGCCAAGCATA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR160d-3p	GCGTGCGTGGAGCCAAGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR160f-3p	GCGTGCGAGGTGCCAGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR162-3p	TCGATAAACCTCTGCATCCA	0.16	0.40	68.94	96.33	4.73	6.28	112.19	149.39
zma-miR162-5p	GGGCGCAGTGGTTTATCGATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00
zma-miR164a-3p	CACGTGTTCTCCTTCTCCATC	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.18	0.00	0.00
zma-miR164b-3p	ATGTGCCCATCTTCTCCACC	0.05	0.00	0.00	0.00	4.04	4.04	0.07	0.07
zma-miR164c-3p, zma-miR164h-3p	CATGTGCCCTTCTTCTCCATC	0.05	0.06	0.00	0.00	0.05	0.00	2.68	3.51
zma-miR164d-3p	CACGTGGTCTCCTTCTCCAT	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	1.31	1.29
zma-miR164e-3p	CATGTGTCCGCCCTCTCCACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR164e-5p, sbi-miR164c	TGGAGAAGCAGGACACGTGAG	0.00	0.17	0.00	0.00	0.14	0.48	37.27	126.05
zma-miR164f-3p	CACGTGCGCTCCTTCTCCAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.09	0.00	0.00
zma-miR164g-3p	CACGTGCTCCCCTTCTCCACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR164h-5p	TGGAGAAGCAGGGCACGTGTG	0.05	0.46	0.00	0.00	0.05	0.04	0.00	0.00
zma-miR166b-3p, zma-miR166c-3p,	TCGGACCAGGCTTCATTCCC	23370.82	23564.04	659.39	665.52	7128.73	7340.00	2385.39	2597.65
zma-miR166g-5p	GGAATGTTGTCTGGTTGGAGA	55.00	27.91	0.00	0.00	0.00	0.00	20.04	15.18
zma-miR166h-5p	GGAATGACGTCCGGTCCGAAC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
zma-miR166i-5p	GGAATGTCGTCTGGCGCGAGA	0.00	0.06	0.00	0.00	0.32	0.35	1.70	0.29
zma-miR166j-5p	GGTTTGTCTGCTGGTTCAAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.46	2.08
zma-miR166k-5p	GGATTGTTGTCTGGCTCGGGG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.20	0.00
zma-miR166l-5p	GAATGGAGGCTGGTCCAAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR166n-5p	GGATTGTTGTCTGGCTCGGTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65	0.21
zma-miR167a-3p	GATCATGCATGACAGCCTCATT	0.00	0.00	0.00	0.13	0.05	0.00	0.00	0.00
zma-miR167b-3p	GATCATGCTGTGACAGTTTCACT	0.92	0.06	0.00	0.38	0.00	0.09	0.00	0.00
zma-miR167c-3p	GATCATGCTGTGGCAGCCTCACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.07
zma-miR167d-3p	GGTCATGCTGCTGCAGCCTCACT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	7.18	2.29
zma-miR167f-3p	GATCGTGCTGCGCAGTTTACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.39	0.07
zma-miR167g-3p	GGTCATGCTGTAGTTTCACT	0.27	0.11	31.18	16.48	129.65	82.47	5.03	1.00
zma-miR167h-3p, zma-miR167i-3p	GATCATGTTGCAGCTTCAC	4.35	4.07	1.81	1.15	82.36	37.66	30.74	49.20
zma-miR167j-3p	GATCATGTGGCAGTTTCACT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.04	0.20	1.50
zma-miR168a-3p	CCCGCCTTGACCAAGTGAA	713.59	949.17	109.47	134.66	1100.51	2118.46	142.02	160.14
zma-miR168b-3p	CCCGCCTTGATCAAGTGAA	23.21	17.19	0.10	0.64	4.37	5.49	142.87	97.76
zma-miR169a-3p, zma-miR169b-3p	GGCAAGTTGTTCTTGGCTACA	0.00	0.00	0.48	0.64	3.31	0.00	0.13	0.14

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
zma-miR169c-3p	GGCAAGTCTGTCCTTGGCTACA	0.00	0.00	0.19	0.26	2.16	0.04	1.24	0.21
zma-miR169d	TAGCCAAGGAGACTGCCTATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR169e	TAGCCAAGGAGACTGCCTACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR169f-3p	GGCATGTCTTCCCTTGGCTACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.87	0.35	0.20	0.29
zma-miR169i-3p, zma-miR169j-3p, zma-miR169k-3p	GGCAGTCTCCTTGGCTAG	1.20	1.20	1.53	2.17	45.64	49.43	8.94	5.08
zma-miR169l-3p	GGCAAATCATCCCTGCTACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR169l-5p	TAGCCAGGGATGATTTGCCTG	0.16	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	1.00
zma-miR169m-3p	GGCATCCATTCTTGGCTAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	346.39	30.45	1.96	1.65
zma-miR169m-5p, zma-miR169n-5p	TAGCCAAGAATGGCTTGCCTA	0.00	0.00	0.10	0.00	4.46	1.19	0.20	0.00
zma-miR169n-3p	GGCAGGCCTTCTTGGCTAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.29
zma-miR169o-3p	GGCAGGTCTTCTTGGCTAGC	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	0.22	0.00	0.00
zma-miR169p-3p	GGCAAGTCATCTGGGGCTACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR169q-3p	GGCAGGCCTTCTGGCTAAG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.09	0.00	0.00
zma-miR169r-3p	GGCAAGTTGTCCTTGGCTACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07
zma-miR171a-3p	TGATTGAGCCGCGCCAATAT	7.99	5.62	0.10	0.00	3.31	4.53	2.48	3.44
zma-miR171a-5p	TATTGGCGAGGTTCAATCAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR171b-3p	TTGAGCCGTGCCAATATCAC	20.11	27.33	15.54	23.00	32.81	17.09	3.20	2.29
zma-miR171b-5p	GATATTGGCGGGTTCAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.09	0.07	0.07
zma-miR171c-3p	TGACTGAGCCGTGCCAATATC	0.60	0.34	0.00	0.00	0.28	0.26	0.78	0.64
zma-miR171c-5p	TATTGGTGGCGTTCAATCAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR171f-3p	TTGAGCCGTGCCAATATCACA	0.00	0.06	2.29	3.45	0.05	0.00	0.00	0.00
zma-miR171f-5p	CGATGTTGGCATGGCTCAATC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR171g-5p	TATTGACTTGGCTCATCTCTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR171h-5p, zma-miR171k-5p	TGGTATTGTTTCGGCTCATGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.13	2.15	3.94
zma-miR171i-5p	TGTTGGCACGGTTCAATCAAA	1.25	2.41	0.00	0.00	0.00	0.04	0.39	2.94
zma-miR171j-5p	TATTGACGCGGTTCAATTCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR171l-5p	TATTGGCGTGCCCAATCCGA	0.00	0.00	0.10	0.13	0.00	0.00	0.07	0.00
zma-miR171m-5p	TATTGGCGCGCCTCAATCCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00
zma-miR171n-5p	TATTGGTGAGGTTCAATCCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR172a, zma-miR172b-3p, zma-miR172c-3p	AGAATCTTGATGATGCTGCA	270.38	444.50	0.86	2.17	259.07	536.62	128.18	133.21
zma-miR172b-5p, zma-miR172d-5p	CAGCACCATCAAGATTCACA	0.65	0.11	0.57	0.00	3.17	0.31	1.37	1.00
zma-miR172c-5p	CAGCACCACCAAGATTCACA	44.24	25.44	0.00	0.00	0.05	0.00	4.44	3.94
zma-miR2118e	TTCCTGATGTCTCCCATTCCTA	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR2118f	TTCCAATGCCTTCCATGCCTA	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR2118g	TTCCTGATGCCTCCTATTCTA	0.27	0.11	0.00	0.13	0.00	0.00	0.20	0.07
zma-miR2275a-3p	TTTGTTCCTCCAATATCTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.11	1.15
zma-miR2275a-5p	AGAGTTGGAGGAAAGCAAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.29

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
zma-miR2275b-3p, zma-miR2275c-3p	TTCAGTTTCCTCTAATATCTCA	0.00	0.00	0.48	0.38	0.00	0.00	1.63	1.22
zma-miR2275b-5p	AGGATTAGAGGCAACTGAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85	0.86
zma-miR2275c-5p	AGGATTAGAGGGACTTGAACC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR2275d-3p	TTTGTTCCTCTAATATCTCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR2275d-5p	AGAGTTGGAGGAAAGAAAAGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR319a-5p, zma-miR319c-5p	GAGCTCTCTTCAGTCCACTC	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR319b-5p, zma-miR319d-5p	AGAGCGTCCTTCAGTCCACTC	27.45	57.59	2.10	1.15	0.51	1.19	0.00	0.43
zma-miR390a-3p, zma-miR390b-3p	CGCTATCTATCTGAGCTCCA	2.39	0.63	6.77	4.47	0.74	0.04	17.30	8.52
zma-miR393a-3p	ATCAGTGCAATCCCTTTGGAAT	0.16	0.23	0.00	0.13	1.10	0.53	2.02	2.72
zma-miR393b-3p	ATCAATGCGATCCTTTGGAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
zma-miR393b-5p	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC	104.46	262.74	15.26	37.95	117.24	144.95	34.53	29.22
zma-miR393c-3p	GTCAGTGCAATCCCTTTGGAAT	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72	0.43
zma-miR394a-3p, zma-miR394b-3p	AGGTGGGCATACTGCCAATG	1.09	0.29	0.19	0.00	0.64	3.34	3.65	6.37
zma-miR395a-5p	GTTCTCCTCAAACCACTTCAGTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395b-5p	GTTCCCTACAAGCACTTCACAA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395c-5p	GTTCCCTGCAAACCACTTCACCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395d-5p, zma-miR395g-5p	GTTCTATGCAAGCACTTCACGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395e-5p, zma-miR395h-5p,	GTTCCCTTCAAGCACTTCACAT	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
zma-miR395f-5p	GTTACCTACAAGCACGTCTCGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395i-5p	GTTCCCTACAAGCACTTCACGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.13	0.00	0.00
zma-miR395k-3p	GTGAAGTGTTTGAGGAAACTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395k-5p	GTTTCCTTCAAGCACTTCACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395l-5p	GTTCTTCAAACCACTTCACCA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395m-5p	GTTCTTCAAACCACTTCACAT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR395n-5p	GTTCTTCAAACCACTTCACGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.07
zma-miR395o-3p	GTGAAGTGTTGGGTGAACTC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.22	0.07	0.14
zma-miR395o-5p	GTTCTTCAAAGCACTTCACGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00
zma-miR396a-3p, zma-miR396b-3p	GTTCAATAAAGCTGTGGGAAA	9.08	9.23	2.29	0.51	0.60	0.31	35.31	52.21
zma-miR396c, zma-miR396d, sbi-miR396e	TTCCACAGGCTTTCTTGAAGT	174.46	141.71	0.19	1.41	490.65	446.99	54.24	40.75
zma-miR396e-3p	GGTCAAGAAAGCCGTGGGAAG	0.82	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21
zma-miR396g-3p	GTTCAAGAAAGCTGTGGAAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR396g-5p, zma-miR396h	TCCCACAGCTTTATTGAACTG	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR397a-3p	TAGCCGTTAGCGCTCATTAACT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR397a-5p, zma-miR397b-5p	TCATTGAGCGCAGCGTTGATG	0.05	0.00	0.00	0.00	0.23	0.13	0.07	0.00
zma-miR397b-3p	CCAGCGCTGCACTCAATTACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR398a-3p, zma-miR398b-3p,	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCCG	0.00	0.00	0.00	0.00	15.03	6.37	8.62	4.01
zma-miR398a-5p	GGGGCGAACTGAGAACACATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.14

Identificacion	Secuencia madura	Veces por millón							
		Bdi-Ctrl	Bdi-Seq	Osa-Ctrl	Osa-Seq	Sbi-Ctrl	Sbi-Seq	Zma-Ctrl	Zma-Seq
zma-miR398b-5p	GGGGCGGACTGGGAACACATG	0.00	0.06	0.00	0.00	13.10	2.99	1.57	1.43
zma-miR399a-5p	GTGCGGTTCTCCTCTGGCACG	1.68	0.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399b-3p	TGCCAAAGGAGAGCTGTCTG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399b-5p	GTGCAGCTCTCCTCTGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399c-5p	GGGTACGTCTCCTTTGGCACA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00
zma-miR399d-5p	GTGTGGCTCTCCTCTGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00
zma-miR399e-5p	GGGCTTCTCTTTCTTGGCAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	2.21	1.71	1.31	0.07
zma-miR399f-5p	GGGCAACTTCTCCTTTGGCAGA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.04	0.85	0.79
zma-miR399g-3p, sbi-miR399k	TGCCAAAGGGGATTTGCCCGG	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00
zma-miR399g-5p	GGGCAACCCCGTTGGCAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399h-5p	GTGCAGTTCTCCTCTGGCACG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399i-5p	GTGCGGCTCTCCTCTGGCATG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR399j-5p	AGGCAGCTCTCCTCTGGCAGG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	1.67	0.00	0.00
zma-miR408b-5p	CAGGGACGAGGCAGAGCATGG	0.00	0.00	0.00	0.00	42.05	9.45	0.20	0.50
zma-miR482-3p	TCTTCCTTGTTCCCTCCATT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR482-5p	TGGGAGATGAAGGAGCCTT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
zma-miR528a-3p, zma-miR528b-3p	CCTGTGCCTGCCTCTTCCATT	4.67	4.13	0.00	0.00	20.18	1.76	0.13	0.07
zma-miR529-3p	GCTGTACCCTCTCTTCTTC	84.13	53.98	22.98	10.35	0.55	0.00	0.00	0.00
zma-miR529-5p, bdi-miR529	AGAAGAGAGAGAGTACAGCCT	1239.13	1495.67	128.16	371.53	1.33	1.41	2.61	1.29
zma-miR827-5p	TTTGTTGGTGGTCATTAACC	0.05	0.00	0.00	0.00	68.75	35.77	99.27	108.21



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 26 de Marzo del 2014 a las 17:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Identificación y análisis de expresión de microRNAs de respuesta a sequía en plantas monocotiledóneas** presentado por el alumno **José Francisco Pulido Barajas**, con número de matrícula **08090008**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU **APROBACIÓN** PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.

Tuxtepec, Oax., a 27 de Marzo del 2014.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor-Investigador UNPA

Presidente

Dr. José Abad Zavaleta
Profesor-Investigador UNPA

Vocal

Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor-Investigador UNPA

Co-director de Tesis

Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor-Investigador UNPA

Secretario

Dra. Sandra Trinidad del Moral Ventura
Profesor-Investigador UNPA