



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

**Elaboración de un protocolo para construir
bibliotecas de RNAs pequeños y su implementación
para el estudio de la respuesta a sequía crónica en
Brachypodium distachyon L.**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

PRESENTA:

IBQ. Amado Ortiz Yescas

Asesora de Tesis:

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Tuxtepec Oaxaca, Enero de 2016.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de Diciembre de 2015

L.P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del Ing. Amado Ortiz Yescas, matrícula 12140011, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "Elaboración de un protocolo para construir bibliotecas de RNAs pequeños y su implementación para el estudio de la respuesta a sequía crónica en *Brachypodium distachyon* L." para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular me despido quedando atento ante cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí jú



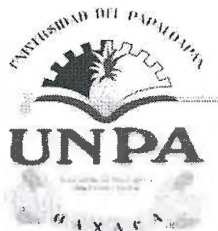
Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

Ccp. Ing. Amado Ortiz Yescas
Ccp. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 30 de Septiembre de 2015

IBQ. Amado Ortiz Yescas

Estudiante de la Maestría en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado en Maestro en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Julián Mario Peña Castro	UNPA	Presidente
Dra. Rosaura Aparicio Fabré	Universidad Politécnica del Estado de Morelos	Vocal
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Secretario
Dr. Edgar García López	Cátedra-UNPA	1er Suplente
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente



Dr. Mario Valera Zaragoza
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
VoBo.



Ccp. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Directora de tesis
Ccp. L.P. Yesenia Barrientos Arenal, Jefa de Servicios Escolares
Ccp. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque
Industrial. C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

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, 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 de los proyectos de Ciencia Básica CONACYT 169619.

Amado Ortiz Yescas recibió apoyo del CONACYT a través de la Beca Nacional 284049 para la realización de estudios de maestría y de la beca 21744, asociada al proyecto de Ciencia Básica CONACYT 169619.

Partes de este trabajo se presentaron en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica, realizado en la Ciudad de Guadalajara, Jalisco, del 2 al 8 de noviembre de 2014.

Mariana E. Cesario Solís, Amado Ortiz Yescas, Julián M. Peña Castro, Blanca E. Barrera Figueroa, 2014. Physiological and molecular characterization of the response to drought in four *Brachypodium distachyon* natural variants. Poster.

Amado Ortiz-Yescas, Mariana E. Cesario-Solis, Julián M. Peña-Castro, Blanca E. Barrera-Figueroa, 2014. Identification of microRNAs responsive to chronic drought, during three growth stages of *Brachypodium distachyon* Bd21. Poster.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme dado la vida, salud y por haberme regalado cada día de mi vida para lograr mis objetivos, además por su infinita bondad y amor, enseñándome a enfrentar los problemas sin perder nunca la cordura, ni desfallecer en el intento.

A MI MADRE CRISTINA

A pesar de la distancia física, siento que estas, conmigo siempre, que aunque nos faltaron muchas cosas por vivir, sé que este momento hubiera sido muy especial, gracias por animarme a seguir superándome siempre, por tus consejos, tus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A MI PADRE AMADO

Por los buenos consejos, la perseverancia, por confiar en mí, así como también por el apoyo que siempre me ha dado, por el valor mostrado para salir adelante.

A MIS HERMANOS

A mi hermana Gerarda por animarme siempre y a no darme por vencido, a mi hermano José Luis por sus consejos y por ser un ejemplo de hermano, a mi hermana Gisela por su apoyo, a mi hermano Primitivo por los consejos y la motivación, a mi hermana Lucía por animarme siempre en las buenas y las malas, por sus consejos y su apoyo, a mi hermano Héctor.

A MI ESPOSA ALICIA

Por estar conmigo en apoyándome y animándome además por darme a ese hermoso pequeñín que llegó a formar parte de nuestra vidas alegrándonos cada día con sus travesuras.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a dios por regalarme cada maravilloso día para cumplir cada una de mis metas, por darme salud y acompañarme día con día.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora y guía de esta tesis Dra. Blanca Barrera Figueroa por haberme brindado la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por haberme apoyado siempre en todo momento, pero sobre todo por su confianza, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y por ser demasiado accesible en todo momento, por su gran capacidad lo cual ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para efectuar las actividades propuestas durante el desarrollo de la tesis, mil gracias Dra.

A los revisores de tesis quiero agradecer al Dr. Julián Mario Peña Castro por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Gracias por su disponibilidad y paciencia. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado en esta tesis. Agradezco a la Dra. Jacqueline Capataz Tafur por facilitarme material de laboratorio, por sus consejos y por su colaboración en la revisión de la tesis. Al Dr. Edgar García por sus observaciones de la tesis, al Dr. Enrique Villalobos y a la Dra. Rosaura por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Ariana Huerta Heredia por su gran ayuda en los experimentos, por su disponibilidad y por sus grandes consejos, por animarme en todo momento.

Para mis compañeros de grupo Mariana, Luis Alberto, Monserrat, Sandra, Amílcar, por sus consejos y apoyo moral además por compartir sus experiencias durante los 2 años de maestría, mil gracias.

A mis amigos y grandes compañeros del laboratorio, a José Francisco por compartir su conocimiento durante la realización de las bibliotecas, a Lissete Gallegos por sus consejos, por su disponibilidad siempre, a Alyn por su valiosa colaboración en el cuidado de las plantas, así como también por sus consejos, al Dr. Baldemar y Rogelio por su gran ayuda en el análisis de las bibliotecas construidas, a Karina por ser una gran persona y amiga, a Laura, Raquel, Sarai, Ofelia, Sandra, Amílcar, Armando, Walter, así como también a todas aquellas personas que directa e indirectamente hicieron posible la realización de esta tesis, a todos ustedes mil gracias.

Al CONACYT por que a través de la Beca que me proporcionaron fue posible la realización de estudios de maestría y porque gracias a ello fue posible alcanzar solo un peldaño de mi meta así también quiero agradecer al programa de beca PROMEP 2011 103.5/11/6720 por apoyarme durante el seguimiento de la realización de la tesis.

Quiero agradecer a ala UNPA campus Tuxtepec y en especial al Instituto de Biotecnología por la oportunidad brindada para seguir adelante con mi formación profesional

INDICE

	Pag
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 El flujo de la información genética y su regulación.....	4
2.2 La importancia biológica de los microRNAs.....	5
2.3 Biogénesis y mecanismos de acción de los microRNAs.....	7
2.4 Herramientas para el estudio de los microRNAs.....	9
2.4.1 Estrategia bioinformática.....	10
2.4.2 Estrategia basada en hibridación.....	11
2.4.3 Estrategia de secuenciación directa.....	12
2.4.3.1 Construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para secuenciación de alto alcance.....	13
2.5 La sequía.....	19
2.6 Las plantas y la sequía.....	22
2.7 Mecanismos de respuesta a la sequía.....	22
2.7.1 Respuesta molecular a la sequía.....	23
2.8 Los microRNAs en la respuesta a la sequía y su influencia en el desarrollo.....	24
2.9 Complejidad de la respuesta a estrés por sequía.....	26
2.10 <i>Brachypodium distachyon</i> como planta modelo.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVO GENERAL.....	31
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
7.1 Protocolos de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños.....	33
7.1.1 Construcción de bibliotecas con purificación en gel (Método PAGE).....	34
7.1.1.1 Selección de RNAs de 20-30 nt. Primera purificación en gel PAGE.....	34
7.1.1.2 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' y efecto del DMSO y el PEG 8000. Segunda purificación en gel PAGE.....	35
7.1.1.3 Ligación del adaptador en el extremo 5'. Tercera purificación en gel PAGE.....	37
7.1.1.4 Transcripción reversa.....	38
7.1.1.5 Amplificación e indizado de las bibliotecas.....	39
7.1.2 Optimización de la concentración de adaptadores y uso de RNA total.....	41
7.1.3 Construcción de bibliotecas por el método directo.....	41
7.1.3.1 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' del RNA.....	42
7.1.3.2. Ligación del adaptador al extremo 5' de los RNAs pequeños.	42
7.1.3.3 Transcripción reversa.....	43
7.1.3.4 Amplificación e indizado de las bibliotecas.....	43
7.2 Verificación de la calidad de las bibliotecas.....	44
7.2.1 Reamplificación y purificación de productos de PCR.....	44
7.2.2 Ligación de productos en el vector pGEM-T Easy.....	45

7.2.3 Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	46
7.2.4 Extracción de plásmidos.....	47
7.2.5 Selección de plásmidos para secuenciación.....	48
7.3 Cálculo de costos de producción.....	50
7.4 Balance de tiempo.....	50
7.5 Sistema biológico <i>Brachypodium distachyon</i>	50
7.5.1 Establecimiento del cultivo de <i>B. distachyon</i>	50
7.6 Tratamientos de estrés y colecta de muestras.....	51
7.7 Caracterización fisiológica de <i>B. distachyon</i>	53
7.8 Caracterización molecular de <i>B. distachyon</i>	54
7.8.1 Extracción de RNA de <i>B. distachyon</i>	54
7.8.2 Análisis preliminar de expresión de dos microRNAs en <i>B. distachyon</i>	55
7.8.3 Construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para secuenciación masiva.....	57
7.8.4 Análisis de resultados de la secuenciación masiva.....	58
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
8.1 Análisis de integridad del RNA total empleado en los protocolos de construcción de bibliotecas.....	59
8.2 Construcción de bibliotecas con purificación en gel (Método PAGE).....	60
8.3 Control de calidad de las bibliotecas construidas por el método PAGE.....	65
8.3.1 Análisis del tamaño de los productos de las bibliotecas mediante PCR y digestión.....	65
8.3.2 Análisis de la secuencia de los productos individuales.....	67
8.4 Efecto de la concentración de los adaptadores.....	71
8.5 Construcción de bibliotecas por el método directo.....	73
8.6 Análisis de costos de producción.....	80
8.7 Análisis de tiempo de Preparación.....	82
8.8 Establecimiento del sistema de estudio <i>B. distachyon</i> y perfil temporal de desarrollo.....	84
8.9 Efectos de la sequía sobre <i>B. distachyon</i>	85
8.10 Análisis de expresión preliminar de <i>B. distachyon</i>	90
8.11 Implementación del protocolo propuesto para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños.....	92
8.12 Resultados de la secuenciación masiva.....	93
9. CONCLUSIONES.....	95
10. PERSPECTIVAS.....	96
11. REFERENCIAS.....	97
12. APÉNDICES.....	104
Apéndice A.....	104
Apéndice B.....	105
Apéndice C.....	110
Apéndice D.....	115
Apéndice E.....	117

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. El flujo de la información genética.....	4
Figura 2. Modelos clásicos de regulación de la expresión genética.....	6
Figura 3. Biogénesis de los microRNAs y modo de acción.....	8
Figura 4. Mecanismos de acción reguladora de los microRNAs sobre sus transcritos blanco.....	9
Figura 5. Productos posibles de las bibliotecas de RNAs pequeños.....	14
Figura 6. Empleo de adaptadores preadenilados para minimizar la formación de productos no deseados.....	15
Figura 7. Purificación en gel PAGE para minimizar la formación de productos no deseados.....	16
Figura 8. Protocolo de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños de Illumina....	17
Figura 9. Construcciones compatibles con la secuenciación Illumina.....	19
Figura 10. Distribución y severidad de la sequía en el mundo.....	20
Figura 11. Porcentaje de área afectada por sequía en México.....	20
Figura 12. Sequía excepcional y extrema en México en el mes de Junio de 2011.....	21
Figura 13. Estrategia experimental en dos fases.....	32
Figura 14. Medición de parámetros fisiológicos de desarrollo en <i>B. distachyon</i>	53
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% de los RNAs extraídos de <i>B. distachyon</i>	59
Figura 16. Separación de RNAs de 20-30 nt. y primera purificación PAGE.....	60
Figura 17. Productos de la ligación del adaptador 3' y segunda purificación PAGE...	61
Figura 18. Productos de la ligación del adaptador 5' y tercera purificación PAGE.....	62
Figura 19. Productos de amplificación de las bibliotecas construidas por el método PAGE.....	64
Figura 20. Productos de PCR típicos obtenidos a partir de plásmidos.....	66
Figura 21. Productos de digestión de plásmidos.....	67

Figura 22. Productos de amplificación de bibliotecas construidas con la fracción de RNA de 20-30 nt.....	72
Figura 23. Empleo del oligonucleótido BRIDGE para permitir la secuenciación del índice en la plataforma Illumina.....	74
Figura 24. Productos de amplificación de las bibliotecas construidas por el método directo.....	75
Figura 25. Productos de la digestión con ECORI.....	76
Figura 26 Perfil temporal de desarrollo de <i>B.distachyon</i> en fotoperiodo regular (16h luz/8h oscuridad) y fotoperiodo largo (20h luz / 4h oscuridad.....	84
Figura 27. Efecto de la sequía crónica sobre las etapas de desarrollo.....	85
Figura 28. Efecto de la sequía crónica sobre la temporalidad de desarrollo de <i>B.distachyon</i> en dos fotoperiodos.....	86
Figura 29. Contenido relativo de agua en hojas de plantas bajo tratamientos de sequía en condiciones de fotoperiodo largo (20/4) y regular (16/8).....	86
Figura 30. Efecto de la sequía y el fotoperiodo regular sobre parámetros de desarrollo en <i>B. distachyon</i>	88
Figura 31. Efecto de la sequía y el fotoperiodo largo (20h luz/4h oscuridad) sobre parámetros de desarrollo en <i>B. distachyon</i>	89
Figura 32. Análisis de expresión de miR156 y mir159 en muestras colectadas para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños.....	91
Figura 33. Productos finales de las bibliotecas de <i>B. distachyon</i> construidas a partir de plantas en tres etapas de desarrollo y dos condiciones de crecimiento.....	92

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Algunos microRNAs de respuesta a sequía identificados en plantas.....	25
Tabla 2. Preparación de la reacción de ligación al extremo 3'	36
Tabla 3. Reacción de ligación al extremo 5'	37
Tabla 4. Primera parte de la reacción de transcripción reversa.....	39
Tabla 5. Segunda parte de la transcripción reversa.....	39
Tabla 6. Preparación de las reacciones de PCR.....	40
Tabla 7. Programa de ciclado para la amplificación de las bibliotecas.....	40
Tabla 8. Reacción de ligación del adaptador 3' al RNA total.....	42
Tabla 9. Programa de ciclado para la amplificación de las bibliotecas.....	43
Tabla 10. Reacción de reamplificación de productos para ligación en vector.....	44
Tabla 11. Programa de ciclado para la reamplificación.....	45
Tabla 12. Reacción de ligación de los productos de PCR en el vector PGEM-T easy.....	45
Tabla 13. Preparación de las reacciones de PCR de plásmidos.....	48
Tabla 14. Programa de ciclado para las PCR de plásmidos.....	48
Tabla 15. Reacción para la digestión de plásmidos.....	49
Tabla 16. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA para el análisis de expresión por qPCR Stem-Loop.....	56
Tabla 17. Reacciones de q-PCR con la sonda Taqman.....	56
Tabla 18. Programa de ciclado para la PCR cuantitativa de microRNAs.....	57
Tabla 19. Secuencia de productos obtenidos en las bibliotecas construidas empleando peg8000 (p1-8) o DMSO (d1-6) en las reacciones de ligación.....	69

Tabla 20. Secuencia de productos obtenidos en las bibliotecas construidas empleando el método directo.....	78
Tabla 21. Costos de producción de 24 bibliotecas de RNAs pequeños con el método page, método directo, kits comerciales y servicios profesionales de empresas mexicanas para la construcción de bibliotecas.....	81
Tabla 22. Inversión de tiempo necesario para realizar 6 bibliotecas de RNAs pequeños.....	83
Tabla 23. Resumen de resultados de la secuenciación masiva.....	93

RESUMEN

Los microRNAs son moléculas de RNA de longitud corta que desempeñan funciones importantes durante el desarrollo y en la respuesta a los estímulos ambientales. Por su relevancia, el estudio de los microRNAs ha experimentado grandes avances en los últimos años. Uno de los pasos esenciales para el estudio de los microRNAs es su secuenciación, para lo cual existen protocolos que permiten la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños que pueden secuenciarse masivamente por síntesis. Basado en el fundamento de protocolos tradicionales de construcción de bibliotecas, en este trabajo de tesis se realizaron modificaciones para proponer un protocolo *in house*. Como resultado, se observó que los parámetros que impactan la calidad de las secuencias son la adición de un agente aglomerante de baja viscosidad, la optimización de las concentraciones de los adaptadores y el empleo de RNA previamente purificado para seleccionar RNAs de 20-30 nt. Adicionalmente, se propuso el empleo del oligonucleótido BRIDGE para reducir los costos de adquisición de adaptadores de RNA preadenilados. Con el protocolo se logró reducir el tiempo de preparación de las bibliotecas y el número de pasos de manipulación del RNA. Además, se redujo la presencia de productos secundarios no deseados y disminuyeron los costos de producción.

El protocolo se implementó en el estudio de microRNAs inducidos por la sequía crónica, que es uno de los factores más importantes que afectan a la agricultura. Como modelo se empleó a la planta monocotiledónea *Brachypodium distachyon* sometida a sequía crónica en tres diferentes etapas de desarrollo: vegetativa, transición a la floración y floración. La fisiología de *B. distachyon* se alteró en respuesta al estrés, causando el retraso del tiempo a floración y la disminución en el número de hojas, ramificaciones y estatura. Un análisis de expresión mediante PCR cuantitativa demostró que los microRNAs miR156 y miR159, incrementan su nivel de expresión en función de los cambios que sufre la planta para adaptarse al estrés. Con la implementación del protocolo propuesto en el modelo de estudio será posible profundizar en el conocimiento de los mecanismos de respuesta al estrés que están regulados por microRNAs en monocotiledóneas expuestas crónicamente a la sequía.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas técnicas de modificación de ácidos nucleicos ha permitido analizar los eventos que suceden a nivel molecular en las plantas. Herramientas como la bioinformática, las tecnologías basadas en la hibridación de los ácidos nucleicos y su secuenciación directa han facilitado los avances en esta área del conocimiento.

Dentro de la diversidad de eventos moleculares que mantienen el flujo de la información genética, destaca la participación de moléculas pequeñas de RNA, llamadas microRNAs. Estas moléculas están implicadas en la regulación de una serie de procesos de importancia vital en las plantas y en el resto de los organismos eucariotas. Los microRNAs regulan procesos del desarrollo, la morfología y la respuesta a estímulos bióticos y abióticos, mediante el control negativo de la expresión de sus genes blanco (Lu *et al.*, 2005; Rubio-Somoza y Weigel, 2011; Bertolini *et al.*, 2013).

Para el análisis de los microRNAs se han empleado distintas metodologías, siendo la secuenciación de alto alcance, una de las más sobresalientes. Para esto se requiere la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños, lo cual es un proceso laborioso y técnicamente demandante. Además, requiere el uso de adaptadores y enzimas de alto costo. Actualmente se cuenta con una variedad de kits comerciales para la construcción de bibliotecas, y algunas empresas que se dedican a la secuenciación masiva, también ofrecen los servicios de construcción. Sin embargo, aún es necesario reducir los costos y simplificar los procedimientos para que estas herramientas estén al alcance de laboratorios con presupuesto modesto o que necesiten personalizar la construcción de bibliotecas.

Una de las condiciones que afecta a diversos cultivos de plantas es la sequía. En México, se pierden grandes cantidades de productos agrícolas debido a que las plantas sufren sequía en el campo. Esto ubica a la sequía como primera causa de pérdidas económicas en el campo en nuestro país (Agroasemex, 2006). Las plantas han adquirido mecanismos para responder al estrés mediante el ajuste de su desarrollo, morfología y ciclo de vida. Estos cambios

están regulados finamente al nivel molecular. Desde el año 2004 se reportó que los microRNAs participan activamente en la inducción de cambios moleculares en respuesta al estrés abiótico (Sunkar y Zhu, 2004). A partir de entonces, un gran número de grupos de investigación a nivel mundial se han dedicado al estudio de los microRNAs de respuesta a estrés en plantas modelo y de cultivo (Zhao *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008; Arenas-Huertero *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010) ya que tienen un amplio potencial para dirigir el mejoramiento de la tolerancia al estrés. Sin embargo, aún se está lejos de tener la imagen completa de la función de los microRNAs en la tolerancia al estrés que considere la complejidad de las redes de respuesta, las distintas intensidades y temporalidades en que la sequía se presenta naturalmente, y la variedad de mecanismos de tolerancia presentes en las diferentes especies vegetales.

2. ANTECEDENTES

2.1 El flujo de la información genética y su regulación

La expresión genética es el proceso por el cual la información codificada en el DNA se transcribe y se traduce para formar productos funcionales, ya sea RNAs o proteínas. Inicialmente, una región del DNA donde está contenido un gen puede activarse para iniciar su copiado en forma de RNA, mediante el proceso de transcripción (Berg *et al.*, 2002) (Fig. 1). La iniciación de la transcripción de un gen es un punto crítico de regulación y está determinado por la interacción de secuencias reguladoras contenidas en el propio gen (el promotor) y proteínas de activación, llamadas factores de transcripción. Cuando un gen se activa, su producto primario, el RNA, se procesa y se exporta (Fig. 1). Si la función última del gen es a nivel de RNA, se trata de un RNA no codificante; ejemplos de estos RNAs son el tRNA (RNA de transferencia) y el rRNA (ribosomal), que no se traducen a proteínas (Dinger *et al.*, 2008). Otros RNAs interactúan con el rRNA contenido en los ribosomas y con tRNAs para sintetizar una proteína mediante el proceso de traducción (Fig. 1). Estos últimos son los RNAs codificantes o RNAs mensajeros (mRNA).

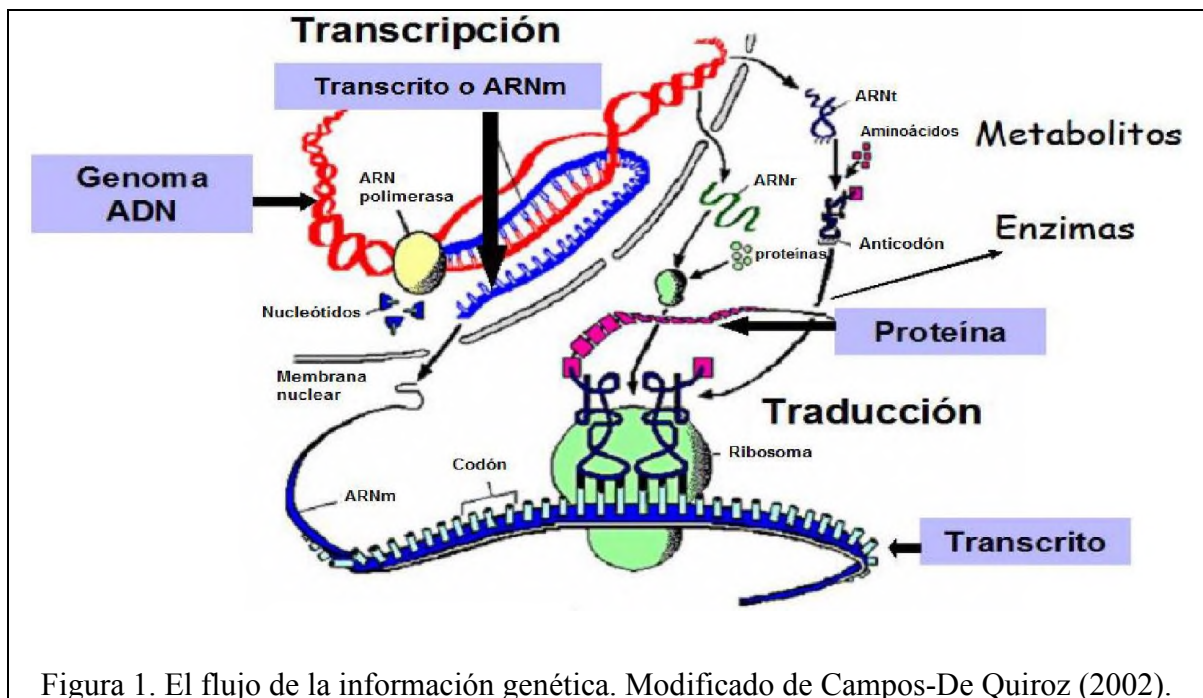


Figura 1. El flujo de la información genética. Modificado de Campos-De Quiroz (2002).

Existen diversos puntos de control de la expresión genética que se establecen para la activación (encendido o inducción) y la represión (apagado o silenciamiento). Para la activación es necesario el reconocimiento entre la secuencia del promotor y factores de transcripción (Campos-De Quiroz, 2002). Para la represión, los genes pueden silenciarse en dos formas: 1) desde el DNA al impedir el acceso a la maquinaria molecular necesaria para llevar a cabo la transcripción, un proceso llamado silenciamiento génico transcripcional (Vaucheret y Fagard, 2001), y 2) mediante la degradación del RNA por un proceso llamado silenciamiento génico postranscripcional (Vaucheret *et al.*, 2001) o PTGS, por sus siglas en inglés.

En 1961, Jacob y Monod propusieron ambos modelos para explicar la regulación de la expresión genética. En estos modelos, la expresión de los genes estructurales se encuentra bajo el control de genes reguladores (Fig. 2). El producto de un gen regulador, conocido como represor, actúa directamente sobre un gen estructural a nivel del DNA (según el modelo I, Fig. 2), o bien a nivel de RNA (según el modelo II, Fig. 2). En los modelos propuestos por Jacob y Monod, se sugiere que el RNA podría actuar como elemento regulador (Fig. 2).

2.2 La importancia biológica de los microRNAs

Los modelos propuestos por Jacob y Monod (1961) (Fig. 2) son congruentes con el funcionamiento de moléculas pequeñas de RNA a las que se atribuye actividad en el silenciamiento génico, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Dentro de este grupo de RNAs reguladores se encuentran los microRNAs.

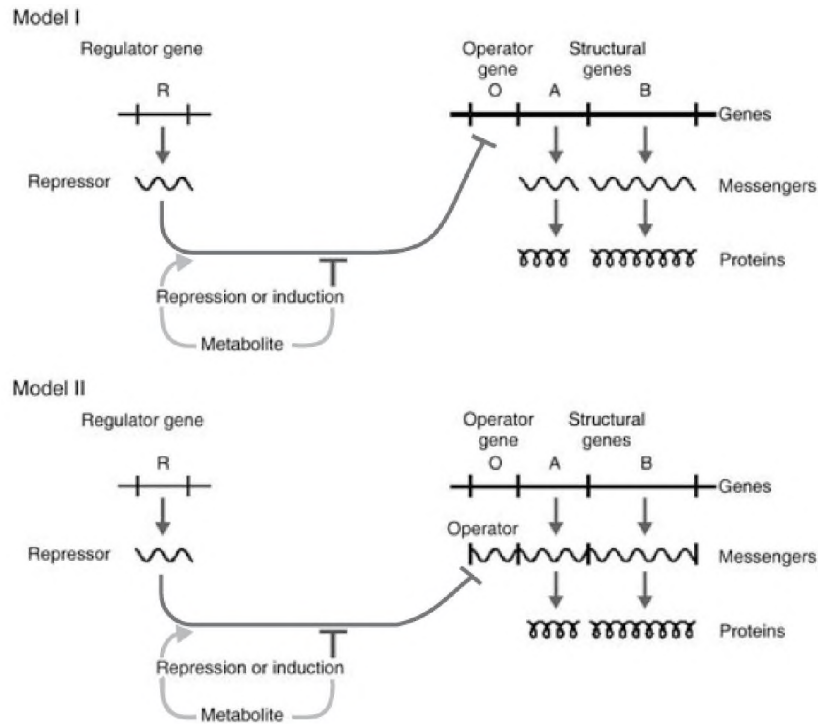


Figura 2. Modelos clásicos de regulación de la expresión genética. (Jacob y Monod, 1961).

Los microRNAs son RNAs no codificantes, de 20-30 nucleótidos de longitud, producidos por todos los organismos eucariotas. Los microRNAs se identificaron por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993) mientras se estudiaban mutantes con defectos del desarrollo. En las plantas, las primeras descripciones de microRNAs mostraron evidencia de su papel fundamental en la regulación de diversos aspectos del desarrollo, como la morfogénesis de las hojas, el desarrollo vascular y la identidad de los órganos florales (Reinhart *et al.*, 2002).

Cuando se elimina la función de microRNAs se revela la diversidad de papeles que estos elementos realizan. Por ejemplo, al eliminar la función de miR164 en *Arabidopsis*, las plantas muestran patrones alterados en la morfología del margen de las hojas (Nikovics *et al.*, 2006). En otro ejemplo, la eliminación de la función de miR160, que tiene como genes blanco a un grupo de factores de transcripción de respuesta a auxinas, altera

dramáticamente la morfología de las hojas y el desarrollo de los órganos florales (Mallory *et al.*, 2005). En el caso de animales, las alteraciones en la maquinaria de procesamiento de los microRNAs y del reconocimiento adecuado de sus genes blanco, se han relacionado directamente con el desarrollo del cáncer en humanos (Farazi *et al.*, 2013), entre otros procesos de interés médico.

Con las evidencias obtenidas en modelos animales y vegetales, se sabe que la actividad de los microRNAs es determinante para el funcionamiento celular normal al formar parte de circuitos de regulación que permiten el control fino y preciso de la expresión genética, para satisfacer los requerimientos celulares. Además, algunos microRNAs pueden, incluso, funcionar dirigiendo rutas de diferenciación celular, dando con esto robustez a las respuestas celulares (Hayes *et al.*, 2014). La actividad de los microRNAs, además de ser determinante para el desarrollo, la morfología y el metabolismo, es fundamental en la respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico, en las cuales los microRNAs pueden actuar como interruptores para permitir a las células adaptarse a cambios transitorios o permanentes en su ambiente (Jeong y Green, 2013; Kumar, 2014).

2.3 Biogénesis y mecanismos de acción de los microRNAs

Los microRNAs pertenecen a un grupo diverso de RNAs pequeños, entre los que se encuentran los RNAs trans-acting (tasi-RNAs), los RNAs natural antisentido (natsi-RNAs) y los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), entre otros. Los microRNAs se distinguen del resto de RNAs pequeños por su mecanismo de biogénesis, ya que son los únicos que se generan a partir de un RNA que se pliega sobre sí mismo para formar una estructura del tipo tallo-asa, también conocida como estructura de horquilla (Khraiwesh *et al.*, 2012) (Fig. 3). Esta estructura de horquilla es reconocida por DICER-LIKE 1 (DCL1) (Papp *et al.*, 2003), una proteína que junto a HYL1 actúa sobre la horquilla para cortarla y producir RNAs pequeños de cadena doble (Fig. 3). Los RNAs dúplex generados se metilan por la actividad de la enzima HEN1 para ser exportados del núcleo hacia el citoplasma mediante

el transportador HASTY1 (HST1) (Park *et al.*, 2005). En el citoplasma, una de las cadenas, llamada microRNA maduro, es reconocida por la proteína ARGONAUTA1 (AGO1), que lo acompaña para encontrarse con el complejo RISC (Fig. 3). El complejo formado por el microRNA maduro, AGO1 y RISC tiene la función de reconocer un transcrito blanco, al cual se une el microRNA por complementariedad casi perfecta de su secuencia de bases (Dalmay, 2006; Jones-Rhoades *et al.*, 2006).

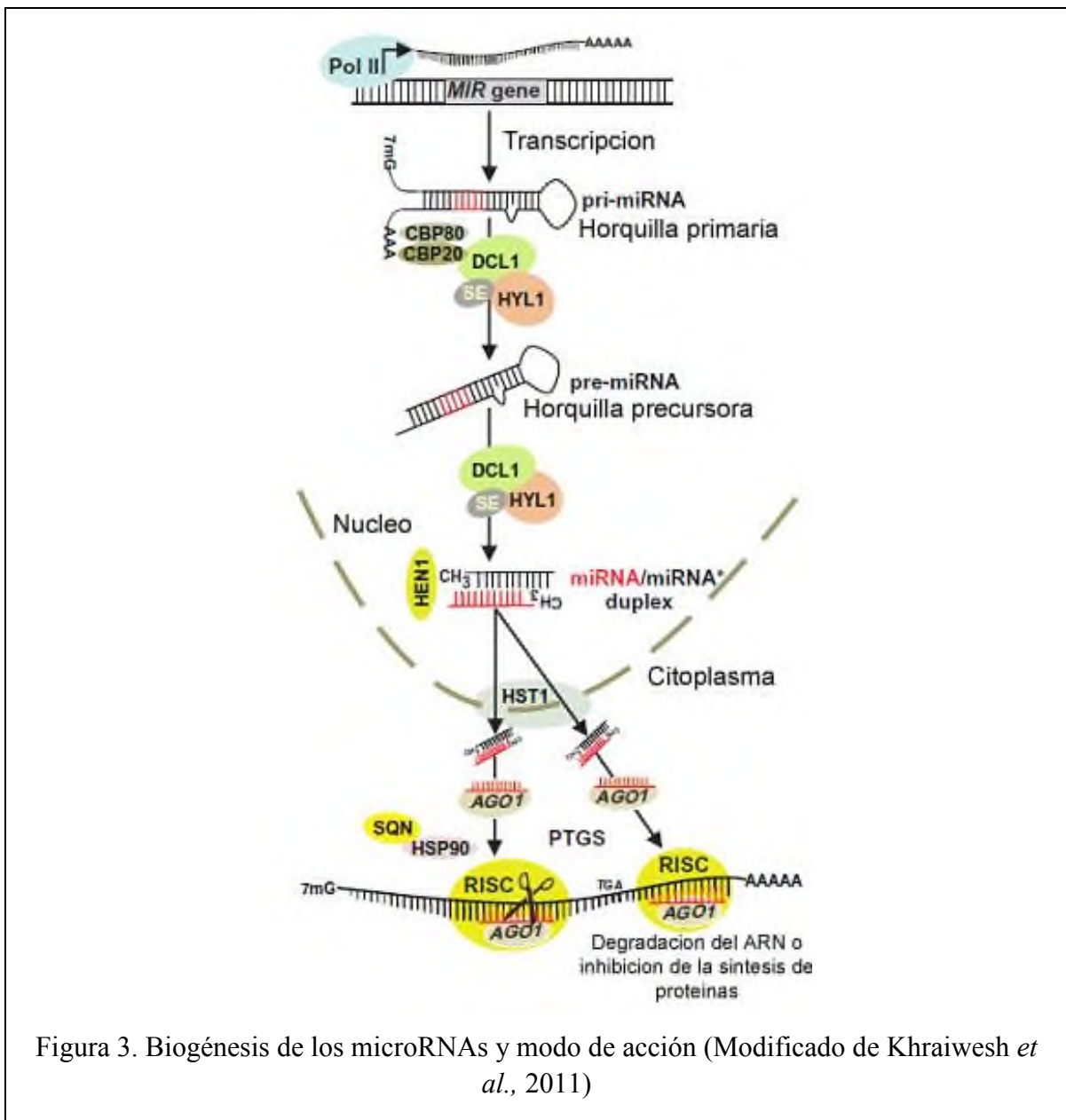


Figura 3. Biogénesis de los microRNAs y modo de acción (Modificado de Khraiwesh *et al.*, 2011)

Cuando el microRNA maduro se une al gen o transcrito blanco, lo marca para llevar a cabo su degradación (Llave *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002) o para inhibir su traducción (Chen, 2004; Brodersen *et al.*, 2008) (Fig 4).

De esta forma, cuando un microRNA se acumula se espera que la expresión de su gen o genes blanco se reprima; y cuando un microRNA disminuye su expresión, se espera que su(s) transcrito(s) blanco se acumulen.

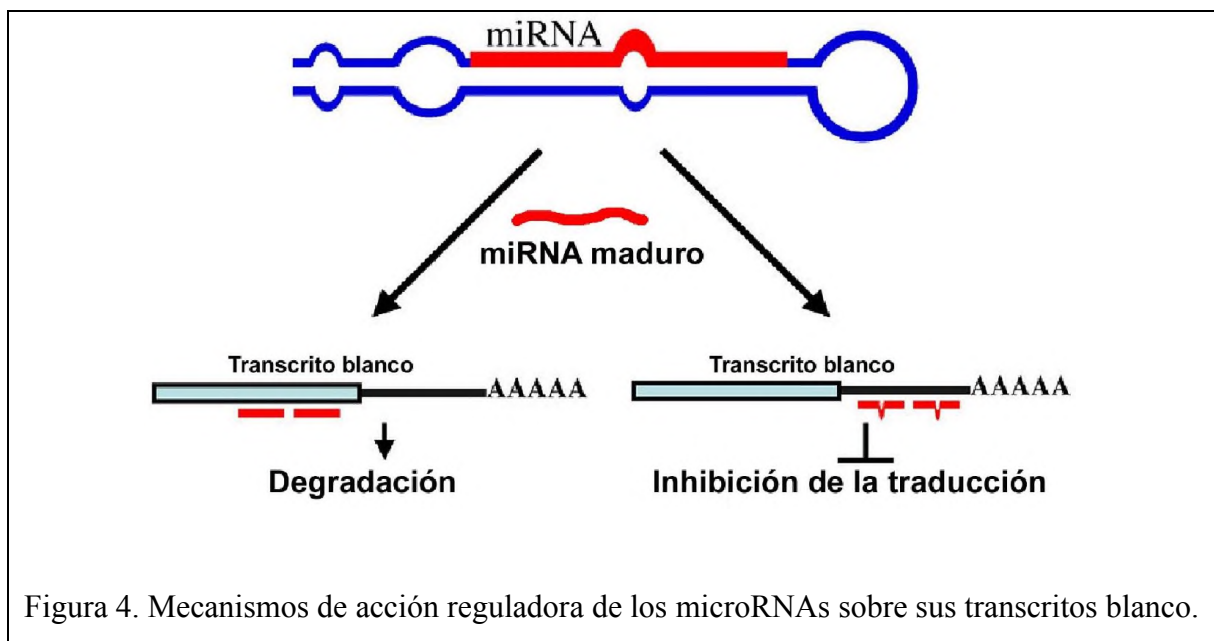


Figura 4. Mecanismos de acción reguladora de los microRNAs sobre sus transcritos blanco.

2.4 Herramientas para el estudio de los microRNAs

El estudio de los microRNAs en modelos vegetales y animales se ha intensificado en los últimos años con el surgimiento de nuevas herramientas de identificación y descubrimiento. En general, existen tres estrategias básicas para abordar el estudio de los microRNAs: bioinformática, basada en hibridación y secuenciación directa.

2.4.1 Estrategia bioinformática

Esta estrategia está basada en la búsqueda de homología de microRNAs conservados entre especies relacionadas. Para esto, los microRNAs de una especie conocida se usan para buscar en el genoma, o en bases de datos de RNA de la especie en estudio, secuencias de microRNAs que coincidan con el microRNA conocido (Bonnet *et al.*, 2004; Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Wang *et al.*, 2004). Es probable que una vez que se obtiene una coincidencia, ésta no sea perfecta, pero es posible asignar un valor de penalidad. Generalmente se establece como máximo la variación de 2 bases. Aunque esta estrategia es rápida, no es útil para el descubrimiento de nuevos microRNAs, ya que se limita a reconocer únicamente aquellos que ya han sido identificados en la especie de referencia.

La identificación de microRNAs también puede realizarse *de novo*. En esta modalidad de la estrategia bioinformática se toma ventaja de las características estructurales de los genes que codifican microRNAs. Para esto, se identifican en el genoma bajo estudio todas las secuencias con potencial de formar estructuras tallo-asa. Dado que las estructuras resultantes pueden ser numerosas, se delimitan criterios tales como el número de bases desapareadas, o la longitud del asa, para seleccionar a los que cumplan con las características de los microRNAs reales. Esta estrategia es predictiva y permite identificar microRNAs candidatos potenciales por ejemplo el descubrimiento del microRNA 169 a través de esta técnica (Calviño y Messing 2013, Jeon *et al.*, 2013).

Existe otra estrategia basada en el hecho de que los microRNAs pueden reconocer una región de su gen blanco, a la cual se complementan. En plantas esta complementación es casi perfecta, lo que facilita la aplicación de esta estrategia (Rhoades *et al.*, 2002). Primero se detecta una complementación entre una región intergénica y la de un transcrito codificante de proteína, y luego se expande la región complementada para evaluar las características de los genes de microRNAs (Adai *et al.*, 2005; Lindow and Krogh, 2005). Si la región forma la estructura tallo-asa, entonces se considera que se trata de un microRNA potencial.

Cabe señalar que las estrategias descritas son útiles para la identificación de microRNAs, pero no están diseñadas para facilitar la asignación funcional de los microRNAs, ya que no permiten conocer los patrones de acumulación de los microRNAs, y por lo tanto no es posible asociarlos directamente a algún proceso biológico de interés.

2.4.2 Estrategia basada en hibridación

La hibridación de los ácidos nucleicos como estrategia de estudio ha permitido la identificación y caracterización de un gran número de microRNAs. Históricamente, la técnica *de oro* en la investigación de los microRNAs es el Northern blot (Sunkar y Zhu, 2004). El Northern blot se basa en el reconocimiento de una secuencia de RNA en una muestra cuando se pone en contacto con una sonda complementaria marcada. La sonda marcada se une por complementariedad de bases y de esta forma deja evidencia de la presencia y abundancia (cualitativa) de dicha secuencia en la muestra original. El Northern blot es útil cuando se desea investigar la expresión o acumulación de microRNAs individuales, pero no está diseñado para facilitar el descubrimiento de microRNAs en forma global o masiva.

Existen estrategias basadas en hibridación que amplían las posibilidades del Northern blot. La más importante es la tecnología de los microarreglos, en las que se multiplican las reacciones de hibridación de microRNAs individuales que se realizan en un Northern blot. Para esto, en una laminilla se inmovilizan secuencias de microRNAs conocidas, las cuales se colocan en orden y quedan expuestas para hibridarse. A cada ubicación en la laminilla le corresponde un microRNA de identidad conocida. Enseguida, la muestra problema se marca para hibridarse con las secuencias en el microarreglo. Una vez que ha sucedido la hibridación, se remueven las secuencias que no se hibridaron y se analizan los puntos donde se obtiene señal, asociando la identidad del microRNA, y por lo tanto, su presencia en la muestra bajo estudio (Liu *et al.*, 2008).

Con la tecnología de microarreglos es posible además comparar la presencia y abundancia de un gran conjunto de microRNAs en dos muestras contrastantes, por ejemplo, un organismo bajo condiciones normales y un organismo bajo algún tipo de estrés. La comparación de la intensidad de las señales en cada uno de los puntos del microarreglo permite identificar aquellos microRNAs que se acumulan (se activan) o se reprimen (se apagan) en alguna de las muestras, y de esta manera es posible asociar los cambios de abundancia de los microRNAs al proceso biológico en estudio (Liu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2010; Valdés-López *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Kantar *et al.*, 2011).

A pesar de las ventajas que ofrecen los microarreglos, su desventaja principal es que la identificación de microRNAs está limitada a las secuencias que se encuentran inmovilizadas en la laminilla, por lo que no es útil para el descubrimiento de nuevos microRNAs.

2.4.3 Estrategia de secuenciación directa

La secuenciación directa de microRNAs ha sido el método por excelencia para el descubrimiento de los microRNAs ya que permite tener evidencia experimental de la existencia de las secuencias maduras en una muestra. El procedimiento básico implica la construcción de bibliotecas de microRNAs adecuadas para la clonación y/o secuenciación. Para esto, la población de RNAs pequeños presentes en una muestra se separan selectivamente por su tamaño pequeño y enseguida se ligan a adaptadores de secuencia conocida en ambos extremos. Los productos ligados se emplean después para generar cDNA mediante transcripción reversa y posteriormente para amplificarse mediante la PCR. Después de esto, los productos se purifican y se clonan en células bacterianas para facilitar la secuenciación individual de RNAs pequeños, o bien, se secuencian directamente sin necesidad de la clonación. Una vez que se obtienen las secuencias, los RNAs pequeños se mapean al genoma de referencia y se examina la estructura secundaria de sus RNAs precursores, entre otros análisis (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011).

Las bibliotecas de RNAs pequeños son útiles para secuenciar individualmente cada microRNA o para realizar secuenciación masiva (de la población completa de RNAs pequeños). Los trabajos pioneros en la identificación de microRNAs se basaron en la secuenciación de microRNAs individuales mediante secuenciación capilar, también conocido como el método de Sanger (Sunkar y Zhu, 2004). Sin embargo, este método de secuenciación es caro y exige un gran número de muestras secuenciadas para cubrir la población de microRNAs presentes en la muestra original y para representar la diversidad de abundancias individuales.

Para superar las limitaciones de este método de secuenciación, surgieron técnicas como la secuenciación MPSS (Secuenciación Paralela Masiva) y la pirosecuenciación 454. Ambas se conocen como tecnologías de alto alcance (high-throughput sequencing, en inglés). Con estas metodologías se han secuenciado gran diversidad de microRNAs (Lu *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Rajagopalan *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Nobuta *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2008a; Sunkar and Jagadeeswaran, 2008; Sunkar *et al.*, 2008).

Para aumentar aún más la cobertura de la secuenciación, surgió otro tipo de secuenciación de alto alcance: la secuenciación por síntesis (SBS, Sequencing-by-Synthesis), dirigida por la empresa Illumina (antes Solexa). La plataforma Illumina se ha ido perfeccionando y ha aumentado la capacidad de secuenciación. En sus inicios, lograba obtener alrededor de 10 millones de secuencias en una línea. Ahora puede leer de 150 a 200 millones de secuencias por línea (Peña-Castro *et al.*, 2013). Así, proporciona una cobertura superior a las otras técnicas, lo que se traduce en la capacidad de secuenciar la diversidad de abundancias de RNAs pequeños presentes en una muestra, desde las más abundantes hasta las de menor abundancia, además de que disminuye los costos.

2.4.3.1 Construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para secuenciación de alto alcance

A la par que se perfeccionaron los instrumentos para la secuenciación de alto alcance, los protocolos para la construcción de bibliotecas se modificaron para aumentar su eficiencia y

para reducir la cantidad de productos de ligación no deseados, como los RNA pequeños ligados en tándem o la ligación preferencial adaptador-adaptador (Fig. 5). Para evitar la formación de productos de RNA en tándem, las primeras bibliotecas de RNAs pequeños requerían protocolos laboriosos que incluían la defosforilación y la fosforilación de los RNAs pequeños (Sunkar y Zhu, 2004).

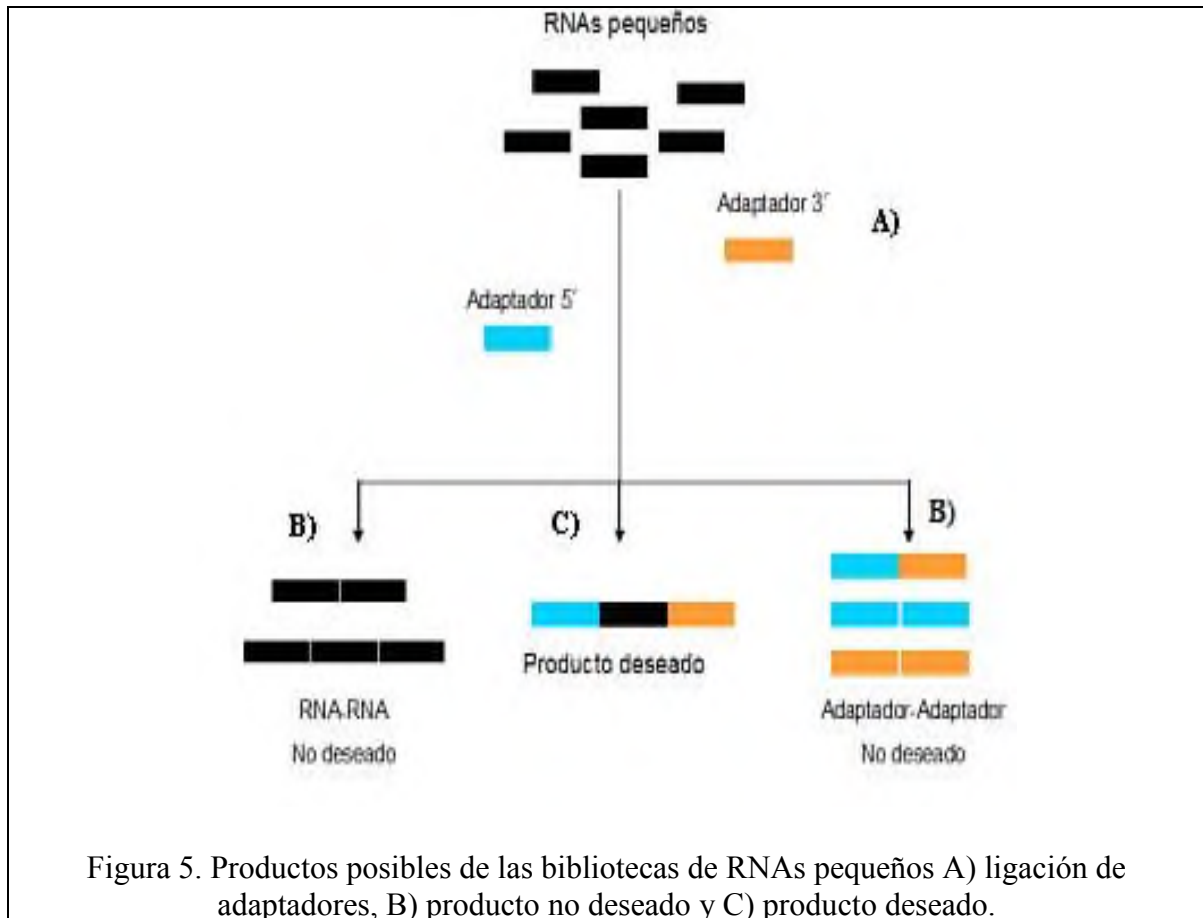
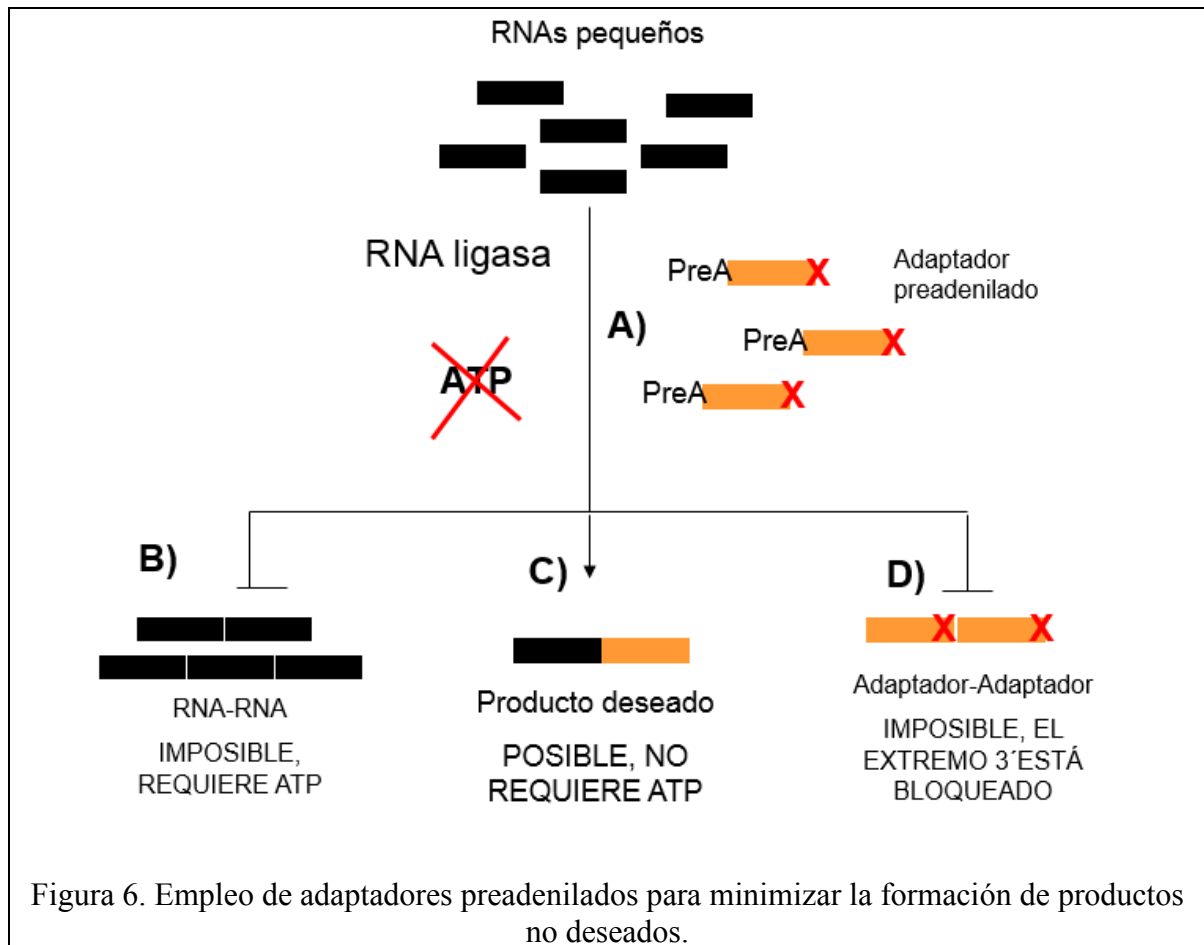


Figura 5. Productos posibles de las bibliotecas de RNAs pequeños A) ligación de adaptadores, B) producto no deseado y C) producto deseado.

Una de las modificaciones más efectivas es el uso de adaptadores preadenilados (Ghildiyal *et al.*, 2008). La preadenilación permite la ligación del adaptador en ausencia de ATP (Fig. 6A). Sin el ATP, el extremo 5' fosfato de los RNAs pequeños no puede ligarse con otros RNAs, y por lo tanto no se obtienen productos de RNAs en tándem (Fig. 6B). Dado que el extremo 3' de los adaptadores está bloqueado, tampoco se puede formar productos

adaptador-adaptador en tándem (Fig. 6D). Solo se ligarán las moléculas que estén preadeniladas en el extremo 5' (Fig. 6C).



Para eliminar la formación de productos de ligación preferencial entre adaptadores, se modifica el extremo 3' del adaptador 3', por ejemplo, con un grupo desoxitimidina invertida, para que no contenga un grupo hidroxilo disponible para autoligarse (Lau *et al.*, 2001; Park and Fire, 2007). Adicionalmente, la formación de productos de ligación entre adaptadores se puede reducir significativamente realizando purificaciones en gel (PAGE) después de cada paso de ligación para eliminar moléculas de adaptador residual (Lu *et al.*, 2007) (Figs. 6 y 7).

Aunque el protocolo que incorpora purificaciones PAGE después de cada ligación ha producido bibliotecas de alta calidad para secuenciación, es laborioso y consta de varios pasos de manipulación del RNA que pueden exponerlo a la degradación, además de que

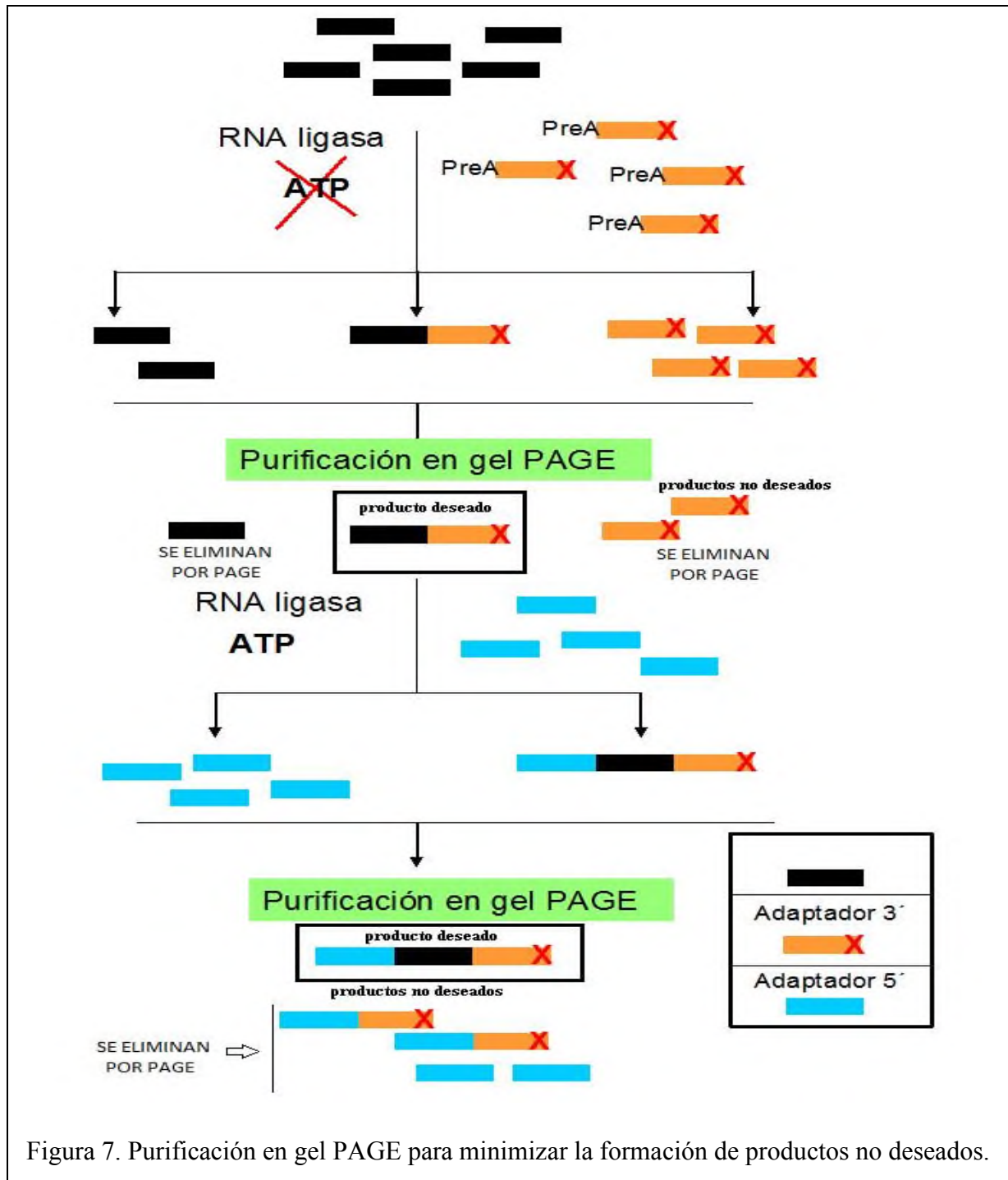


Figura 7. Purificación en gel PAGE para minimizar la formación de productos no deseados.

requiere al menos 3 días para finalizarse (Lu *et al.*, 2007). Por lo anterior, actualmente los protocolos de construcción de bibliotecas hacen uso de diversas técnicas para limitar la presencia de productos adaptador-adaptador, pero evitando la purificación en gel PAGE, ya que es el paso que más tiempo consume. Illumina desarrolló un método para disminuir la presencia de productos adaptador-adaptador empleando una sonda que captura el adaptador 3' residual de la primera reacción de ligación. Con el uso de la sonda, el adaptador 3' ya no puede ligarse al adaptador 5' en la segunda reacción de ligación, y con esto ya no es necesaria la purificación en gel. En la Fig. 8 se presenta gráficamente el protocolo de Illumina. Otras compañías han implementado un sistema para eliminar el adaptador residual de las ligaciones con el uso de partículas magnéticas (BiooScientific, 2014).

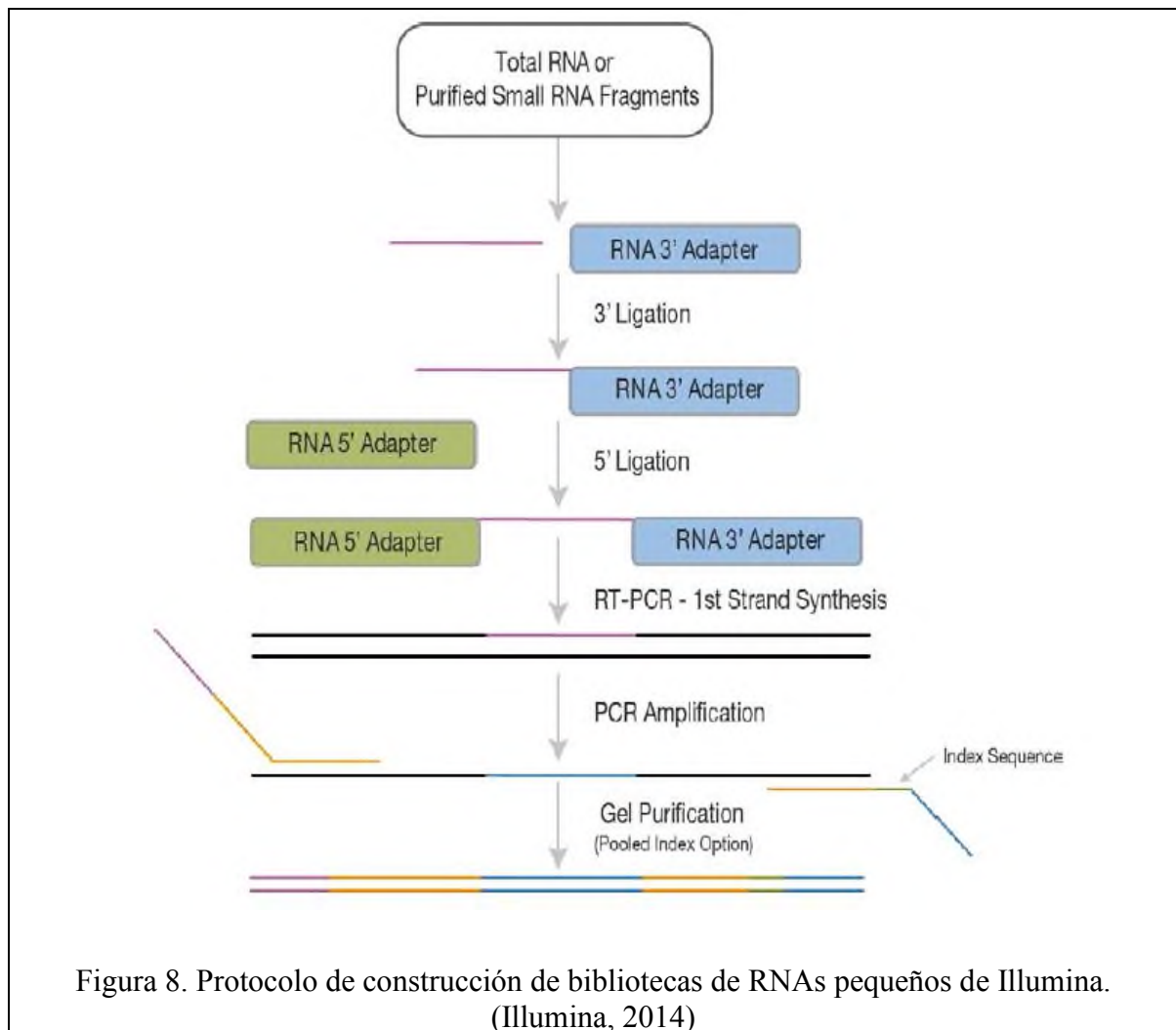


Figura 8. Protocolo de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños de Illumina. (Illumina, 2014)

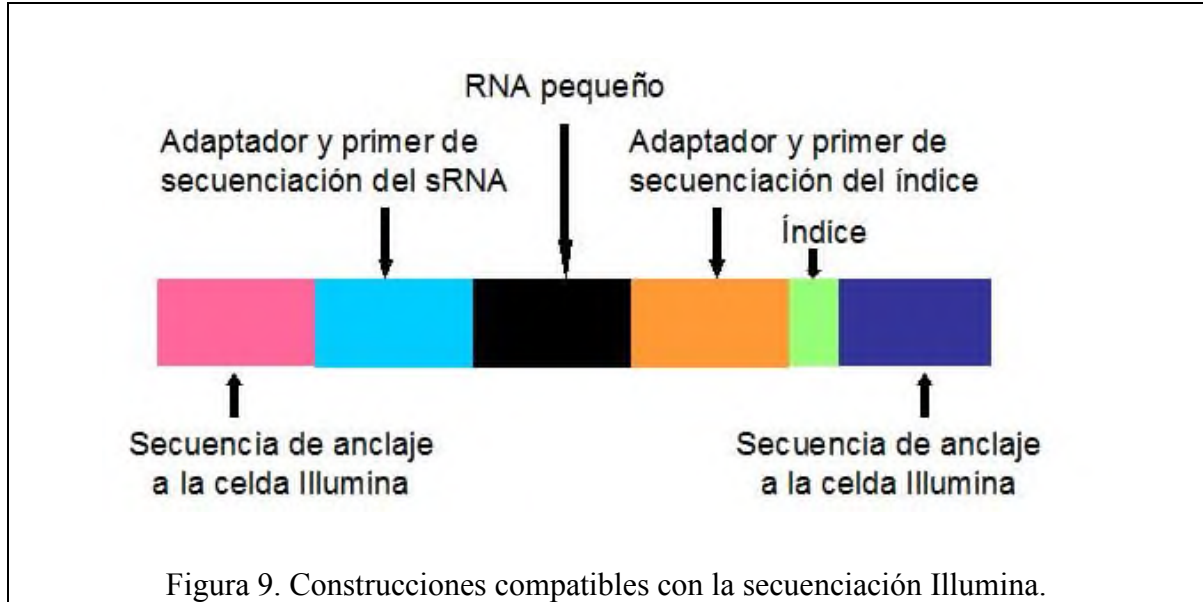
Otro avance importante en la construcción de bibliotecas es la posibilidad de incorporar índices o códigos en la secuencia de los productos. Estos índices constan de 6 bases y permiten mezclar varias bibliotecas con diferentes índices, de tal forma que pueden secuenciarse en una misma línea y una vez obtenidas las secuencias, la lectura del índice sirve para conocer cuál es la muestra de origen (Illumina, 2015) (Fig. 8). Así, por ejemplo, el rendimiento de una línea de 120 millones puede servir para 6 bibliotecas, obteniendo alrededor de 20 millones de secuencias por muestra, lo cual es suficiente para alcanzar un buen nivel de cobertura de la población de RNAs pequeños.

El desarrollo de protocolos de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños también se ha dirigido en el sentido de disminuir la cantidad de muestra de RNA inicial requerida. Actualmente, el protocolo más directo de Illumina que no requiere realizar purificación PAGE para separar los RNAs pequeños, ni para eliminar los adaptadores residuales de las reacciones de ligación, está optimizado para usar 1µg de RNA total como material inicial, mientras que los protocolos que incluyen purificaciones PAGE requieren de 200 µg a 400µg de RNA total debido a que en cada purificación ocurren pérdidas de magnitud variable.

Aunque los protocolos de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños se han mejorado sustancialmente en los últimos años, existen aspectos que requieren perfeccionamiento. Recientemente se ha propuesto que los métodos existentes para construir bibliotecas no toman en cuenta el hecho de que las reacciones de ligación tienen un sesgo preferencial para ligar ciertos tipos de RNAs pequeños. La preferencia de RNAs pequeños podría crear una representación falsa de las abundancias relativas de los microRNAs en una muestra bajo estudio (Sorefan *et al.*, 2012). Las mejoras en la eficiencia de la clonación de microRNAs está en función de la secuencia, estructura y concentración de los adaptadores, el uso de aglomerantes como el PEG8000 y la temperatura de ligación (Zhang *et al.*, 2013).

Independientemente del método que se emplee para la construcción de las bibliotecas, es importante considerar que las construcciones finales deben contener las secuencias adecuadas para que pueda llevarse a cabo la secuenciación en la plataforma Illumina. En la

Fig. 9 se presenta el diseño que deben tener las construcciones para ser compatibles con la secuenciación Illumina.



2.5 La sequía

La sequía es la condición meteorológica que se define como un intervalo de duración variable en el que la cantidad de humedad es relativamente más baja de lo esperado (Palmer, 1965). Las definiciones más actuales de la sequía se refieren específicamente a un desastre natural que no presenta una forma definida y que se propaga de manera irregular (Ramírez y Brenes, 2002).

La sequía es un problema a nivel mundial que se ha agravado en los últimos años como consecuencia del calentamiento global. Los modelos predictivos del comportamiento no ofrecen esperanza de que las sequías se estabilicen. Las predicciones indican que ocurrirán incrementos en su duración y severidad en el futuro, aún en el caso de que se controlasen las emisiones de gases de invernadero, debido a la acumulación que ya existe de éstos (Justin y Wood, 2008). En la Fig. 10 se muestra un mapa de la sequía en el mundo.

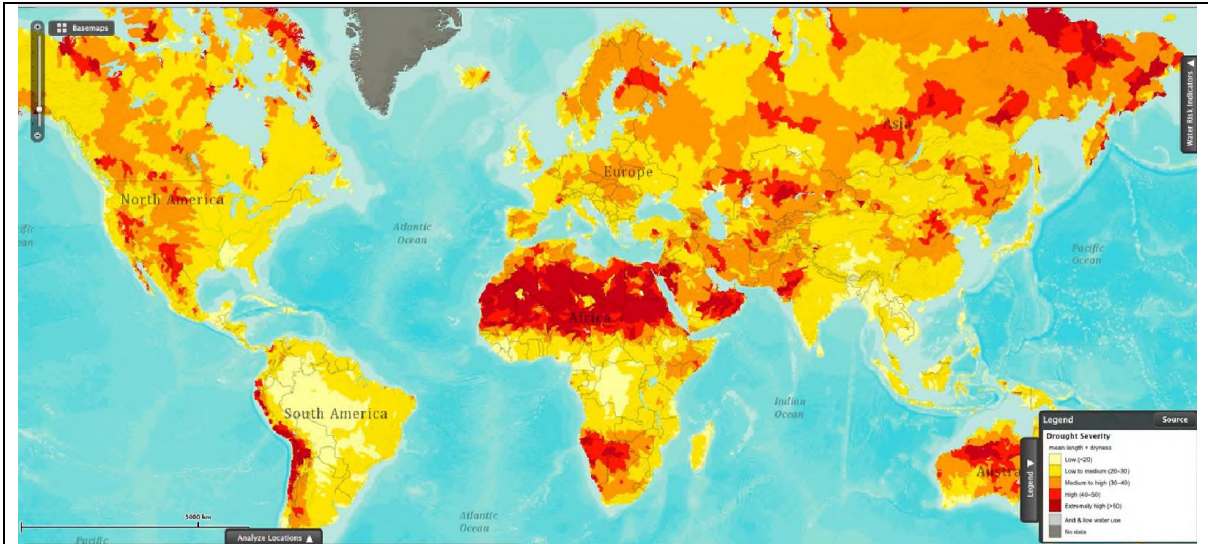


Figura 10. Distribución y severidad de la sequía en el mundo (AQUEDUCT, 2015)

En México, la sequía se ha presentado con severidad en los estados del centro y norte del país. En las Figs. 11 y 12 puede observarse la distribución y magnitud de la sequía que en el año 2011 y principios de 2012 causó en México pérdidas económicas históricas.

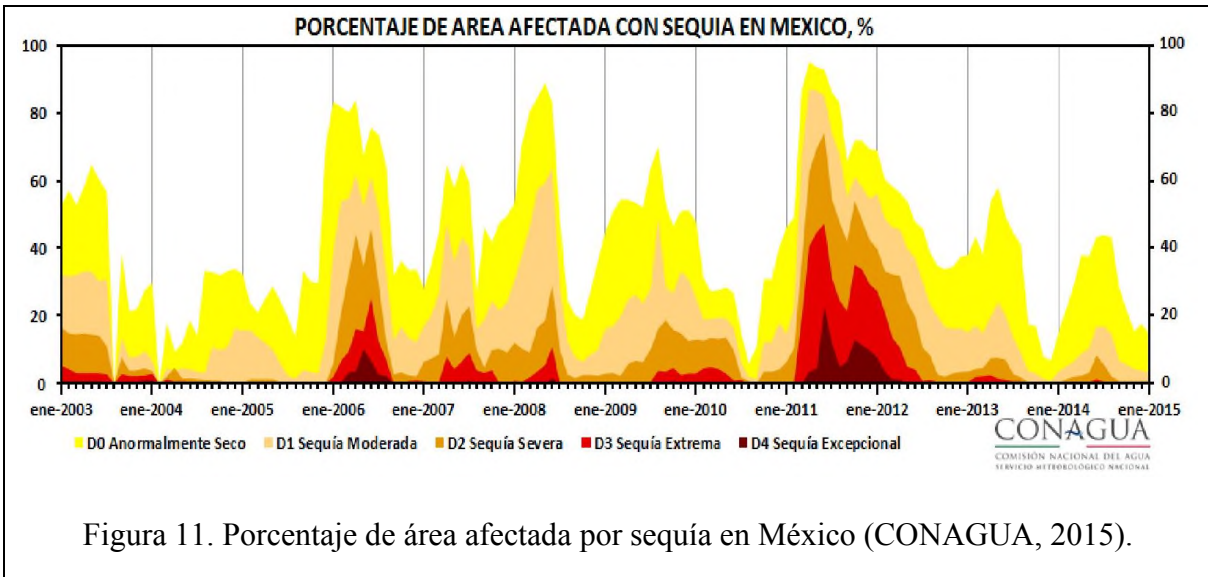


Figura 11. Porcentaje de área afectada por sequía en México (CONAGUA, 2015).

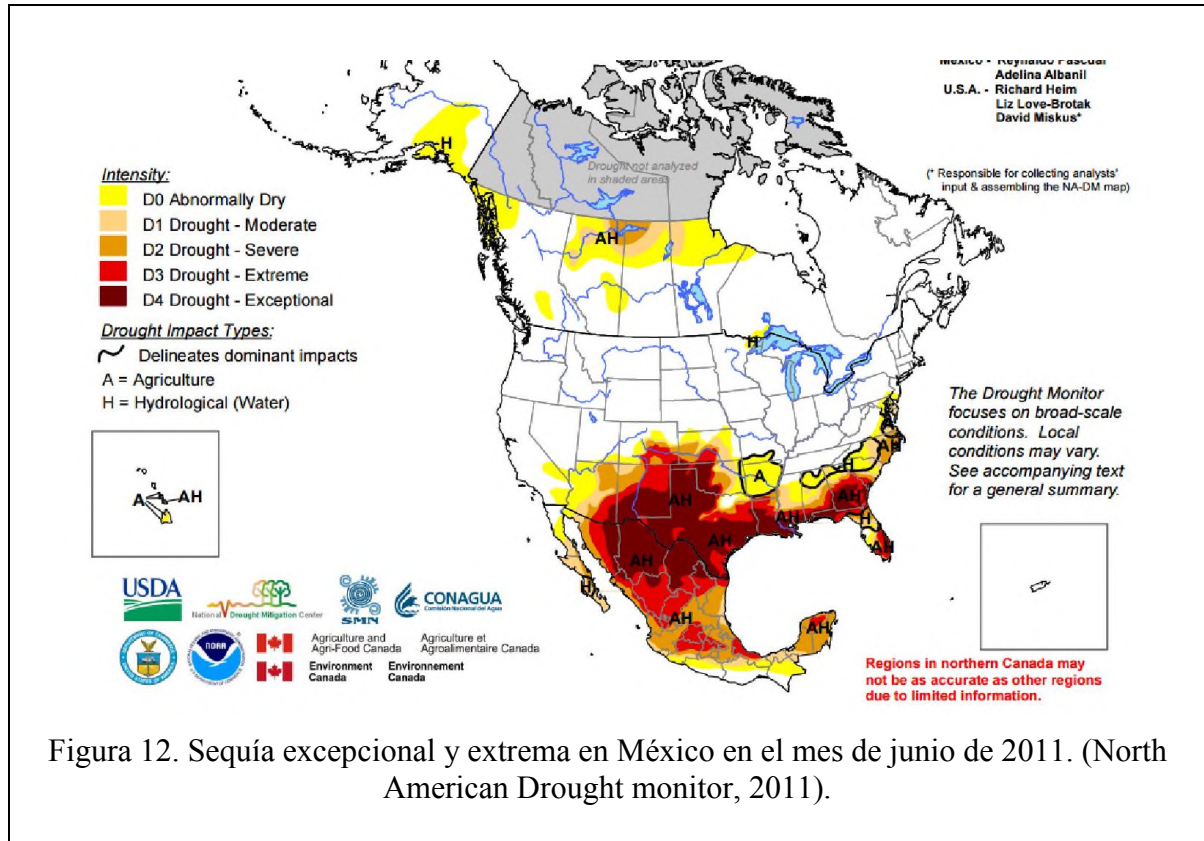


Figura 12. Sequía excepcional y extrema en México en el mes de junio de 2011. (North American Drought monitor, 2011).

La agricultura es el sector productivo más afectado por la sequía. La sequía ocasiona pérdidas económicas severas que afectan directamente al sector de la población que se dedica a la agricultura y que depende de la lluvia y de su periodicidad para irrigar sus campos de cultivo. Además, las pérdidas por la baja productividad de las cosechas traen consigo el paro en la producción industrial relacionada directamente con la agricultura o que emplean a las plantas como materia prima (Kumar y Yalew, 2012). Los efectos de la sequía llegan a su máximo alcance cuando las pérdidas en los cultivos ponen en riesgo la seguridad alimentaria del país, al no producir la cantidad suficiente de alimentos para satisfacer las necesidades de la población. La sequía es, por lo tanto, un catalizador de desequilibrio político, social y económico.

2.6 Las plantas y la sequía

Al ser organismos sésiles, las plantas están expuestas a la sequía y otras condiciones adversas en el ambiente en que crecen. La disminución en la disponibilidad del agua en el suelo provoca déficit hídrico a nivel celular. El déficit hídrico afecta las relaciones de agua de tejidos y órganos causando reacciones específicas e inespecíficas, daños y reacciones de adaptación (Beck *et al.*, 2007). La sequía por un lado produce múltiples efectos tales como la reducción severa de la germinación, (Kaya *et al.*, 2006), el crecimiento de la planta, y la reducción en el tamaño y número de hojas, lo cual reduce en gran medida la tasa fotosintética (Barrios *et al.*, 1998, Fricke *et al.*, 2006). También se presenta la senescencia prematura de las hojas y reducción de la productividad (Farooq *et al.*, 2008). Otros efectos de la sequía se presentan a través de síntomas como el marchitamiento, el enrollamiento de las hojas, el amarillamiento, baja estatura, alteraciones en el tiempo a floración y poca o nula producción de semillas y frutos (Barrios *et al.*, 1998).

2.7 Mecanismos de respuesta a la sequía

Las plantas responden al estrés a través de varias líneas de respuesta. Por ejemplo, una línea de respuesta es el alargamiento de las raíces. Cuando la sequía provoca que las capas superficiales del suelo se sequen primero, las plantas pueden modificar su sistema de raíces para crecer hacia la profundidad del suelo húmedo y con ello captar más agua (Kavar *et al.*, 2007).

Otra línea de defensa importante ante el estrés por sequía es el cierre de estomas. Los estomas están formados por dos células que forman poros en la superficie de las hojas y que funcionan mediante el suministro y pérdida de agua, lo que cambia la turgencia, y en consecuencia, modulan la apertura entre las dos células para limitar la pérdida de agua por evapotranspiración (Taiz y Zeiger, 2010). El cierre de estomas está regulado por el ácido abscísico (ABA). Esta hormona vegetal tiene además gran influencia como señalizadora en

otros procesos a nivel bioquímico y molecular en la respuesta a sequía, así como en otros tipos de estrés abiótico, por lo que se le conoce como la hormona del estrés (Tuteja, 2007).

Una tercera línea de defensa ante el estrés es el ajuste osmótico. Esta respuesta consiste en la acumulación de sustancias osmóticamente activas para regular el potencial osmótico en forma tal que el agua residual continúe su movimiento del suelo hacia la planta y se logre extraer toda la humedad del suelo (Liu *et al.*, 2004). De entre los osmólitos más importantes que participan en el ajuste osmótico se encuentra la prolina (Alexieva *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2005) y la glicinbetaína (Quan *et al.*, 2004). Adicionalmente, las plantas bajo estrés hídrico tienden a cambiar su tasa de crecimiento controlando procesos importantes en la pared celular, la síntesis de membrana, la división celular y la síntesis de proteínas (Bursens *et al.*, 2000).

El conjunto de mecanismos de respuesta que las plantas desarrollan para sobrellevar el estrés puede clasificarse en tres tipos básicos: 1) La evasión, que se presenta en plantas que son capaces de almacenar agua en sus tejidos, de tal forma que no experimentan déficit hídrico, 2) el escape, presente en plantas que pueden acelerar su ciclo de vida, generalmente adelantando la floración y la producción de frutos y semillas, antes de que la sequía ocasione daños irreversibles, y 3) la tolerancia, que depende principalmente de la activación de las líneas de defensa descritas en los párrafos anteriores (Kramer, 1983).

2.7.1 Respuesta molecular a la sequía

Todos los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren en las plantas para responder al estrés están regulados al nivel molecular, a través de los componentes del flujo de la información genética (Fig. 1). Estos ajustes pueden seguir dos direcciones: 1) la inducción, para activar funciones de respuesta necesarias para evadir, escapar o tolerar el estrés, y 2) la represión, para limitar o anular procesos que no son necesarios para la supervivencia de la planta en las condiciones de estrés.

Los estudios de la respuesta molecular a la sequía han revelado que un gran número de genes inducen su expresión y tienen funciones en la percepción de las señales de estrés y su transducción, el metabolismo, la regulación de la expresión, la síntesis de osmolitos, la protección contra radicales reactivos de oxígeno, la síntesis de hormonas, el transporte de agua y la protección directa de proteínas y estructuras celulares, entre otras (Seki *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2004, Barrera-Figueroa *et al.*, 2007). Un ejemplo de genes inducidos por la sequía, son los que codifican proteínas LEA (Late Embriogenesis Abundant) (Barrera-Figueroa *et al.*, 2007). Estas proteínas son hidrofílicas y se ha sugerido que podrían funcionar para proteger otras proteínas y estructuras celulares de la desecación estableciendo un escudo de hidratación (Chakrabortee *et al.*, 2007). Otro mecanismo de protección son las proteínas de choque térmico (HSP) que evitan la desnaturalización de otras proteínas en condiciones de estrés.

También se ha observado la inducción de proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa (Apel y Hirt, 2004), cuya función es detoxificar de radicales libres que se producen como consecuencia del estrés (Bohnert y Sheveleva, 1998). Las acuaporinas son un otro ejemplo de proteínas que se regulan por sequía y controlan el flujo de agua a través de la membrana plasmática (Johansson *et al.*, 2000), jugando así un papel crítico en los mecanismos para ajustar el balance de agua en el interior de las células (Maurel y Chrispeels, 2001).

2.8 Los microRNAs en la respuesta a la sequía y su influencia en el desarrollo

La sequía no sólo produce la alteración de la expresión a nivel de transcritos y proteínas. En 2004, el trabajo pionero de Sunkar y Zhu reportó la participación de microRNAs en la regulación de la expresión génica en *Arabidopsis thaliana* bajo estrés abiótico y ácido abscísico exógeno, asociando la acumulación de varios miRNAs a la respuesta (Sunkar y Zhu, 2004). Desde entonces, se ha demostrado en diversos estudios que un gran número de microRNAs se inducen por sequía, por ejemplo, miR168, miR171, miR396, miR156 y miR394 (Liu *et al.*, 2008). En la Tabla 1 se enlistan algunos miRNAs de respuesta a sequía en plantas.

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

microRNA	Organismo	Gen blanco	Referencia
Inducidos			
miR157	<i>A. thaliana</i>	SBP-LIKE	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR167	<i>A. thaliana</i>	ARF	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR168	<i>A. thaliana</i>	AGO	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR169	<i>O. sativa</i>	MtHAP2-1	Zhao <i>et al.</i> , 2007
miR171	<i>A. thaliana</i>	SCL	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR319/159	<i>A. thaliana</i>	TCP/MYB	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	Sunkar <i>et al.</i> , 2004; Zhao <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2008; Arenas-Huertero <i>et al.</i> , 2009.
miR396	<i>A. thaliana</i>	GRF	Liu <i>et al.</i> , 2008
miR397	<i>A. thaliana</i> , <i>Saccharum spp.</i>	LAC	Sunkar <i>et al.</i> , 2004; Ferreira <i>et al.</i> , 2012
miR398	<i>M. truncatula</i>	CSD	Trindade <i>et al.</i> , 2010
miR408	<i>A. thaliana</i> , <i>M. truncatula</i>	PC	Trindade <i>et al.</i> , 2010
miR2118	<i>P. vulgaris</i>	U170K-related	Arenas-Huertero <i>et al.</i> , 2009
miR159.2	<i>P. vulgaris</i>	Chlatrin heavy chain	Arenas-Huertero <i>et al.</i> , 2009
Reprimidos			
miR169	<i>A. thaliana</i> , <i>G. hirsutum</i>	NFY	Li <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2013
miR156	<i>O. sativa</i>	SBP-LIKE	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR168	<i>O. sativa</i>	AGO	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR172	<i>O. sativa</i>	AP2-LIKE	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR319	<i>O. sativa</i>	TCP	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR396	<i>O. sativa</i> , <i>P. persica</i>	GRF	Zhou <i>et al.</i> , 2010; Eldem <i>et al.</i> , 2012
miR397	<i>O. sativa</i>	LAC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR408	<i>O. sativa</i>	PC	Zhou <i>et al.</i> , 2010
miR1446 a-e	<i>P. trichocarpa</i>	GRML	Lu <i>et al.</i> , 2008
miR1447	<i>P. trichocarpa</i>	Ankyrin repeat	Lu <i>et al.</i> , 2008
miR1450	<i>P. trichocarpa</i>	L-RTMK	Lu <i>et al.</i> , 2008

La actividad de los microRNAs es importante en la respuesta a sequía ya que a través de su acumulación se modulan finamente los cambios que deben realizarse para que la planta se adapte a la condición adversa. La actividad de los microRNAs, al regular negativamente rutas genéticas que no son necesarias para la respuesta al estrés, apaga mecanismos no necesarios, conserva la energía y la redirige hacia la protección celular. Por lo tanto, uno de los aspectos biológicos críticos en la respuesta, es la actividad de los miRNAs que conlleva al control del desarrollo de las plantas. Por ejemplo, se ha observado que la sequía puede acelerar el tiempo a floración en *Arabidopsis* por la actividad de miR172 (Han *et al.*, 2013).

De hecho, es interesante que miR172 esté asociado a respuestas de estrés y el tiempo a floración (Aukerman y Sakai, 2003; Sunkar *et al.*, 2007). Quizás este sea el tipo de microRNAs que establecen vínculos de regulación de rutas de desarrollo ante factores ambientales adversos. Otro microRNA implicado dualmente en la respuesta al estrés y la regulación del desarrollo, es miR5200. Este miRNA tiene por gen blanco a *FLOWERING LOCUS T (FT)*, el cual es un promotor de la floración. Al disminuir la cantidad de *FT* en las células, la floración se atrasa (Jeong *et al.*, 2013).

2.9 Complejidad de la respuesta a estrés por sequía

La respuesta de las plantas a la sequía depende de interacciones y entrecruzamiento entre numerosas rutas moleculares, varias de éstas controladas por microRNAs (Knight y Knight, 2001). Dado que la respuesta de las plantas a la sequía es altamente compleja y dinámica, los últimos estudios dirigidos a identificar microRNAs de respuesta al estrés han empleado herramientas de análisis masivo, como los microarreglos y la secuenciación de alto alcance (Cramer *et al.*, 2011). La integración de la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica ha permitido ampliar y mejorar el entendimiento de las respuestas a la sequía. Sin embargo, aún se está lejos de descifrar completamente la complejidad de la respuesta a la sequía y el potencial funcional que los microRNAs representan en la respuesta.

La complejidad aumenta considerando que la respuesta a la sequía puede ser distinta en las diferentes etapas de vida de las plantas (vegetativa, reproductiva) en diferentes intensidades de estrés hídrico (leve o severo) y en diferente duración (corta o prolongada, estrés progresivo o crónico). Por lo anterior, es fácil predecir que existe un número infinito de posibilidades en la respuesta. Para comprender todas las posibilidades, es necesario abordar el estudio de la respuesta a la sequía en las distintas modalidades del estrés.

2.10 *Brachypodium distachyon* como planta modelo

Los sistemas modelo permiten el estudio de procesos biológicos pues al compartir características con otros sistemas que son de interés, facilitan el estudio de procesos complejos.

En plantas, un ejemplo claro de organismos modelo es la dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*, que desde hace más de 30 años ha demostrado versatilidad para abordar el estudio de fenómenos importantes como la floración, el desarrollo, la germinación, la respuesta hormonal y la respuesta al estrés, entre otros (Koornneef y Meinke, 2010). Si bien *Arabidopsis* ha sido útil para profundizar el conocimiento de la biología de las plantas, es necesario el estudio de sistemas modelo en monocotiledóneas para abordar la investigación de procesos biológicos complejos e identificar particularidades en éste tipo de plantas.

Dentro de las monocotiledóneas, las gramíneas proveen la gran mayoría de calorías en la dieta humana y son cada vez más utilizadas como fuentes de energía sustentable. Ejemplos de monocotiledóneas son el arroz, el maíz, el sorgo, la caña de azúcar y el trigo. Dentro de este grupo, el arroz ha sido útil como modelo; sin embargo, es una planta de gran tamaño, con un largo tiempo de generación y un genoma relativamente grande comparado con *Arabidopsis* (Jung *et al.*, 2008).

Como una alternativa al arroz, se propuso a *Brachypodium distachyon* en 2001 (Draper *et al.*, 2001). Una comparación con otras plantas reveló que los atributos de *Brachypodium* lo

hacen adecuado para considerarse como un sistema modelo. Al igual que *Arabidopsis*, *Brachypodium* tiene una pequeña estatura, tiempo de generación corto, genoma pequeño, la capacidad de autopolinización y es fácil de cultivar en condiciones simples (Draper *et al.*, 2001).

Por lo tanto, *Brachypodium* es un modelo útil para realizar estudios moleculares sobre la respuesta al estrés y el tiempo a floración en plantas monocotiledóneas, gracias a su ciclo de vida corto, el conocimiento de su genoma y su amplia diversidad de variantes naturales adaptadas a la sequía.

3. JUSTIFICACIÓN

En la última década, la aplicación de nuevas tecnologías de secuenciación de alto alcance ha acelerado la identificación y descubrimiento de genes implicados en procesos biológicos de interés en una gran variedad de plantas. A la par del desarrollo de los métodos de secuenciación, crece el interés por el estudio de moléculas de RNA pequeñas, llamadas microRNAs, involucradas en aspectos importantes de la vida de las plantas, como el desarrollo y la respuesta al estrés, por lo que la secuenciación de alto alcance se ha convertido en la ruta más directa hacia la identificación de este tipo de RNAs.

La secuenciación de alto alcance ha perfeccionado sus métodos para secuenciar múltiples muestras a gran profundidad (con alto número de lecturas). Sin embargo, el paso fundamental para secuenciar muestras complejas de RNAs pequeños es la preparación de las moléculas para que sea posible leerlas mediante síntesis, que es el principio en que se basa la secuenciación de alto alcance. Este proceso es conocido como construcción de bibliotecas, y es técnicamente laborioso, requiere la adquisición de kits o el pago por servicios de construcción de bibliotecas costosos. Por lo tanto, es necesario desarrollar un protocolo de construcción de bibliotecas que conste de pocos pasos, que pueda realizarse en corto tiempo, que sea técnica y financieramente accesible para un laboratorio de biología molecular básico, y que además sea reproducible y confiable.

Gracias al potencial que brinda la secuenciación masiva, ha sido posible analizar la expresión de los microRNAs en un gran número de plantas, demostrando que estos elementos regulan la expresión de las características fenotípicas, como las respuestas al estrés abiótico. En dichos procesos, los miRNAs desempeñan roles centrales en la regulación de la expresión de múltiples genes y rutas. Los microRNAs son, por lo tanto, candidatos ideales para manipular la forma en que las plantas responden al estrés y para mejorar la tolerancia a las condiciones ambientales desfavorables.

Una de las condiciones más adversas para los cultivos en el campo es la sequía. La sequía es el factor ambiental predominante que ocasiona pérdidas de productividad agrícola en

nuestro país. Entre las especies afectadas se encuentra el maíz, la caña de azúcar, el sorgo y el arroz, que son monocotiledóneas de gran importancia económica. Para estos cultivos, la sequía puede ser progresiva y llegar a niveles que la planta no puede tolerar, o bien, puede ocurrir a baja intensidad, pero mantenerse durante gran parte del ciclo de vida en un estado crónico, induciendo respuestas de adaptación.

Para profundizar en el conocimiento de la respuesta molecular a la sequía en plantas y la participación de los microRNAs en el proceso, es necesario identificar, mediante técnicas de secuenciación de alto alcance, a los microRNAs cuya expresión se regula por el estrés. De esta forma, será posible seleccionar microRNAs candidatos para el mejoramiento y selección de plantas capaces de hacer frente a las condiciones adversas de limitación de agua, asegurando así la productividad agrícola.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Es posible elaborar un nuevo protocolo de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños adecuadas para secuenciación de alto alcance, que simplifique los procedimientos y reduzca costos.

Hipótesis 2: *Brachypodium distachyon* es capaz de tolerar el tratamiento de estrés por sequía crónica a lo largo de su ciclo de vida completo, alterando la expresión de microRNAs y mostrando respuestas de plasticidad en el tiempo a floración.

5. OBJETIVO GENERAL

Elaborar un protocolo simple de construcción de bibliotecas de microRNAs pequeños y aplicarlo al estudio de microRNAs de respuesta a sequía crónica en tres etapas de desarrollo de *Brachypodium distachyon*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Modificar diversos pasos de los protocolos convencionales de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para reducir costos y tiempo de preparación, y minimizar la formación de productos secundarios no deseados.
2. Establecer un sistema experimental para la inducción de estrés por sequía crónica en *B. distachyon* Bd21.
3. Analizar los efectos fisiológicos de la sequía crónica en tres etapas de desarrollo de *B. distachyon*.
4. Realizar un análisis preliminar de la expresión de microRNAs selectos en *B. distachyon* bajo estrés por sequía crónica.
5. Construir bibliotecas de RNAs pequeños de *B. distachyon* Bd21 en condiciones control y de estrés por sequía crónica empleando el protocolo seleccionado.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

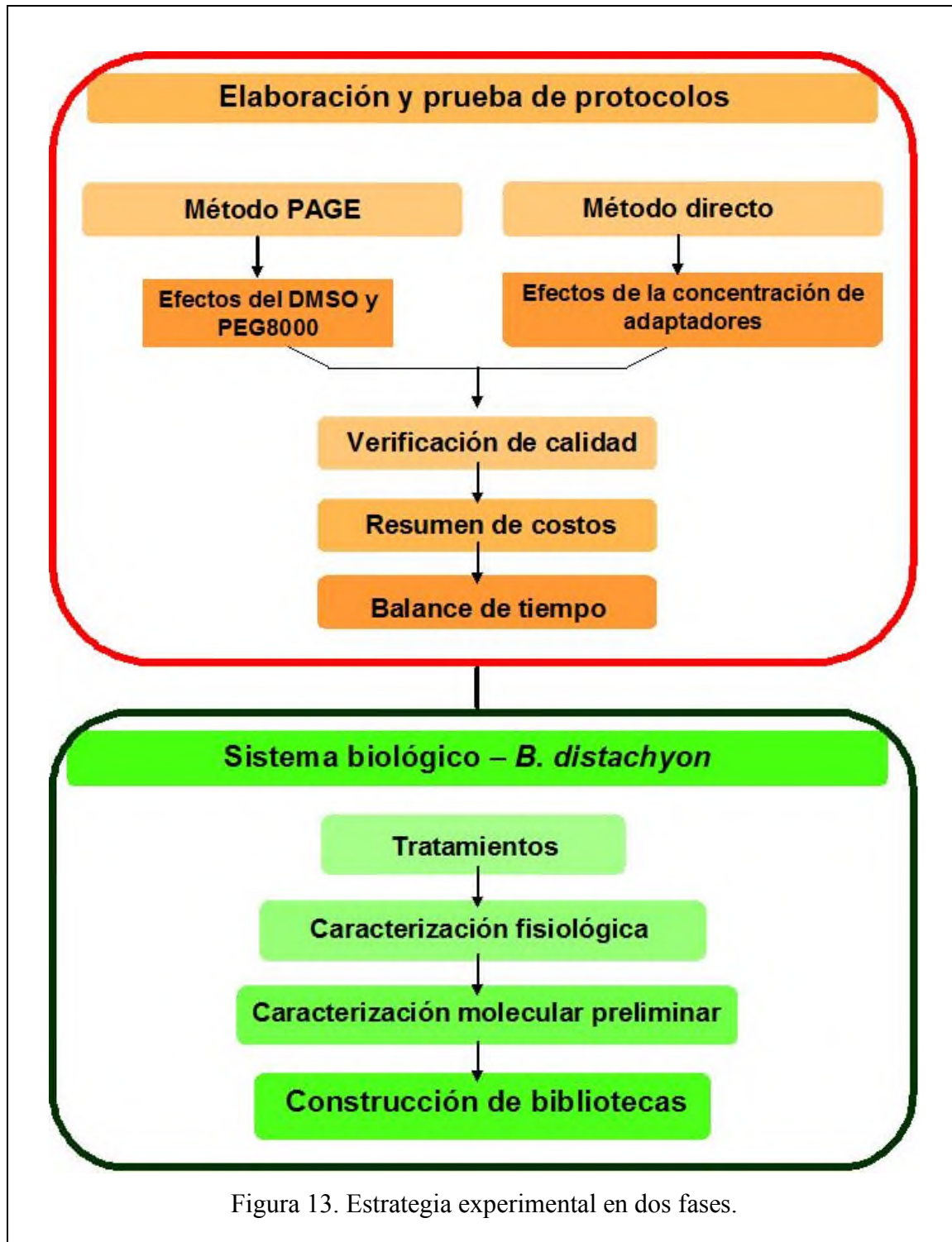


Figura 13. Estrategia experimental en dos fases.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Protocolos de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños

Los protocolos propuestos en este trabajo se elaboraron realizando modificaciones a dos protocolos convencionales para la construcción de bibliotecas, desarrollados por Lu *et al.*, (2007) y Barrera-Figueroa *et al.*, (2011), y los que emplean los kits comerciales TruSeq de Illumina, NEBNext de NewEngland Biolabs, y NEXTFlex de BiooScientific. Brevemente, los protocolos de Lu *et al.*, (2007) y Barrera-Figueroa *et al.*, (2011) se basan en la ligación de adaptadores de secuencia específica de RNA a la población de RNAs pequeños, realizando purificación en gel PAGE después de cada ligación para evitar la formación de productos adaptador-adaptador no deseados. El protocolo TruSeq de Illumina es similar a los convencionales, excepto que no se realizan los pasos de purificación en gel. En su lugar, se emplea un oligonucleótido stem-loop para bloquear el exceso de adaptador 3' libre y evitar productos no deseados. El protocolo NEBNext es idéntico a TrueSeq, excepto que se emplea un oligonucleótido lineal para bloquear al adaptador 3' libre. El protocolo NEXFlex emplea adaptadores con extremos degenerados al azar para evitar las preferencias de ligación, y después de cada ligación se realiza la eliminación de adaptadores libres mediante partículas magnéticas. En el Apéndice A se enlistan las características principales de los métodos convencionales y el propuesto en este trabajo para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños.

Los protocolos propuestos en este trabajo consideran la importancia de la purificación en gel, aunque disminuyendo al mínimo necesario el número de geles. Adicionalmente, se emplea un adaptador 3' de bajo costo y la optimización de su concentración en la reacción de ligación, para limitar la presencia de adaptador libre, como se detalla más adelante. Los protocolos desarrollados en este trabajo se probaron empleando RNA total íntegro extraído de hojas y tallos de plantas de *Brachypodium distachyon* Bd21. El procedimiento de extracción y de verificación de la integridad se detalla más adelante en la sección 7.8.1.

7.1.1 Construcción de bibliotecas con purificación en gel (Método PAGE)

Con fines prácticos, el método tradicional de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños se ha llamado PAGE en este trabajo, ya que consta de tres pasos de separación selectiva de RNA en geles de acrilamida (PolyAcrilamylde Gel Eletrophoresis, PAGE). El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a Barrera-Figueroa *et al.* (2011). Para este método se emplearon 400µg de RNA total como material de inicio.

7.1.1.1 Selección de RNAs de 20-30 nt. Primera purificación en gel PAGE.

El RNA total se ajustó a una concentración de 1.5 µg/µl. A 266 µL de RNA total ajustado (400 µg) se agregó un volumen igual de 2X Loading Buffer II, (Ambion, AM8547). En un tubo aparte se prepararon 15 µL del ladder de RNA ZR, (Zymo, R1090) de concentración 20 ng/µL, que se empleó como marcador de peso molecular y se mezcló con 15 µL de 2X Loading Buffer II. El RNA total y el marcador de peso molecular se desnaturalizaron a 65°C en un termobloque durante 5 minutos y se transfirieron a hielo. Enseguida, la muestra de marcador de peso molecular se cargó en un pozo, y el RNA total en 8 pozos (66.5 µL con 50 µg/pozo) de un gel de acrilamida 19:1 BioRad, 1610144) desnaturalizante (8M urea) al 15 %, de 20 cm de largo, preparado previamente como se indica en el Apéndice B, y dejando un pozo libre entre el marcador de peso molecular y la muestra de RNA.

El gel se corrió en buffer TBE 1X (Apéndice B), a 150V en una cámara de electroforesis vertical (Hoeffler, SE600XCROMA) durante 4.5 horas, hasta que el colorante inferior alcanzó 4/5 de la longitud total del gel. El gel se visualizó en un fotodocumentador (Ingenius LHR, Syngene) y la fracción correspondiente a fragmentos de 20-30 nt se cortó y se colocó en un tubo. El gel cortado se redujo a pequeños trozos haciéndolo pasar a través de un tubo Eppendorf horadado de 500µl. El RNA se eluyó del gel usando dos volúmenes de solución estéril de cloruro de sodio 0.4M (Apéndice B) a 5°C, durante toda la noche.

La fracción eluida se filtró en columnas con filtro de nitrocelulosa SpinX, (COSTAR, 8162). El filtrado que contiene el RNA de 20-30 nt fue adicionado con 3 μ L de glicógeno (Ambion, AM9510) y tres volúmenes de etanol absoluto, seguido por mezclado en vortex e incubación a -80°C por 2-8 horas. Al término, la muestra se centrifugó en una microcentrífuga refrigerada (Fresco 21, ThermoScientific), a 16.2g (13,000 rpm) durante 30 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla obtenida se lavó una vez con etanol al 80%, se centrifugó para desechar la solución de lavado y se dejó secar dos minutos para eluir en 4 μ L o 12 μ L de agua tratada con DEPC (Apéndice B), dependiendo de la adición de PEG 8000 (89510, NEB) o DMSO indicada en la sección siguiente.

7.1.1.2 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' y efecto del DMSO y el PEG 8000. Segunda purificación en gel PAGE.

Para este paso se empleó un adaptador de DNA (Adaptador linker 1, IDT), cuya secuencia se especifica en el apéndice D. El adaptador se ligó a los RNAs pequeños -purificados en el paso anterior- mediante la actividad de la T4 RNA ligasa 2 truncada, (NEB, M0242L) en reacciones libres de ATP. Las reacciones se prepararon en microtubos de PCR, adicionando PEG 8000 o DMSO para evaluar sus efectos sobre la eficiencia de la ligación. Los componentes y cantidades empleadas en las reacciones de ligación se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de la reacción de ligación al extremo 3'.

Componente	Volumen (μL)	
	DMSO	PEG
RNA (fracción purificada)	12	4
Inhibidor de RNasas, 40 U/ μL (RnaseOUT, Invitrogen, 10777019)	1	1
DMSO (100%) ó PEG8000 (50%)	2	10
Adaptador linker 1 (20 μM)	1	1
Amortiguador de T4 RNA ligasa libre de ATP (10X)	2	2
T4 RNA ligasa 2 truncada (200U/ μL)	2	2
Total	20	20

Una vez adicionados los componentes, se procedió a mezclar bien y a incubar a temperatura ambiente durante 1 h para el caso de la ligación con DMSO, y durante 4 h para el caso de la ligación con PEG8000.

Las reacciones se detuvieron agregando 20 μL de amortiguador de carga 2X y desnaturalizando a 65°C durante 5 minutos. Después de la desnaturalización, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida desnaturalizante al 15% (Apéndice B) y se corrieron en una cámara MiniProtean (BioRad, 1640300) a 180V durante 2 h. En uno de los pozos se cargó 1 μg de marcador de peso molecular 10 bp DNA ladder (Invitrogen, 10821015) para referencia.

Al término de la electroforesis, el gel se tiñó en solución de bromuro de etidio (Apéndice B) durante 2 minutos y se visualizó en un fotodocumentador para delimitar la fracción del gel que contenía los fragmentos de 38 a 48 nucleótidos. Esta fracción del gel se cortó y se redujo a fragmentos pequeños. A los fragmentos del gel se adicionaron 2 volúmenes de solución de NaCl 0.4 M (Apéndice B) y se incubaron a 5°C durante toda la noche para eluir los RNAs pequeños.

Al día siguiente se filtraron las muestras en columnas con filtro de nitrocelulosa SpinX, se agregó 1 μL de glicógeno (Ambion, AM9510) y 3 volúmenes de etanol. Después de mezclar en vortex, se guardó a -80°C por 2 h para proceder a la precipitación de los fragmentos ligados, mediante centrifugación a 16.2g (13,000 rpm) por 20 min en una microcentrífuga refrigerada (Fresco 21, ThermoScientific). La pastilla se secó brevemente durante 15 minutos y se disolvió en 4 μL o 12 μL de agua tratada con DEPC.

7.1.1.3 Ligación del adaptador en el extremo 5'. Tercera purificación en gel PAGE.

En este paso se ligó el adaptador Illumina 5' de RNA (IDT) al extremo 5' de los RNAs mediante la actividad de la T4 RNA ligasa 1, (Ambion, AM2141) en presencia de ATP. Las reacciones se prepararon en microtubos de PCR, agregando los componentes indicados en la Tabla 3. La secuencia del adaptador Illumina 5' (IDT) se especifica en el Apéndice D.

Tabla 3: Reacción de ligación al extremo 5'.

Componente	Volumen (μL)	
	DMSO	PEG 8000
RNA (fracción eluida)	12	4
Inhibidor de RNasas, 40 U/ μL	1	1
DMSO (100%) ó PEG8000 (50%)	2	10
Adaptador Illumina 5' (50 μM)	1	1
Amortiguador de T4 RNA ligasa (10X)	2	2
T4 RNA ligasa 1 (5 U/ μL)	2	2
Total	20	20

Las reacciones se incubaron a 37°C en un termociclador (Techne, TC-512) durante 1h en el caso de la reacción con DMSO y 4h en el caso de la efectuada con PEG 8000.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 20 μL de 2X Loading Buffer II, como amortiguador de carga a cada reacción, y se desnaturalizó a 65°C por 5 minutos en un

termobloque. Después de la incubación, las muestras se colocaron en hielo y se cargaron en un gel de acrilamida desnaturalizante al 10% (Apéndice B) y se corrieron en una cámara MiniProtean a 150V durante 1.5 h. En uno de los pozos se cargó 1 μ g de marcador de peso molecular 10bp para referencia, el cual fue desnaturalizado de la misma forma que las muestras.

Después del corrimiento electroforético, el gel se tiñó en solución de bromuro de etidio (Apéndice B) para visualizar el marcador de peso molecular y seleccionar la fracción del gel correspondiente a 65 a 75 nucleótidos. Esta fracción se cortó de los carriles en los que se aplicaron las ligaciones, el gel se redujo a fragmentos más pequeños y se eluyó con 2 volúmenes de NaCl 0.4 M (Apéndice B) a 5°C durante la noche. Al día siguiente se filtró y se recuperó el líquido en columnas con filtro de nitrocelulosa SpinX. A éste se agregó 1 μ L de glicógeno (Ambion, AM9510) y 3 volúmenes de etanol absoluto. Después de mezclar, se incubó por 2 h a -80°C para posteriormente precipitar los productos de ligación mediante centrifugación a 16.2g (13,000 rpm), a 5°C durante 20 min. La pastilla resultante se disolvió en 8 μ L de agua tratada con DEPC (Apéndice B).

7.1.1.4 Transcripción reversa

Las construcciones de RNA obtenidas después de la ligación de los adaptadores (con DMSO o PEG 8000 se emplearon para sintetizar cDNA en reacciones de retrotranscripción. Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos de PCR en dos etapas, como se indica en las Tablas 4 y 5. La secuencia del oligonucleótido RT se muestra en el Apéndice D.

Tabla 4. Primera parte de la reacción de transcripción reversa

Componente	Volumen (μL)
RNA ligado	6.8
Oligonucleótido RT (5μM)	4.2

La mezcla se incubó a 65°C por 5 minutos en el termociclador. Enseguida se colocó en hielo por 2 minutos y se adicionó lo indicado en la Tabla 5.

Tabla 5. Segunda parte de la transcripción reversa

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador de primera cadena 5x	4
DTT (NEB)	2
Inhibidor de RNasa, 40 U/μL	1
dNTPs (10mM)	1
Total	8

Las muestras se incubaron a 42°C por 5 minutos en termociclador. Se adicionó 1 μL de la enzima SuperScript II RT (Invitrogen 18064022, 200 U/μL) y se incubó a 42 °C por 1 hora, seguida por una desactivación a 70 °C durante 15 minutos. Después de la retrotranscripción, el cDNA obtenido se utilizó inmediatamente para su amplificación por PCR.

7.1.1.5 Amplificación e indizado de las bibliotecas

La amplificación de las bibliotecas se llevó a cabo con la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion HF (M0530S, NEB) en microtubos de PCR. Para el indizado se emplearon oligonucleótidos reversos que incluyen los índices A, B y C para secuenciación (Apéndice D). En la tabla 6 se indican los componentes y volúmenes empleados para las reacciones subsecuentes de PCR.

Tabla 6. Preparación de las reacciones de PCR

Componente	Volumen (μL)
H ₂ O	12.3
Amortiguador 5x Phusion (NÉB)	4
dNTPs (10mM cada uno)	0.5
Primer Illumina 5' PCR, 10 μM	0.5
Primer reverso, 10 μM (Índice A, B o C)	0.5
DNA Molde (cDNA)	2
DNA polimerasa Phusion HF (2 U/ μL)	0.2
TOTAL	20

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo empleando el programa de ciclado que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Programa de ciclado para la amplificación de las bibliotecas.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
98°C	30 s	1
98°C	15 s	5
54°C	30 s	
72°C	15 s	
98°C	15 s	15
60°C	30 s	
72°C	15 s	
72°C	10 min	1

Al término, los productos obtenidos se mezclaron con un volumen de amortiguador de carga II 2X (Ambion) y se cargaron en un gel nativo de acrilamida al 6%. El corrimiento electroforético se llevo a cabo en una cámara de electroforesis vertical (Hoeffer, SE600XCROMA) a 120 V, durante 4 horas.

El gel se visualizó en el fotodocumentador y se procedió a cortar las bandas de 108 a 118 pares de bases. Los fragmentos cortados del gel se redujeron de tamaño y se eluyeron toda la noche en dos volúmenes de solución de NaCl 0.4 M (Apéndice B).

El gel se filtró al día siguiente para recuperar la fracción líquida. A esta fracción se adicionaron 0.1 volúmenes de solución de acetato de sodio 3M (Apéndice B), 1.5 μ L de glicógeno (Ambion, AM9510) y 3 volúmenes de etanol absoluto, mezclando con el vortex y dejando reposar a -20°C por 2 horas. Al término, se centrifugó durante 30 minutos para precipitar la pastilla de DNA, la cual se lavó dos veces con etanol al 70% para después diluir en 10 μ L de agua DEPC (Apéndice B).

7.1.2 Optimización de la concentración de adaptadores y uso de RNA total

Empleando el método descrito en 7.1.1, exceptuando únicamente la primera purificación PAGE, se utilizaron dos concentraciones de adaptadores para observar su efecto en la formación de productos secundarios adaptador-adaptador. Para esto se empleó RNA total para realizar las ligaciones secuenciales con los adaptadores a concentración 1 y 10 μ M. Como referencia, se realizó en forma paralela una biblioteca con la fracción de 20-30 nt recuperada por gel PAGE a partir de 200 μ g de RNA total y con adaptadores a concentración 20 μ M.

7.1.3 Construcción de bibliotecas por el método directo

El método directo para construcción de bibliotecas de RNAs pequeños emplea RNA total íntegro como material inicial, sin la purificación de la fracción de 20-30 nt en gel de acrilamida realizada en el primer gel, y omitiendo la segunda y tercera purificación del método PAGE.

7.1.3.1 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' del RNA.

Las reacciones de ligación se realizaron empleando 1 µg de RNA total, a concentración de 200 ng/µL en agua tratada con DEPC. En este caso sólo se adicionó DMSO a las reacciones y adaptador a concentración 1 µM.

En un microtubo de PCR se mezclaron 5 µL de RNA total (200 ng/µL) y 1 µL de adaptador linker 1 (Apéndice D) preadenilado a concentración de 1 µM. Las mezclas se desnaturalizaron a 70 °C por 2 minutos en termociclador. Al término de la incubación los tubos se colocaron en hielo durante 2 minutos y se agregaron los componentes indicados en la Tabla 8.

Tabla 8: Reacción de ligación del adaptador 3' al RNA total

Componente	Volumen (µL)
Buffer 10X T4 RNA ligasa 2, libre de ATP	1
DMSO al 100%	1
Inhibidor de RNasas, 40 U/µL	1
T4 RNA ligasa 2 truncada (200U/µL)	1

Las reacciones se incubaron a 28°C en termociclador durante 1 h. Después de la incubación, se agregó a cada tubo 0.4 µL de buffer 10X de T4 RNA ligasa 1 (Ambion, AM2141) y 0.6 µl de DTT 100 mM (NEB).

7.1.3.2. Ligación del adaptador al extremo 5' de los RNAs pequeños.

En un tubo de PCR se agregó 1.1 µL del adaptador Illumina 5' de RNA (IDT) a concentración 1 µM, y se incubó a 70 °C por 2 minutos en termociclador. Al término, el tubo se colocó en hielo para agregar enseguida 1.1 µL de ATP a una concentración de 10

mM y 1.1 μ L de T4 RNA ligasa 1 (Ambion, AM2141). Se tomaron 3 μ L de esta mezcla y se agregaron al tubo de la ligación 3'. La reacción se incubó a 28 °C por una hora.

7.1.3.3 Transcripción reversa

Las reacciones de retrotranscripción se prepararon como se indica en la sección 7.1.1.4, excepto por el oligonucleótido RT, que en este caso fue sustituido por el oligonucleótido BRIDGE a concentración 1 μ M. La secuencia del oligonucleótido BRIDGE se muestra en el Apéndice D.

7.1.3.4 Amplificación e indizado de las bibliotecas

La amplificación de los productos se realizó como se indica en la sección 7.1.1.5, excepto por el oligonucleótido reverso A, B o C. En este caso se emplearon oligonucleótidos con índices distintivos de 6 letras de acuerdo al diseño de Illumina. Además, se sustituyó el primer Illumina 5' PCR por el primer Illumina 5' PCR TruSeq, para ajustarse a la secuencia actualizada por Illumina. En el Apéndice D se muestra la secuencia de los oligonucleótidos reversos Illumina con índices 1, 2, 3, 4, 5 y 7, y del primer Illumina 5' PCR TruSeq. El programa de ciclado se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Programa de ciclado para la amplificación de las bibliotecas.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
98 °C	30 seg	1
98°C	15 seg	
60°C	30 seg	15
72°C	15 seg	
72°C	10 min	1

Los productos de PCR se cargaron en un gel de acrilamida, al 6%, tal como se indica en la sección 7.1.1.5. En este caso, la fracción de 156 a 166 bp se cortó del gel, se purificó y se eluyó en un volumen final de 10 μL .

7.2 Verificación de la calidad de las bibliotecas

Se realizó un análisis preliminar de la calidad de las bibliotecas construidas con cada uno de los métodos, mediante secuenciación individual por el método de Sanger. Para esto, como paso inicial, los productos de PCR purificados en el gel final se reamplificaron en la DNA Polimerasa Dream Taq Green, (Thermo Scientific, K1081), con la finalidad de obtener productos adecuados para su ligación posterior en un vector A/T.

7.2.1 Reamplificación y purificación de productos de PCR.

Para la reamplificación se empleó como molde 1 μL del producto purificado en el paso anterior. Las reacciones se prepararon como se indica en la tabla 10.

Tabla 10. Reacción de reamplificación de productos para ligación en vector.

Componentes	Volumen (μL)
Dream Taq Green Master Mix 2X	10
Agua	8
Primer Illumina 5' PCR TruSeq (10 μM)	0.5
Oligonucleótido reverso, índice A, B, C o 1, 2, 3, 4, 5, 7 (10 μM)	0.5
DNA purificado (del paso anterior)	1
TOTAL	20

La reamplificación se llevó a cabo en termociclador con el programa indicado en la Tabla 11.

Tabla 11. Programa de ciclado para la reamplificación

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
98 °C	15 s	
60 °C	30 s	10
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1

Los productos se cargaron en un gel de agarosa nativo al 6% para su visualización y purificación siguiendo los pasos en la sección 7.1.1.5 para un fragmento de 156 a 166 pb. Los productos purificados se eluyeron en un volumen final de 10 μ L.

7.2.2 Ligación de productos en el vector pGEM-T Easy

Se realizaron reacciones de ligación de los productos purificados en el vector pGEM-T Easy (Promega, A1360) (Apéndice C). Las reacciones se prepararon de acuerdo a la Tabla 12.

Tabla 12. Reacción de ligación de los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy

Componente	Volumen (μ L)
Amortiguador de ligación 2X	2.5
Vector pGEM-T Easy, 50 ng/ μ L	0.5
Producto de PCR del paso anterior	1.5
T4 DNA ligasa (3 U/ μ L)	0.5
TOTAL	5

Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 25°C y se procedió inmediatamente a la transformación de *Escherichia coli*.

7.2.3 Transformación de células competentes de *Escherichia coli*

Un vial de células químicamente competentes One Shot TOP 10 (Invitrogen, C4040) se removió del ultracongelador a -80°C y se colocó en hielo durante 5 minutos. Una vez que el vial se descongeló, se tomaron cuidadosamente con una pipeta 25µL de la suspensión bacteriana y se colocaron en un vial nuevo estéril, dejando el resto (25 µL) en el vial original. A cada tubo se agregaron 5 µL de la reacción de ligación respectiva, se mezcló golpeando cuidadosamente el fondo del tubo sobre la mesa. Los tubos se dejaron incubar por 30 min en hielo.

Al término, los tubos se incubaron a 42°C en un termobloque durante 30s, para inmediatamente transferir a hielo y dejar ahí por 2 minutos. Enseguida se adicionaron 250 µL de medio SOC (incluido en Invitrogen, C4040) a los tubos y se incubaron a 37°C con agitación de 225 rpm durante 1 h.

Los tubos se removieron de la incubadora y la suspensión bacteriana se distribuyó en 3 cajas de Petri con medio LB sólido adicionado de ampicilina (100 µg/ml) y plaqueado con 40 µl de X-Gal (40 mg/ml) (Apéndice B). Las cajas inoculadas se mantuvieron en incubación a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las cajas se removieron de la incubadora, se colocaron a 5°C por 2 h y se seleccionaron las colonias blancas para enseguida inocularlas en tubos de vidrio con 5 ml de medio LB líquido con Ampicilina (10 µg/mL). Simultáneamente a la siembra en el medio líquido, cada colonia seleccionada se estrió en medio sólido para preservarla. Los tubos con medio e inóculo se incubaron durante toda la noche a 37°C con agitación de 180 rpm.

7.2.4 Extracción de plásmidos

Después de la incubación, los cultivos bacterianos desarrollados se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.7 ml rotulados y se centrifugaron para separar el medio y colectar el paquete celular en el fondo del tubo. Enseguida se procedió a la extracción de plásmidos mediante lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989). Para esto se prepararon tres soluciones de extracción de plásmidos (Soluciones 1 a 3, Apéndice B).

A cada paquete celular se adicionaron 100 μL de la solución 1 fría y se mezcló en el vortex hasta obtener una solución blanquecina. A continuación se agregaron 200 μL de la solución 2 a temperatura ambiente a cada tubo. Los tubos se mezclaron por inversión 5 veces y se colocaron en hielo. Enseguida se agregaron 150 μL de la solución 3 fría a cada tubo, se mezcló por inversión durante 15 s y se dejó reposar cada tubo de 3 a 5 minutos en hielo.

Los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga a 4°C a 16.2g (13,000 rpm) por 5 min. Al término se decantó el sobrenadante en un tubo nuevo. Al sobrenadante se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, pH 6.5-6.9 (IBI Scientific, B05174) en campana de extracción, se mezcló por vortex y se centrifugó a 16.2g (13,000 rpm) por 3 min. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se agregaron 2 volúmenes de etanol. El tubo se mezcló en vortex y se incubó a -20°C por 2 h.

Transcurrida la incubación, los tubos se centrifugaron a 5°C a 16.2g (13,000 rpm) por 20 min para colectar la pastilla de plásmido en el fondo del tubo. El sobrenadante se desecó y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, eliminando el lavado por decantación. La pastilla lavada se dejó secar colocando el tubo abierto sobre un papel absorbente limpio durante aproximadamente 15 min. La pastilla se disolvió en 50 μL de agua desionizada estéril, se adicionó 1 μL de RNasa A (Thermo Scientific, EN0531) y se incubó a 37°C durante 1 h.

7.2.5 Selección de plásmidos para secuenciación

Los plásmidos a secuenciar se seleccionaron mediante el análisis de tamaño de su inserto. Para esto, se realizaron reacciones de PCR usando como molde los plásmidos y oligonucleótidos específicos (índice A, B, o C, o índices 1-6 y 7, dependiendo del método de construcción empleado), de acuerdo a la Tabla 13. Para las reacciones, se utilizó el programa de ciclado especificado en la Tabla 14.

Tabla 13. Preparación de las reacciones de PCR de plásmidos

Componente	Volumen
Dream Taq Green PCR Mix 2X	10 μ L
Oligonucleótido Illumina 5' PCR TruSeq (10 μ M)	0.5 μ L
Agua desionizada estéril	8 μ L
Oligonucleótido reverso correspondiente (10 μ M)	0.5 μ L
Plásmido (500 ng/ μ L)	1 μ L
Total	20 μ L

Tabla 14. Programa de ciclado para las PCR de plásmidos

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C	3 min	1
94°C	30 seg	30 ciclos
60°C	30 seg	
68°C	40 seg	
72°C	10 min	1
4 °C	∞	

Los productos se visualizaron en un gel de acrilamida nativo al 6% (Apéndice B) para verificar el tamaño del inserto, que debe corresponder exactamente a la longitud de los fragmentos purificados del gel en el protocolo de construcción respectivo.

Alternativamente, la verificación del tamaño de los insertos se realizó mediante la digestión de los plásmidos con la enzima EcoRI HF (NEB, R3101). Las reacciones de digestión se prepararon como se indica en la Tabla 15 y se incubaron a 37°C por 1h. Posteriormente se cargaron en un gel de acrilamida nativo al 6% (Apéndice B) para visualizar el tamaño de los insertos liberados del plásmido, que idealmente debe corresponder al tamaño de los fragmentos que se purificaron del gel en el último paso de la construcción de bibliotecas, según cada método, más 19 bases del plásmido que se ubican entre los sitios de corte y que se agregarían al inserto. En el caso del método directo, se espera la obtención de 2 fragmentos ya que el oligonucleótido BRIDGE tiene un sitio de corte de EcoRI interno.

Tabla 15. Reacción para la digestión de plásmidos

Componente	Volumen (μL)
Agua desionizada tratada con UV	14.1
Amortiguador de EcoRI CutSmart	2
EcoR I (20 U/μL)	0.4
Plásmido	3.5
Volumen	20

La concentración de los plásmidos se determinó en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific). Los plásmidos se ajustaron a una concentración final de 150 ng/μL para enviarse a secuenciar a LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad)-CINVESTAV. Una vez secuenciados, a partir del archivo de texto generado se verificó la ligación adecuada y en orden de los adaptadores, así como la presencia y longitud de las secuencias entre los adaptadores, provenientes de RNAs.

7.3 Cálculo de costos de producción

Para analizar los costos de producción se elaboró una lista de materiales y consumibles necesarios para realizar el proceso de construcción de bibliotecas. Se consideraron los rendimientos de cada reactivo adquirido, para calcular el costo de producción de 24 bibliotecas de RNAs pequeños. Adicionalmente, se solicitaron cotizaciones a dos empresas proveedoras del servicio de construcción de bibliotecas en México (Empresa mexicana 1 y Empresa mexicana 2) con la finalidad de realizar comparaciones y validar la reducción de los costos de producción con los métodos propuestos en este trabajo.

7.4 Balance de tiempo

Los protocolos elaborados se pusieron a prueba en tiempo real para registrar la duración del proceso de construcción de bibliotecas hasta su término. Para esto se consideraron los tiempos de preparación por unidad (por biblioteca), a cargo de un operador con disposición total de los equipos requeridos y con horario de trabajo de tiempo completo (8 h/día, 5 d/semana).

7.5 Sistema biológico *Brachypodium distachyon*

Para realizar el presente proyecto de tesis, se empleó la planta monocotiledónea modelo *Brachypodium distachyon* ecotipo Bd21. Las semillas fueron donadas por el Dr. Garvin a través del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS, CA).

7.5.1 Establecimiento del cultivo de *B. distachyon*

El cultivo se desarrolló a partir de 25 semillas de *B. distachyon* Bd21, con las que se realizaron pruebas de germinación para calcular el porcentaje de viabilidad. Para esto, las

semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos. Las semillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, las semillas se colocaron en un tubo de 15 ml que se llenó con agua destilada estéril limpia. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 4°C por 4 días para romper la dormancia. Después de la incubación, las semillas se sembraron en macetas hexagonales de 4.5 cm por lado, 8.5 cm de ancho y 5.8 cm de altura que contenían sustrato Mezcla Sunshine # 3 fina especial (SunGro) que contiene 70-80% turba, vermiculita, piedra caliza, yeso agrícola y agente humectante. El sustrato se esterilizó en autoclave, se suplementó con fertilizante 15N-5P-20K (Nitrofoska Perfect) a razón de 2% del peso total y se hidrató a la máxima capacidad de retención de agua adicionada. Las macetas se colocaron en un cuarto de crecimiento ajustado a 23°C, con un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, o en una cámara de crecimiento (Conviron, A1000) para un fotoperiodo de 20 h luz / 4 h oscuridad, ambos con iluminación fluorescente blanca ($150 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$).

Una vez establecido el cultivo, las plantas se llevaron a la conclusión de su ciclo de vida para obtener más semillas, registrando cada una de sus etapas de desarrollo en escala de tiempo: crecimiento vegetativo, ramificación (tillering), transición a la floración (booting), inicio de la floración (heading), floración, producción de semillas y senescencia. Cuando se dispuso con la cantidad de semillas suficiente, se procedió a establecer un nuevo cultivo para aplicar tratamientos de estrés.

7.6 Tratamientos de estrés y colecta de muestras

Para la realización de los experimentos de estrés se utilizaron 10 macetas por cada etapa (3 etapas en total: vegetativa, transición a la floración, y floración), por dos tratamientos (control y sequía crónica), con 5 plantas por maceta, dando un total de 300 plantas distribuidas en 60 macetas. Este experimento se duplicó para aplicar dos fotoperiodos: uno largo de 20h luz/ 4h oscuridad, y uno regular de 16 h luz/ 8 h oscuridad. Las semillas se pusieron a germinar previamente en una maceta grande, con el sustrato especificado en la

sección anterior, y una vez que germinaron y desarrollaron la primera hoja (aprox. 4 días) se transfirieron a macetas etiquetadas para cada tratamiento.

Para ambos tratamientos (control y sequía), los germinados se trasplantaron a macetas con sustrato hidratado, a razón de 2.08 g de agua/g de sustrato, calculado como el 100% de contenido relativo de agua en suelo, de acuerdo a la Ecuación 1 (Riboni *et al.*, 2013).

$$RSWC = \frac{(\text{Peso húmedo diario} - \text{Peso seco})}{(\text{Peso húmedo inicial} - \text{Peso seco})} \times 100 \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Donde RSWC es el contenido relativo de agua en suelo (CRAs), el peso húmedo inicial corresponde al peso del sustrato a la máxima capacidad de retención de agua (2.08 g de agua / g de sustrato), y el peso seco es el peso del sustrato obtenido en forma previa al experimento tras haberlo secado durante 3 días a 60°C. El peso húmedo diario es el peso del suelo registrado cada día a lo largo del experimento.

Enseguida de la siembra, las macetas etiquetadas para tratamiento control continuaron recibiendo riego controlado a diario para mantener la relación de 2.08 (agua/sustrato), equivalente a CRAs = 100%, mientras que las de sequía dejaron de irrigarse hasta alcanzar una relación de 0.95 g de agua / g de sustrato, expresado como CRAs = 46%. Una vez alcanzado el nivel de agua, las macetas del tratamiento de sequía se mantuvieron en esa proporción a lo largo de su ciclo de vida mediante la adición de pequeñas cantidades de agua (subirrigación), para inducir un estado de sequía crónico.

Para llevar a cabo el análisis molecular de *B. distachyon* se emplearon plantas cultivadas en cuarto de crecimiento, bajo fotoperiodo de 16h luz / 8h oscuridad. Se realizaron colectas de plantas en tres puntos de su ciclo de vida (etapa vegetativa, etapa de transición a la floración, y etapa de floración), bajo tratamiento control y de sequía crónica, para dar un total de 6 muestras con triplicados biológicos. Para esto se colectó exclusivamente la parte

aérea de las plantas (tallos y hojas), excluyendo las inflorescencias, en caso de haberlas. Las muestras se etiquetaron y se colectaron rápidamente con nitrógeno líquido, para enseguida almacenarlas en un ultracongelador a -80°C , hasta su uso posterior.

7.7 Caracterización fisiológica de *B. distachyon*

Para la caracterización fisiológica se evaluaron los efectos de los tratamientos sobre el desarrollo y ciclo de vida de *B. distachyon*. Para esto, se identificaron las etapas de desarrollo de la planta (vegetativo, transición a la floración, y floración) y en cada etapa se registró el número de hojas, altura, número de tillers (ramificaciones), tiempo a floración, y número de inflorescencias en las plantas bajo los tratamientos. En la Fig. 14 se muestran los parámetros analizados.

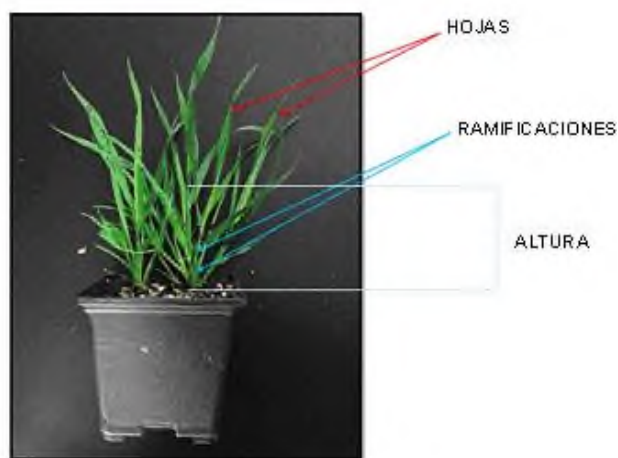


Figura 14. Medición de parámetros fisiológicos de desarrollo en *B. distachyon*.

Adicionalmente, al momento de las colectas, se determinó el Contenido Relativo de Agua en Hojas (CRAh) en cada una de las plantas. Este parámetro permite analizar directamente el grado de estrés que presentan las plantas durante el tratamiento y se calcula con la Ecuación 3 (Barrs y Weatheley, 1968):

$$\text{CRA}_h = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} \times 100$$

[Ecuación 2]

Donde:

Pf: Peso fresco de un trozo de hoja.

Pt: Peso del trozo de hoja a 24 horas de haber sido sumergida en agua desionizada.

Ps: Peso del trozo de hoja a 48 horas de secado a 68°C.

7.8 Caracterización molecular de *B. distachyon*

7.8.1 Extracción de RNA de *B. distachyon*

El RNA total de *B. distachyon* se extrajo con el reactivo TRIzol (Invitrogen, 15596018). Las muestras colectadas se removieron del ultracongelador y se homogenizaron con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero con pistilo. Una vez que las muestras alcanzaron la consistencia de un polvo muy fino, se colocó un volumen aproximado de 500 µl de material vegetal pulverizado en un microtubo de 1.7 ml. Enseguida se agregaron 1000 µl de TRIzol. Las mezclas se homogenizaron rápidamente en un vortex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 min. Al término, se agregaron 200 µl de cloroformo a cada tubo y se mezclaron manualmente por agitación por 20s. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. y se centrifugaron a 4°C en una microcentrifuga refrigerada (Fresco 21, Thermo Scientific) a 16.2g (13,000 rpm) durante 15 min.

Después de la centrifugación, los tubos se colocaron en hielo y se removió cuidadosamente la fase superior (acuosa) de la mezcla, colocándola en un tubo limpio de 1.7 ml. Al sobrenadante se agregaron 1000 µl de isopropanol (IBI Scientific, IB95735), se mezcló manualmente por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Enseguida se

centrifugó a 16.2 g a 4°C, por 20 min. El sobrenadante se separó por decantación, y la pastilla de RNA formada en el fondo del tubo se enjuagó con 1000 µl de solución de etanol al 80%, se centrifugó para eliminar el líquido de lavado y se dejó reposar. Cada pastilla se resuspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC (Apéndice B), se cuantificó en nanodrop y se almacenó a -80°C.

El RNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa desnaturalizante (Apéndice B) para corroborar su integridad. Para esto, se colocaron 2 µl de cada muestra en tubos de 1.7 ml. Se agregaron 2 µl de agua tratada con DEPC y 1 µl de amortiguador de carga 5X para RNA (Apéndice B). Las muestras se incubaron a 65°C por 5 minutos y se transfirieron inmediatamente a hielo. Después de 2 minutos se centrifugaron para coleccionar el líquido de condensación de las paredes del tubo y las muestras se cargaron en pozos del gel de agarosa desnaturalizante (Apéndice B) para correrse a 80 V en solución de MOPS 1X como solución de corrida (Apéndice B). Cuando el colorante azul alcanzó 3/4 partes de la longitud del gel, se detuvo la electroforesis y el gel se visualizó en un fotodocumentador, mediante el software GeneSnap de Syngene.

La integridad de los RNAs extraídos se verificó en el gel de agarosa desnaturalizante mediante la observación de la intensidad de las bandas ribosomales mayores y la ausencia de barridos en el gel y otros signos visibles de degradación.

7.8.2 Análisis preliminar de expresión de dos microRNAs en *B. distachyon*

La caracterización molecular de *B. distachyon* se realizó con el análisis de expresión de miR156 y miR159 durante tres etapas de desarrollo, empleando la técnica de qPCR Stem-Loop (Chen *et al.*, 2005), y con miR166a como control constitutivo. Las reacciones se prepararon como se indica en la Tabla 16. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en el Apéndice D.

Tabla 16. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA para el análisis de expresión por qPCR Stem-Loop

Componente	Volumen (μL)
RNA total (1μg/μl)	2
Oligonucleótido SL-156, SL-166, o SL-159 (0.5μM)	2
Buffer RT 10X	2
Inhibidor de RNasas 40 U/μL	1
DNTPs (10 mM)	1
H ₂ O	11.5
Retrotranscriptasa MMuLV (NEB, M0253S)	0.5
Volumen	20

Las reacciones se incubaron a 42°C durante 1 h, seguido por 72°C por 5 min para inactivar la retrotranscriptasa. Con el cDNA obtenido, se realizaron las reacciones de PCR cuantitativa empleando una sonda Taqman cuya secuencia se diseñó en este trabajo y se especifica en el Apéndice D. La sonda Taqman se adquirió de IDT (Integrated DNA Technologies), y fue marcada con FAM en el extremo 5', un modificador ZEN intermedio y IowaBlackQuencher en el extremo 3'. Las reacciones se prepararon como se indica en la Tabla 17.

Tabla 17. Reacciones de qPCR con la sonda Taqman.

Componente	Volumen (μL)
Agua desionizada estéril	6.5
Oligonucleótido directo (miR156, miR159 o miR166a) (10 μM)	1
Oligonucleótido reverso universal (10 μM)	1
Mezcla de reacción 2X Maxima qPCR probe (Thermo Scientific, K0252)	10
cDNA	0.5
Sonda Taqman (8 μM)	1
Volumen	20

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real (PikoReal 96, Thermo Scientific) de acuerdo al programa de la Tabla 18.

Tabla 18: Programa de ciclado para la PCR cuantitativa de microRNAs

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
50°C	2 minutos	1
95 °C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	
60°C	1 minuto	40

La fluorescencia se registró al término del paso de extensión a 72°C de todos los ciclos y se expresó como Cq. Los resultados se analizaron con el software PikoReal versión 2.2. Los valores de Cq se emplearon para calcular el nivel de expresión de los microRNAs de acuerdo al método de Ct comparativo (Livak y Schmittgen, 2001), según la Ecuación 3.

$$ER = 2^{-(\Delta\Delta Ct)} \quad \text{[Ecuación 3]}$$

Donde:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{Estrés}} - (Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia})_{\text{Control}}$$

7.8.3 Construcción de bibliotecas de RNAs pequeños para secuenciación masiva.

Los RNAs extraídos de *Brachypodium* en tres etapas de desarrollo (vegetativo, transición a la floración y floración) bajo dos tratamientos (control y sequía) se emplearon como material inicial para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños. Para esto se realizaron mezclas de los RNAs extraídos de las muestras triplicadas (pooling). Por ejemplo, para la muestra control de la etapa vegetativa (CV) se tenían los triplicados CVA,

CVB y CVC. De cada triplicado se tomaron 4 μ g y se mezclaron, para dar un total de 12 μ g de RNA total inicial.

Las bibliotecas se construyeron empleando el método directo, tal como se especifica en la sección 7.1.2, pero realizando un gel inicial para seleccionar RNAs pequeños de 20-30 nt a partir de los 12 μ g de RNA total. Este paso adicional es parte del método PAGE y se encuentra detallado en la sección 7.1.1.1, pero reducido a un volumen de RNA de 12 μ g en 12 μ l, por lo que el volumen del buffer de carga II se reduce de 266 μ l a 12 μ l. El resto del procedimiento se realizó de acuerdo al método directo, empleando adaptadores 3' y 5' a concentración 1 μ M.

Los productos de la reacción de PCR final se purificaron en un gel de acrilamida nativo al 6%, tal como se detalla en la sección 7.1.1.5. En este caso, la fracción de 156 a 166 bp se cortó del gel, se purificó y se eluyó en un volumen final de 10 μ L. Las muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación en la plataforma Illumina HiSeq 2500.

7.8.4 Análisis de resultados de la secuenciación masiva

Las bases de datos resultantes de la secuenciación masiva de las 6 bibliotecas se analizaron con la versión de prueba del software CLC Genomics Workbench, para obtener el número total de secuencias de alta calidad y calcular los porcentajes de secuencias con inserto de RNAs pequeños y de secuencias adaptador-adaptador (vacías).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis de integridad del RNA total empleado en los protocolos de construcción de bibliotecas

La integridad del RNA total extraído se verificó en un gel de agarosa desnaturalizante. En la Figura 15 se muestra el RNA total de plantas bajo condiciones control. Se observa la intensidad de las bandas ribosomales mayores, indicativas de que la muestras se encuentran libre de degradación aparente. También se aprecia la recuperación de especies pequeñas de RNAs, presentes en la parte inferior del gel. La muestra C1, proveniente de la condición control en etapa vegetativa, se empleó para realizar las pruebas de los protocolos de construcción.

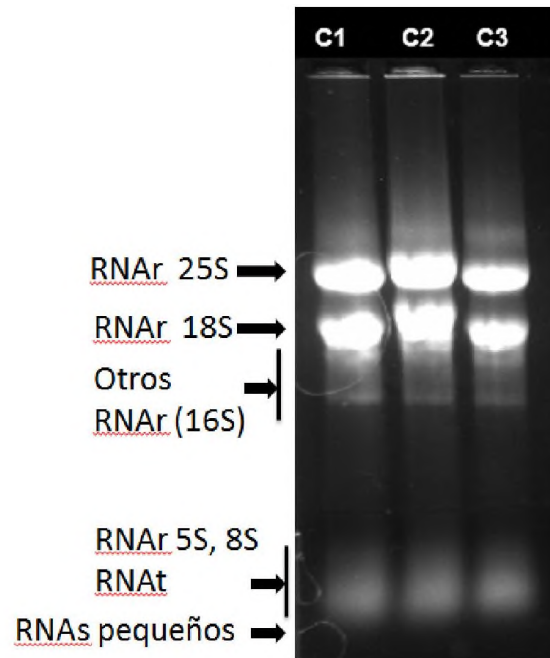


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% de los RNAs extraídos de *B. distachyon*. C1, C2 y C3 son muestras del tratamiento control. RNAr: RNA ribosomal; RNAt: RNA de transferencia.

8.2 Construcción de bibliotecas con purificación en gel (Método PAGE).

El método PAGE considera como necesaria la purificación de RNAs pequeños de 20-30 nt para iniciar con el protocolo de construcción de bibliotecas. Siguiendo esta especificación, una vez que se comprobó la integridad del RNA total, se separó en un gel para obtener la fracción de 20 a 30 nt. En la Fig. 16 A se muestra el resultado del gel y en la Fig. 16 B, la fracción que se separó para purificar los RNAs pequeños.

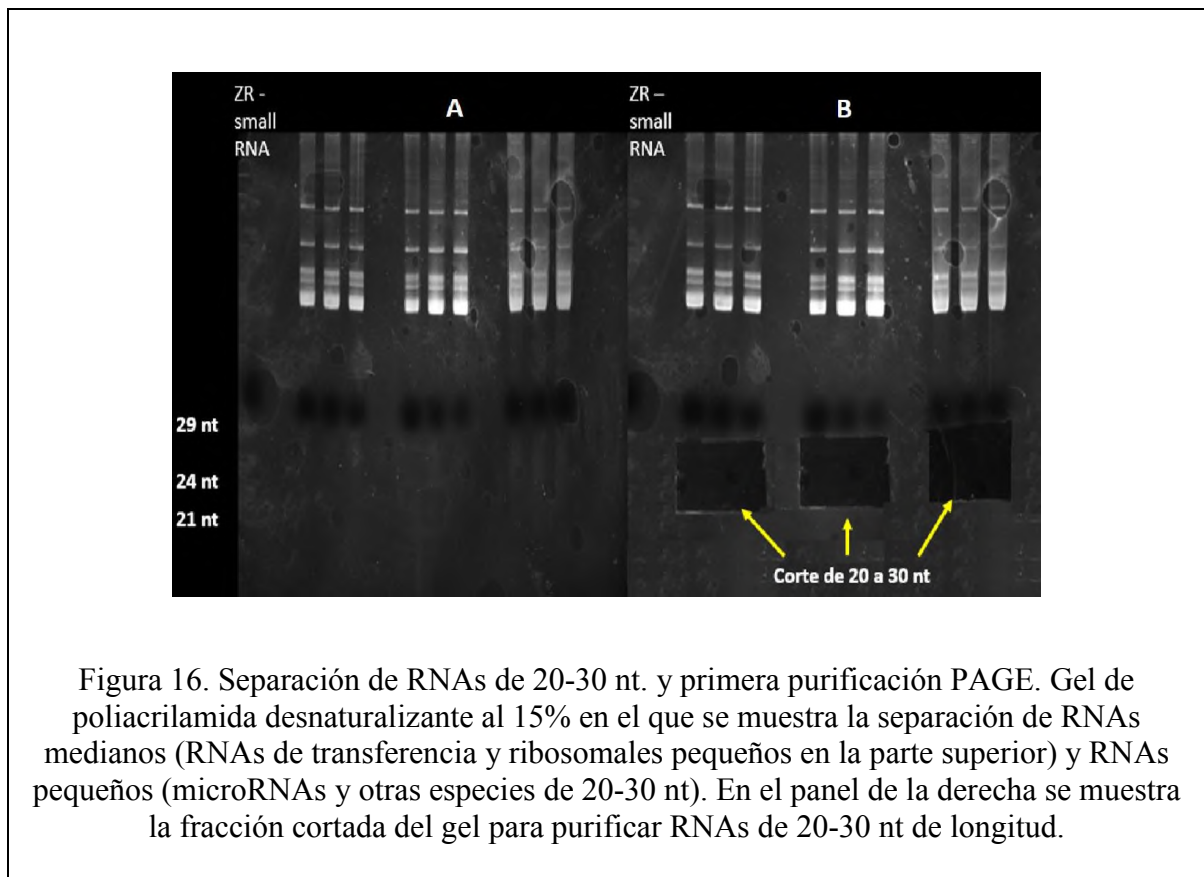


Figura 16. Separación de RNAs de 20-30 nt. y primera purificación PAGE. Gel de poliacrilamida desnaturizante al 15% en el que se muestra la separación de RNAs medianos (RNAs de transferencia y ribosomales pequeños en la parte superior) y RNAs pequeños (microRNAs y otras especies de 20-30 nt). En el panel de la derecha se muestra la fracción cortada del gel para purificar RNAs de 20-30 nt de longitud.

Los protocolos comerciales sugieren la importancia de la purificación preliminar de los RNAs pequeños de 20-30nt en la construcción de bibliotecas, pero no la consideran como un paso necesario. De hecho, están diseñados para el tiempo de preparación eliminando pasos del protocolo. La desventaja de no realizar esta purificación es que, en las reacciones subsecuentes, toda la población de RNAs, incluyendo los RNAs ribosomales que son muy

abundantes, estarían presentes en las muestras y podrían interferir con la eficiencia de las reacciones. La desventaja de realizar esta purificación es que no se recupera totalmente la fracción de 20-30 nt, por lo que debe iniciarse con una cantidad mayor de RNA.

Continuando con el protocolo de construcción, se realizó la ligación del adaptador 3'. En la Fig. 17 se muestran los geles de las ligaciones, y la fracción que se cortó para la purificación de los productos ligados que resultan en 38 a 48 nt de longitud.

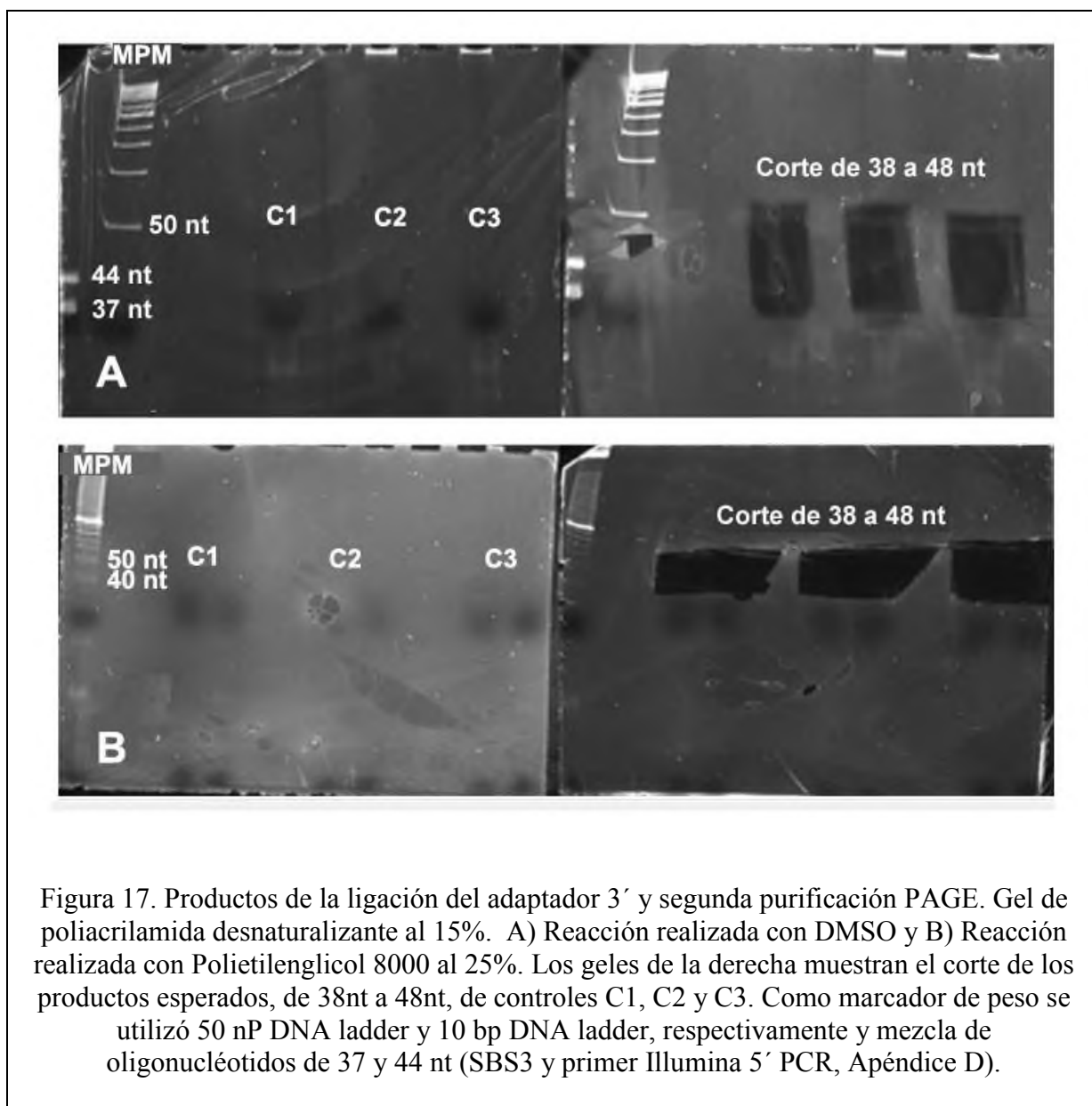


Figura 17. Productos de la ligación del adaptador 3' y segunda purificación PAGE. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15%. A) Reacción realizada con DMSO y B) Reacción realizada con Polietilenglicol 8000 al 25%. Los geles de la derecha muestran el corte de los productos esperados, de 38nt a 48nt, de controles C1, C2 y C3. Como marcador de peso se utilizó 50 nP DNA ladder y 10 bp DNA ladder, respectivamente y mezcla de oligonucleótidos de 37 y 44 nt (SBS3 y primer Illumina 5' PCR, Apéndice D).

La purificación de los productos de ligación 3' tiene por objetivo purificar selectivamente los productos del tamaño esperado y descartar el exceso de adaptador 3' libre, que podría contribuir a la formación de productos no deseados (adaptador-adaptador) en las reacciones subsecuentes. Incluso, si se empleara RNA total sin purificar previo a la ligación, este paso de purificación en gel sería útil para descartar al resto del RNA, como RNAs ribosomales, de transferencia y RNAs mensajeros que no son de interés. Aunque los protocolos comerciales no realizan la purificación PAGE, poseen algún paso para eliminar el exceso de adaptador 3' (Apéndice A).

Los productos purificados por PAGE se ligaron al adaptador 5'. En la Fig. 18 se muestra la imagen del gel realizado para separar los productos y la sección que se cortó para purificar.

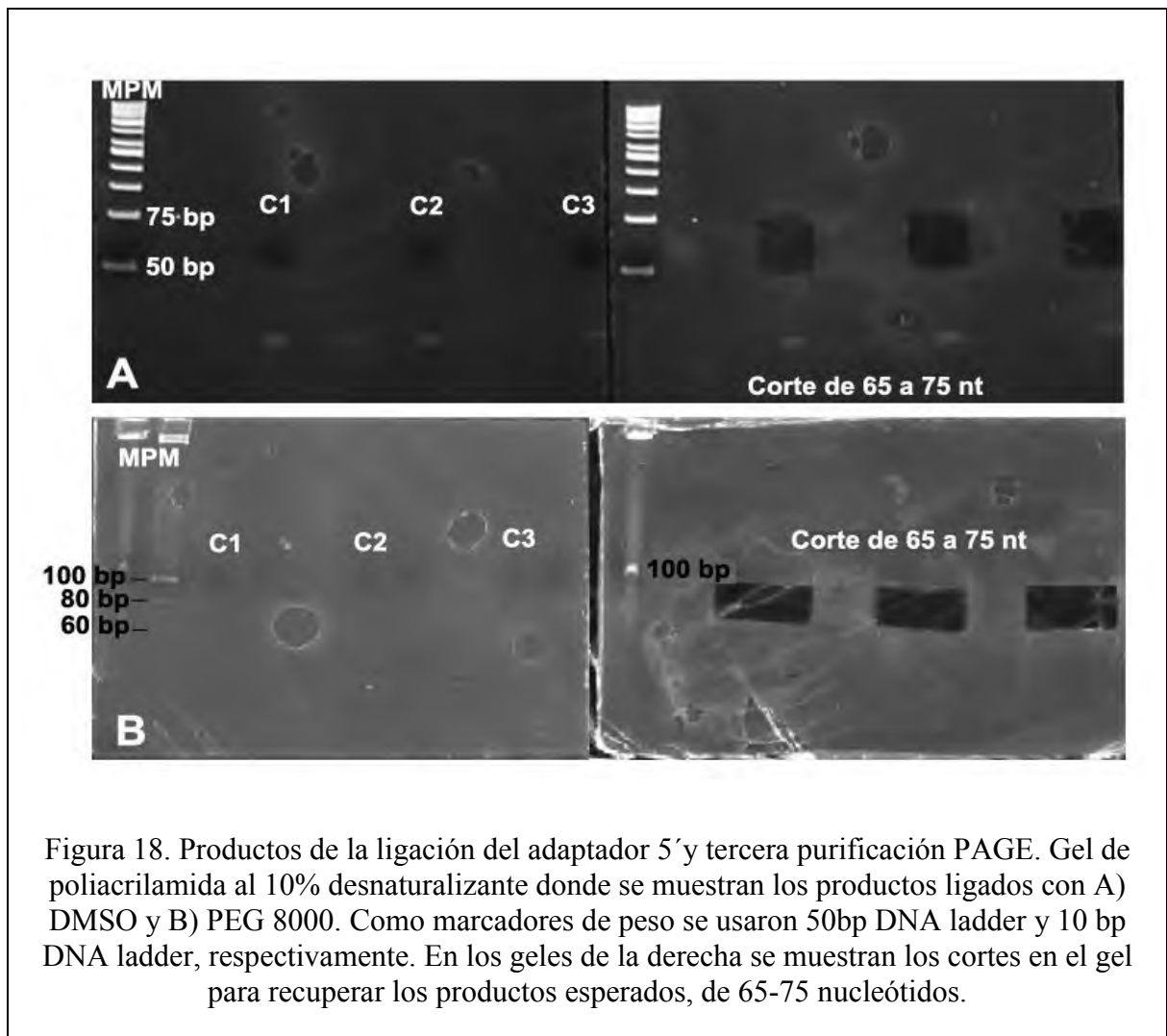
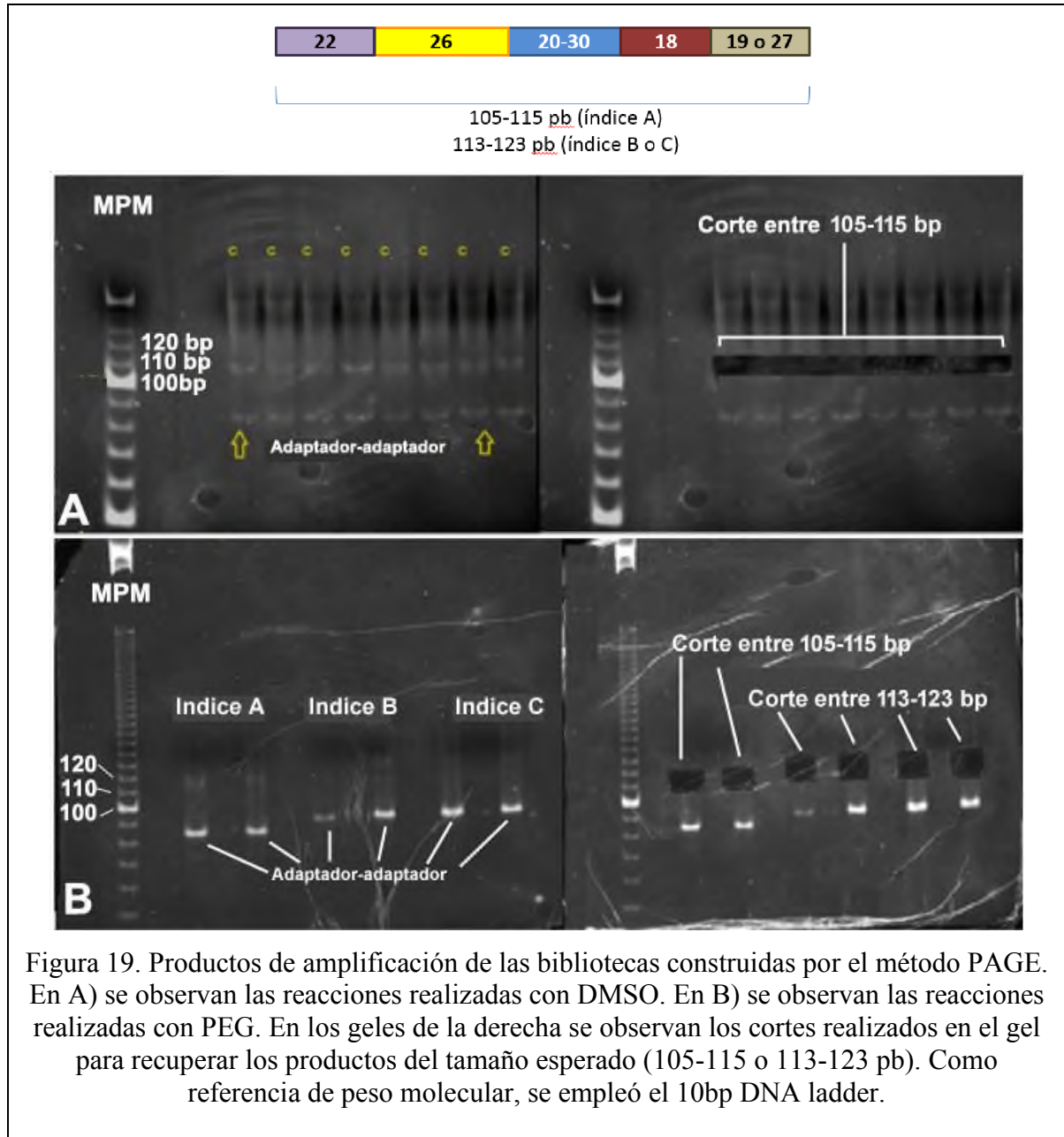


Figura 18. Productos de la ligación del adaptador 5' y tercera purificación PAGE. Gel de poliacrilamida al 10% desnaturante donde se muestran los productos ligados con A) DMSO y B) PEG 8000. Como marcadores de peso se usaron 50bp DNA ladder y 10 bp DNA ladder, respectivamente. En los gels de la derecha se muestran los cortes en el gel para recuperar los productos esperados, de 65-75 nucleótidos.

Los protocolos comerciales para la construcción de bibliotecas han eliminado la purificación de los productos después de la ligación del adaptador 5'. Teóricamente, si se elimina el exceso de adaptador 3' correctamente, el exceso de adaptador 5' no es un factor importante para la formación de productos adaptador-adaptador, ya que no se espera su autoligación por carecer de un grupo fosfato libre en su extremo 5'.

Los productos de ligación recuperados del gel se emplearon para la síntesis de cDNA y posterior amplificación de las bibliotecas mediante PCR. Los productos esperados al término de la PCR deben tener el tamaño correspondiente a la suma de longitudes del RNA pequeño (20-30 nt), el adaptador linker 1 (18 nt), el adaptador 5' (26nt), la extensión 5' (22 nt) y la extensión 3' (19 nt cuando se emplea el índice A, o 27 nt para el índice B y C), dando un total de 105-115 pb, o 113-123 pb. En la Fig. 19 se muestra un esquema de la construcción esperada y su tamaño, así como de los productos de la PCR resueltos mediante electroforesis.



Después de la reacción de amplificación se observaron productos del tamaño esperado (de 105-115 pb para el índice A, o 113-123 pb para el índice B y C, Fig. 19) lo que indica que las reacciones de ligación, retrotranscripción y PCR se llevaron a cabo satisfactoriamente. Sin embargo, también se observa la presencia de productos de tamaño menor, correspondientes a construcciones vacías adaptador-adaptador. Como puede apreciarse, estos productos menores a 100 pb, se acumulan principalmente en las reacciones realizadas

con PEG (Fig. 19, panel B), comparadas con las realizadas con DMSO (Fig. 19, panel A). Durante la construcción de las bibliotecas fue notorio que las reacciones de ligación realizadas con PEG eran más viscosas comparadas con las de DMSO, y aunque esto podría ser propicio para que se realizara la ligación de forma eficiente, es posible que haya sido un obstáculo al momento de la purificación PAGE, ya que estas muestras presentan un patrón ligeramente alterado en el corrimiento electroforético.

La formación de productos adaptador-adaptador podría deberse a que las moléculas de adaptador se distribuyen a lo largo del gel, como un barrido, por lo que se encuentran en la fracción seleccionada a pesar de que no corresponda en tamaño. De esta forma, en las reacciones subsecuentes, los adaptadores continúan presentes y se amplifican en la reacción de PCR final. Es probable que, debido a su alta viscosidad, este efecto se haya intensificado en las reacciones que contienen PEG.

8.3 Control de calidad de las bibliotecas construidas por el método PAGE.

8.3.1 Análisis del tamaño de los productos de las bibliotecas mediante PCR y digestión.

El control de calidad de los productos de las bibliotecas se realizó mediante amplificación por PCR y por digestión enzimática. En la Fig. 20 se observan los resultados de la reacción de PCR realizada a partir de los plásmidos. De acuerdo a la Fig. 20, los plásmidos poseen productos (insertos) amplificables con los primers específicos de la construcción de bibliotecas. Se observa la distribución de tamaños en los diferentes productos entre 105 y 120 pb, aproximadamente.

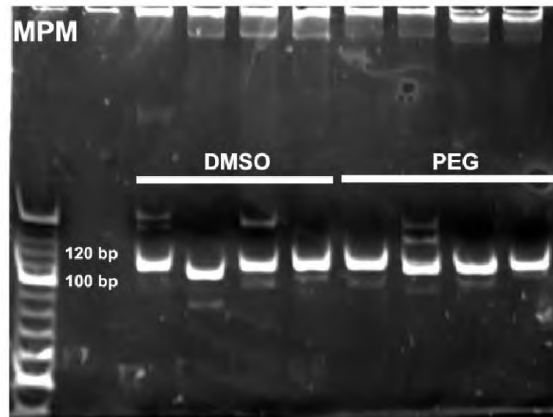


Figura 20. Productos de PCR típicos obtenidos a partir de plásmidos. Electroforesis en gel de acrilamida nativa al 6%. Se presentan los resultados de 4 muestras provenientes de bibliotecas con DMSO y 4 de bibliotecas con PEG, construidas empleando adaptadores a concentración 20 μ M.

Para realizar una segunda confirmación de que los plásmidos poseen insertos del tamaño esperado, se realizó digestión con la enzima EcoRI. Los productos de la digestión deben tener la longitud completa del inserto, más 18 bases que se encuentran en el vector entre los sitios de corte de EcoRI (Apéndice B). Esto da un total de 123 a 141 pb. En la Fig. 21 se muestran los resultados de las digestiones de 8 plásmidos.

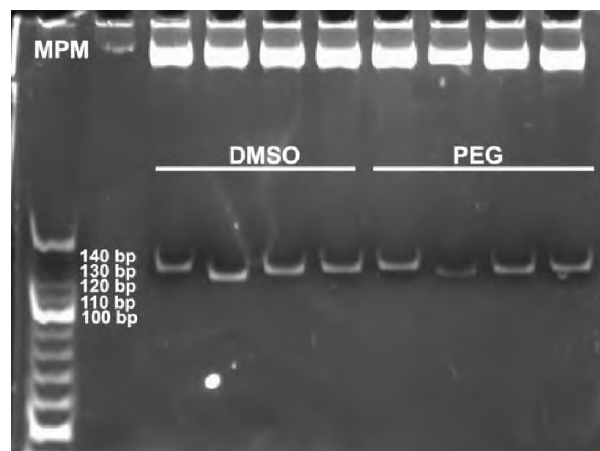


Figura 21. Productos de digestión de plásmidos. Electroforesis en gel de acrilamida nativa al 6%. Se presentan los resultados de 4 muestras provenientes de bibliotecas con DMSO y 4 bibliotecas con PEG, construidas empleando adaptadores a concentración 20 μ M. Los insertos se observan en el intervalo de tamaño esperado, de 123 a 141 pb.

8.3.2 Análisis de la secuencia de los productos individuales

Para verificar que además de tener con el tamaño adecuado, las construcciones presentan la secuencia de los adaptadores en el orden correcto y contienen RNAs pequeños, se seleccionaron 14 plásmidos para secuenciación por el método de Sanger. En la Tabla 19 se muestran las secuencias de los insertos obtenidos de las bibliotecas construidas empleando PEG8000 en los pasos de ligación.

La secuenciación de los productos obtenidos de las ligaciones con PEG8000 arrojó resultados negativos. Aunque las construcciones contienen las secuencias de los adaptadores y oligonucleótidos empleados en la construcción de las bibliotecas, no se encontraron insertos de RNAs pequeños. Se obtuvieron exclusivamente secuencias adaptador-adaptador vacíos, y en algunos casos, donde había inserto, éste era un fragmento del adaptador 5', es decir, que el adaptador compitió con los RNAs pequeños y tomó el lugar de inserto.

El adaptador 5' es RNA sin grupo fosfato en su extremo 5'. Sin grupo fosfato, no es posible que sea sustrato para que otra molécula con grupo OH libre en el extremo 3' pueda ligarlo. La única posibilidad de que el adaptador 5' actúe como inserto (como lo haría un RNA pequeño) es que su extremo 5' esté fosforilado. Esta situación puede darse si el adaptador ha sufrido degradación parcial.

El uso de PEG8000 en la reacción de ligación permite eliminar la tendencia de las T4 RNA ligasas de unir preferencialmente RNAs pequeños de cierta secuencia. De acuerdo a resultados de Song *et al.* (2014), es posible eliminar el sesgo preferencial de las T4 RNA ligasas empleando PEG8000 en las reacciones y prolongando la incubación por 4 h (a diferencia de la incubación de 1h cuando se liga en presencia de DMSO). Es probable que el tiempo de incubación prolongado a 37°C, aún cuando se adicionó inhibidor de RNAsas a la reacción, haya provocado la degradación de los RNAs pequeños y del adaptador 5', el cual además se encuentra en exceso en la reacción, dando paso a la ligación preferencial del adaptador degradado.

Tabla 19. Secuencia de productos obtenidos en las bibliotecas construidas empleando PEG8000 (P1-8) y DMSO (D1-6) en las reacciones de ligación.

Clona	Secuencia 5'-3'	Tamaño/ID
P1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACATCGGATTGATGGTGCCTACAGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	Vacío
P2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACATCGGATTGATGGTGCCTACAGGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	Vacío
P3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACATCGGATTGATGGTGCCTACAGGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	Vacío
P4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGGATCGTGGACTGTAGA AACTCTGGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	22 pb/ Adaptador
P5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGAGTGATCGTCCGACTGTGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	17 bp/ Adaptador
P6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGACGTGATGATTGATGGTGCCTACAGTGGCGACTCCGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	10 bp/ nm
P7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGACGTGATGATTGATGGTGCCTACAGTGGCGACTCCGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	10 bp/ nm
P8	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTAACCTGTCCGACTGTGGTCCGATCATT	Vacío
D1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGATTGTGATGTTTCTCAGGTTCTGTGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	24 pb/ RNA
D2	AATGATACGGCGACCACCGACAGGTTGCGAGTTCTACAGTCCGACGATCAAGCATCTAATTCAACCTG AATCCCTGTAGGCACCATCAATCGTATGCCGTCTTCTGCTTG	24 pb/ RNA
D3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGTCTTTCTGCTGAAATGAAACCTAGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	23 pb/ RNA
D4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGCGTTACAGACTCTGGCCATTATAGATCCAAAGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	23 bp/ RNA
D5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGAGGCTCAACAGGGTCTTCTGATCGTTCCGACTGTCTGACTCTGAACCTGTCTGTGGTCCGCTATCATT	21 pb/ RNA
D6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAGGCCTACGCTTATTATGGATCCGAGGATCGTCCGACTGTAGA AACTCTG AACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT	24 pb/ miRNA

Azul: Adaptador linker 1 y primer reverso. Gris: adaptador Illumina 5' y primer Illumina 5' PCR. Los insertos están subrayados. nm: no match.

Lo anterior pudo haberse agravado por el hecho de que los productos de ligación que contienen RNAs pequeños se hayan perdido en las purificaciones PAGE, debido a que la naturaleza viscosa del PEG haya ocasionado alteraciones en el corrimiento electroforético, provocando que no se hayan cortado correctamente del gel las secciones que contenían los productos deseados.

Por otra parte, la secuenciación de plásmidos con insertos de bibliotecas construidas con DMSO arrojó resultados positivos (Tabla 19). Las construcciones poseen los adaptadores y primers empleados en la construcción y se confirmó la presencia de RNAs pequeños.

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que el uso de PEG acoplado a la purificación en gel PAGE no permite la obtención de los productos deseados, por lo que se recomienda el empleo de DMSO para el método PAGE, ya que posee menor viscosidad y permite que se lleven a cabo las ligaciones y la selección correcta de los productos deseados en los geles de purificación. Las implicaciones del uso de PEG800 y de DMSO sobre la selectividad de las T4 RNA ligasas para unir preferencialmente ciertos RNAs pequeños no pueden estimarse ya que requerirían la secuenciación masiva de los productos obtenidos a partir del uso de PEG8000 y DMSO, así como la comparación de resultados, situaciones que están alejadas de los alcances de este trabajo. De acuerdo a los resultados de Song *et al.*, (2014) el uso de PEG8000 logra eliminar el sesgo de la ligación, sin embargo, no resulta útil para aplicarlo en los protocolos presentados en este trabajo, a menos que previo a la separación de los productos en gel se realice algún tipo de purificación para eliminar el PEG8000 de la reacción.

Cabe señalar que las secuencias analizadas correspondieron a insertos que se seleccionaron previamente en base al tamaño que mostraron en el análisis por PCR y digestión de plásmidos como se presentó en la sección 8.3.1, por lo que en este análisis se limitó la presencia de secuencias sospechosas de contener únicamente productos adaptador-adaptador. Sin embargo, es innegable que las bibliotecas presentaron este tipo de productos

a pesar de los pasos de purificación, por lo que se propuso analizar el efecto de la concentración de los adaptadores en la formación de estos productos.

8.4 Efecto de la concentración de los adaptadores

A la luz de los resultados obtenidos con el primer protocolo, se analizó cuáles modificaciones podrían limitar la formación de productos secundarios no deseados. Se decidió probar la influencia de la concentración de los adaptadores. Para esto se intentó ajustar las concentraciones de los adaptadores a las que utilizan los kits comerciales. Sin embargo, las compañías que venden kits, como BiooScientific, Illumina y New England Biolabs no revelan esa información. Por lo tanto, se decidió reducir la concentración de los dos adaptadores a 10 μM y 1 μM , y emplear RNA total como material de inicio. En la Fig. 22 se muestran los resultados finales de PCR de tres bibliotecas construidas con RNA purificado y adaptadores a concentración 20 μM como estándar, y con RNA purificado y concentraciones de adaptador 10 μM y 1 μM .

Además, se observa que la concentración de adaptadores tiene influencia en la formación de productos secundarios no deseados, pero no es limitante en la obtención de los productos adecuados. A mayor concentración de adaptadores, mayor la intensidad de la banda adaptador-adaptador, que es un producto no deseado. Conforme la concentración del adaptador disminuye, la concentración de productos no deseados también disminuye. Esto indica que es posible limitar la formación de productos no deseados disminuyendo la concentración de los adaptadores, sin que esto afecte negativamente la obtención de las bibliotecas.

Por otra parte, el empleo de 1 μg de RNA total en lugar de la fracción de 20-30 nt obtenida a partir de 200 μg de RNA total, produce resultados similares. La única diferencia es que usando la fracción purificada a partir de RNA, se limita la presencia de productos de tamaño elevado en las bibliotecas. Estos productos provienen de RNAs ribosomales

pequeños o RNAs de transferencia que se encuentran naturalmente presentes en la muestra de RNA total, pero no afectan la formación del producto deseado.

De acuerdo a los resultados, es posible iniciar la construcción de bibliotecas con RNA total, en cantidades bajas, y limitar la formación de productos no deseados controlando la concentración de los adaptadores.

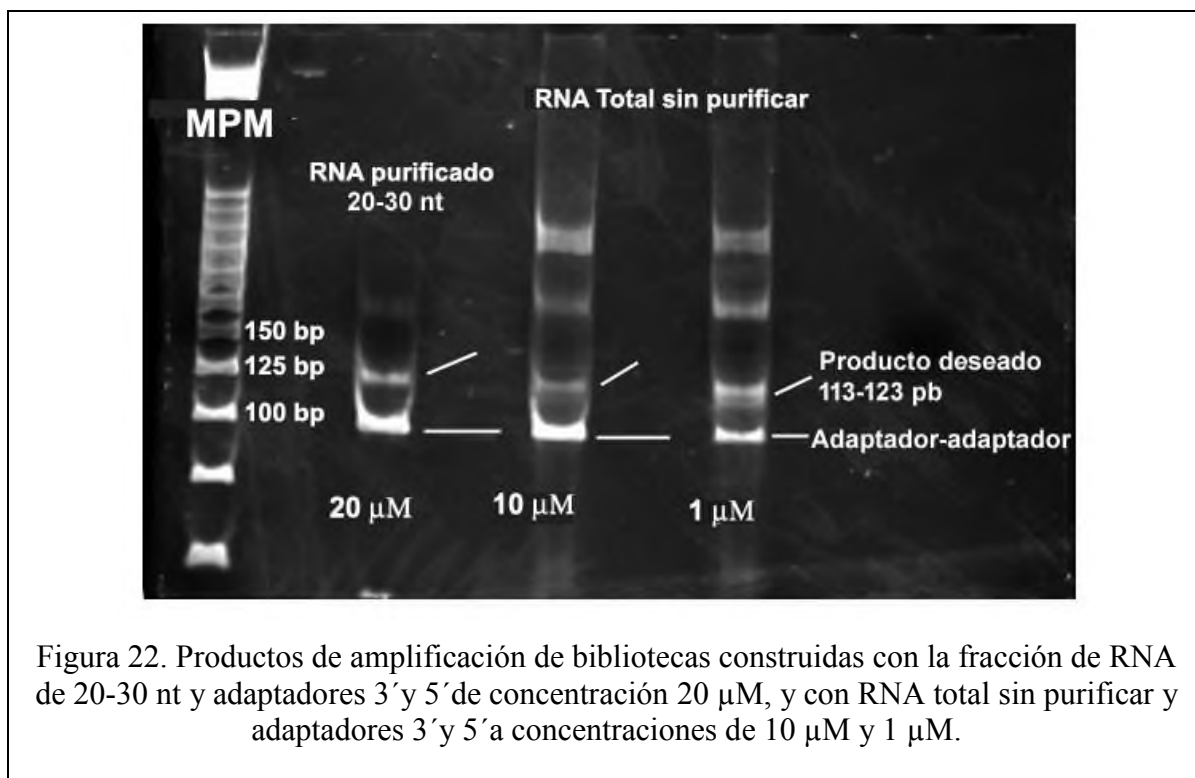


Figura 22. Productos de amplificación de bibliotecas construidas con la fracción de RNA de 20-30 nt y adaptadores 3' y 5' de concentración 20 μM, y con RNA total sin purificar y adaptadores 3' y 5' a concentraciones de 10 μM y 1 μM.

8.5 Construcción de bibliotecas por el método directo.

Con base en los resultados anteriores, se elaboró el método directo para construir bibliotecas de RNAs pequeños que incorporan los siguientes ajustes:

- a) Empleo de RNA total en bajas cantidades,
- b) Uso de DMSO en lugar de PEG8000 en las ligaciones,
- c) Adición de adaptadores en bajas concentraciones (1 μ M),
- d) Eliminación de las purificaciones en gel PAGE.
- e) Adición de índices adecuados para la secuenciación en la plataforma Illumina y extensión de la secuencia para facilitar su lectura.
- f) Empleo del primer Illumina 5' PCR TruSeq en lugar del primer Illumina 5' PCR para ajustarse a la secuencia actualizada de Illumina.

Estas modificaciones tienen por objetivo disminuir la cantidad de RNA necesario para la construcción y los pasos de manipulación de las muestras. Además, adiciona todas las secuencias necesarias para la lectura de RNA pequeños y del índice a través de la plataforma Illumina.

Particularmente, la modificación del inciso e) fue necesaria ya que la lectura del índice emplea un oligonucleótido que las construcciones originales del método PAGE no incluía. Para adicionarlas, se diseñó el oligonucleótido BRIDGE, el cual es empleado en la reacción de retrotranscripción para incorporar la secuencia faltante en el cDNA, tal como se presenta en la Fig. 23.

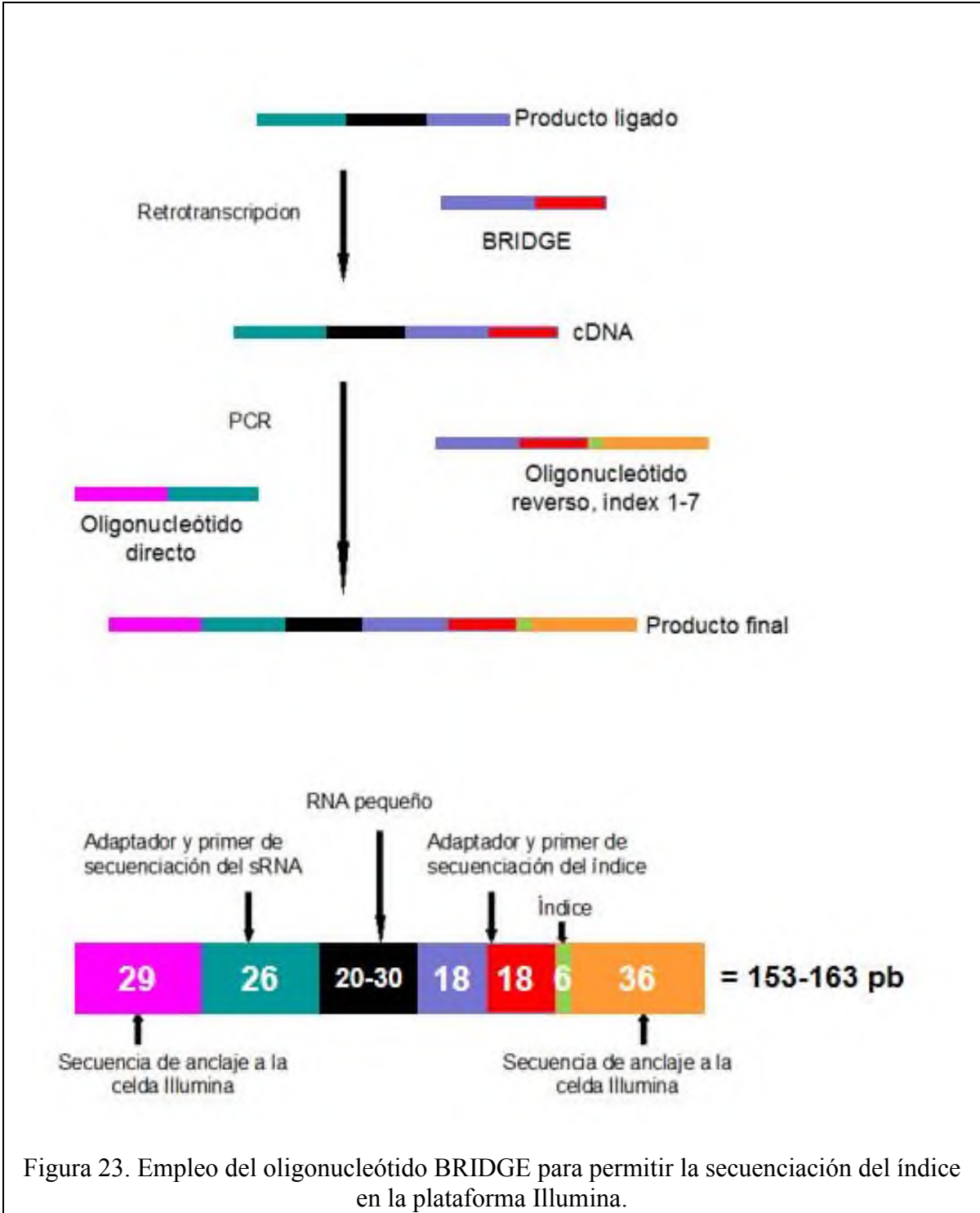


Figura 23. Empleo del oligonucleótido BRIDGE para permitir la secuenciación del índice en la plataforma Illumina.

En la Fig. 24 se muestran los resultados de la construcción de bibliotecas con el método directo. Se observa la obtención de productos del tamaño deseado.

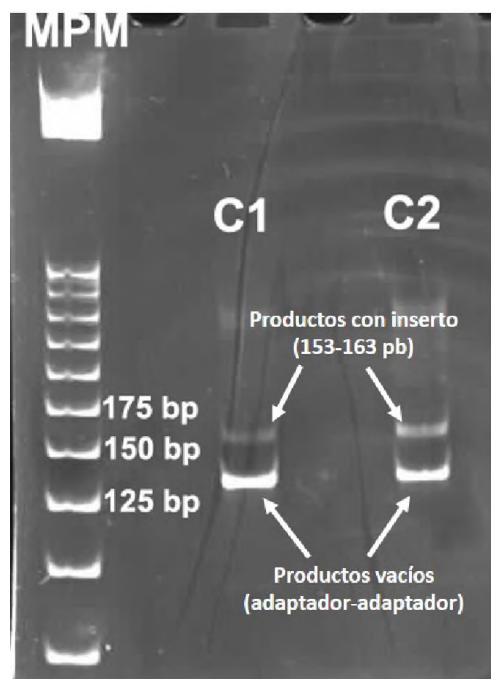
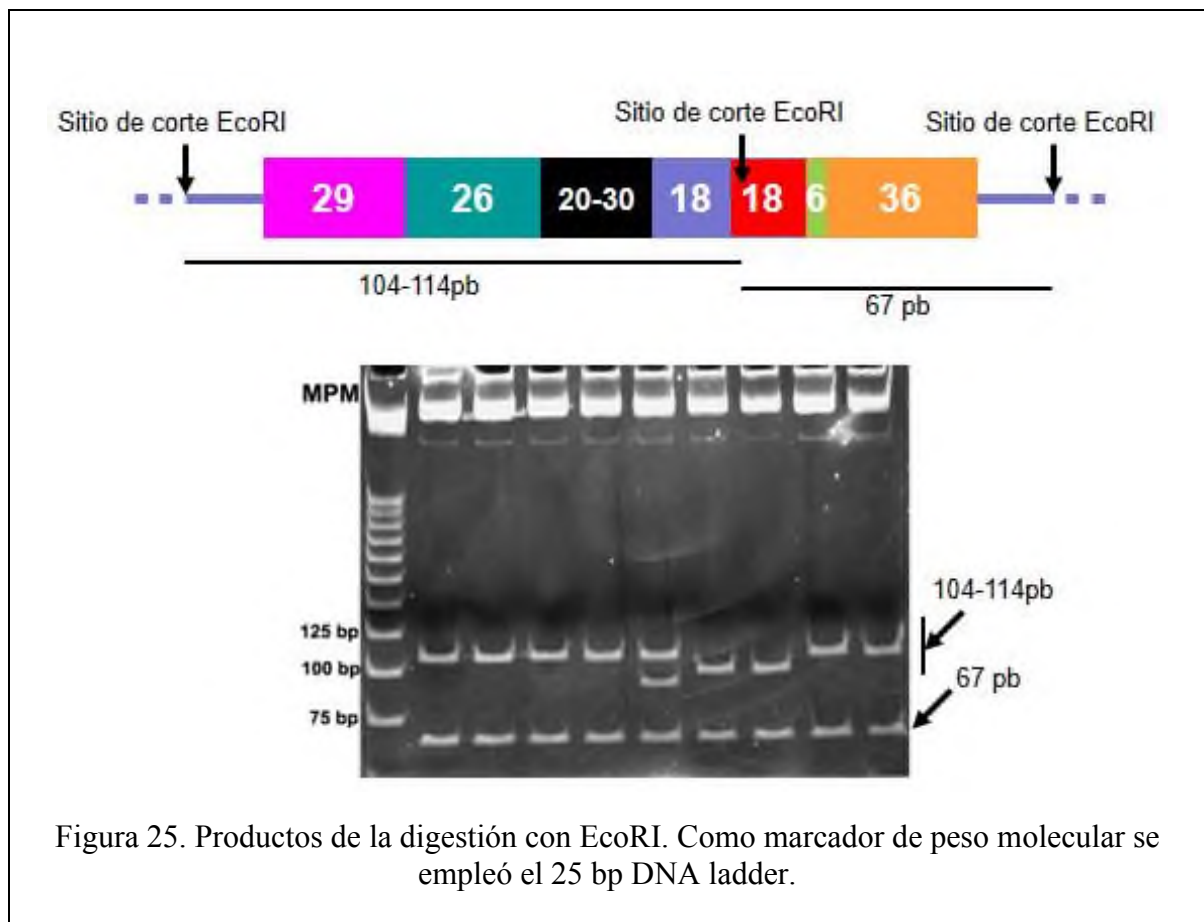


Figura 24. Productos de amplificación de las bibliotecas construidas por el método directo. Como marcador de peso molecular se empleó el 25bp DNA ladder. Los productos con inserto se señalan con flechas entre las bandas de 150 y 175 pb del marcador. Los productos vacíos se observan entre 125 y 150 pb.

Los productos de 153 a 163 pb se cortaron del gel y se prepararon para ligación en pGEM-T-Easy y transformación de *E. coli*. Los plásmidos obtenidos se digirieron con EcoRI para liberar los insertos y analizar su tamaño previo a la secuenciación. En la Fig. 25 se muestran productos típicos de la digestión con EcoRI. Se observa la liberación de dos productos debido a que el inserto posee un sitio de reconocimiento para EcoRI interno.

Catorce clonas con insertos se enviaron a secuenciar a LANGEBIO, para verificar el orden de las construcciones. Los resultados se presentan en la Tabla 20. El análisis de las secuencias indica que las construcciones son correctas, poseen las secuencias de adaptadores y oligonucleótidos en el orden adecuado y contienen RNAs pequeños.

Notoriamente, una de las secuencias se repitió 4 veces de un total de 14 (28.5 %). Se trata de un RNA de cloroplasto de 16 nt de longitud. La secuenciación de bibliotecas que son parte de otros proyectos, por ejemplo, de plantas de maíz, que se construyeron con el método directo reveló la presencia de este RNA pequeño en abundancia similar, llegando a cubrir el 50% de las secuencias analizadas (Pulido-Barajas, tesis en proceso). Esto indica que se trata de un RNA pequeño conservado entre plantas, y que además es abundante, por lo que podría ocupar un porcentaje elevado del total de productos de la secuenciación, reduciendo así la representación relativa de RNAs de 20-30 nt que son de interés para este trabajo.



Por lo tanto, se concluye que debe existir al menos un paso de purificación PAGE, específicamente, la primera purificación (Sección 7.1.1.1 de Materiales y Métodos) para reducir la presencia del RNA de 16 nt. Cabe señalar que los kits comerciales están

diseñados para emplear RNA total como material de partida y continuar directamente con las ligaciones de adaptadores. Aunque sugieren que también puede emplearse la fracción de RNAs pequeños purificada a partir del RNA total, no advierten sobre la posibilidad de que los resultados de secuenciación presenten altos porcentajes de RNAs pequeños menores a 18 nt, como es el caso del RNA cloroplástico.

Tabla 20. Secuencia de productos obtenidos en las bibliotecas construidas empleando el método directo.

Clona	Secuencia 5'-3'	Tamaño/ID
C1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCGGCTC GGACTGTGGGCAGCATCAATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCGGTCACTTAGGCA TTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG	9 pb/ nm
C2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGCAGTTCAAGAAAGCCTGTGGAGATCGTCCGACTGTAGA ACTCTGAACGTGTAGATCTCGGTGGTTCGCCGTATCATT	21 pb/ miRNA396
C3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCGGAGCG TGATCGGGAATCGATCGGCTGTAGGCACCATCAATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACT CCAGTCACCGATGTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG	24 pb/ RNA
C4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGGTGCTCTGACCAATTGAACTACAATCCC GATCGTCCGACTGTAGA ACTCTGAACGTGTAGATCTCGGTGGTTCGCCGTATCAT	29 pb/ RNA cloroplasto
C5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCCGTAGAC GGGCTACAGCACGGGTGCCTGTAGGCACCATCAATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACT CCAGTCACCGATGTATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG	24 pb/ RNA
C6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGCCAGATCATGAATTAGATCGTCCGACTGTAGA ACTCTGAA CGTGTAGATCTCGGTGGTTCGCCGTATCAT	16 pb/ RNA cloroplasto
C7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGGTCAGGGTCACGACAATGATCTCGGACTGTAGA ACTCTGA ACGTGTAGATCTCGGTGGTTCGCCGTATCAT	18 pb/ RNA ribosomal
C8	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGCCAGATCATGAATTAGATCGTCCGACTGTAGA ACTCTGAA CGTGTAGATCTCGGTGGTTCGCCGTATCAT	16 pb/ RNA cloroplasto
C9	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGTCCCCGATCGTCCGACTGTAGA ACTCTGAACGTGTAGATCT CGGTGGTTCGCCGTATCAT	5 pb/ nm

Continuación. Tabla 20.

C10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGCCAGATCATGAATTAGATCGTCGGACTGTAGAACTCTGAA CGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCAT	16 pb/ RNA cloroplasto
C11	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGCCAGATCATGAATTAGATCGTCGGACTGTAGAACTCTGAA CGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCAT	16 bp/ RNA cloroplasto
C12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTACAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTAAGGG AACCACACGTGAGGA <u>CTGTAGGCACCATCAATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCA</u> <u>GTCACCGATGTATCTCGTATGCCGTCTTCAATC</u>	21 pb/ RNA
C13	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTC CAGATTGATGGTGCCTACAGGGTCAGGGTACGAGATCGTCGGACTGTAGAACTCTGAACG TGATAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCAT	15 bp/ RNA ribosomal
C14	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGTTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCAG ATTGATGGTGCCTACAGCAGAGCTCCCTTCAATCCAAAGATCGTCGGACTGTAGAACTCTG AACGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCAT	21 pb/ miRNA159

En azul se muestra el extremo 3' que contiene el linker 1 y el primer reverso. En gris se muestra el extremo 5' que contiene el adaptador Illumina 5' y el primer Illumina 5' PCR. Los insertos están subrayados. nm: no match.

8.6 Análisis de costos de producción

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo para la construcción de bibliotecas, los dos métodos propuestos difieren en simplicidad y costo. El análisis de costos de producción de las bibliotecas (Tabla 21, Apéndice E) arroja como resultado que la construcción de 24 bibliotecas de RNAs pequeños siguiendo el método PAGE tiene un costo de \$25,614.65 en términos de materiales consumibles, mientras que el método directo propuesto en este trabajo se reduce a \$16,887.52 (Tabla 21, en color azul).

Las alternativas a realizar la construcción de bibliotecas son la compra de kits y la contratación del servicio de preparación de las bibliotecas para secuenciación. El costo de un kit para preparar 24 bibliotecas, como NextFlex y NEBNext es de \$29,000.00. El kit de Illumina para preparar 24 bibliotecas alcanza los \$56,000.00. La contratación del servicio de secuenciación tiene costos desde \$51,518.00 hasta \$152,558.00 por 24 bibliotecas (Tabla 21, en color rojo). El costo del método directo propuesto en este trabajo se reduce aún más (hasta \$14,313.99, Tabla 21, color azul) si en los cálculos se consideran únicamente los reactivos que contienen los kits comerciales, los cuales no incluyen los materiales para la preparación de geles de purificación.

Es comprensible que los kits superen los costos de la construcción de bibliotecas porque en algunos casos emplean enzimas de marca propia (p. ej. la AIR ligasa del kit NextFlex), han optimizado la concentración de sus adaptadores y ofrecen garantía a los usuarios. También incluyen controles de calidad o cuentan con tecnología patentada para reducir la formación de productos secundarios no deseados. En el caso de las empresas que ofrecen el servicio de construcción de bibliotecas, la compra de los kits corre por su cuenta, deben pagar a sus trabajadores experimentados y además deben garantizar el trabajo. En todos los casos, la construcción de bibliotecas es un procedimiento laborioso que requiere experiencia. El protocolo propuesto simplifica el proceso de construcción para disminuir los pasos de manipulación de la muestra, además de que es económicamente viable para un laboratorio de biología molecular básico con presupuesto regular.

Tabla 21. Costos de producción de 24 bibliotecas de RNAs pequeños con el método PAGE, método directo, kits comerciales y servicios profesionales de empresas mexicanas para la construcción de bibliotecas.

Método	Paso del protocolo	Geles/buffers Ladder	Purificación	Filtros	Ligaciones	Transcripción Reversa	PCR	TOTAL
MÉTODO PAGE	7.1.1.1	\$631.57 \$1,638.08 \$383.84	\$52.62 \$80.64	\$1,394.00	0	0	0	\$4,180.75
	7.1.1.2	\$ 180.40 \$108.00 \$472.00	\$52.62 \$80.64	\$1,394.00	\$7,930.32	0	0	\$10,217.98
	7.1.1.3	\$151.46 \$108 \$472.00	\$52.62 \$80.64	\$1,394.00	\$1,190.64	0	0	\$3,449.36
	7.1.1.4	0	0	0	0	\$4,146.12	0	\$4,146.12
	7.1.1.5	\$128.72 \$270.00 \$472.00	\$52.62 \$80.64	\$1,394.00	0	0	\$1,222.46	\$3,620.44
	TOTAL	\$5,016.07	\$533.04	\$5,576	\$9,120.96	\$4,146.12	\$1,222.46	\$25,614.65
	% GASTO	19.58	2	21.76	35.60	16.18	4.77	100
MÉTODO DIRECTO	7.1.3.1	0	0	0	\$7,930.32	0	0	\$7,930.32
	7.1.3.2	0	0	0	\$1,190.64	0	0	\$1,190.64
	7.1.3.3	0	0	0	0	\$4,146.12	0	\$4,146.12
	7.1.3.4	\$128.72 \$270.00 \$472.00	\$52.62 \$80.64	\$1,394.00	0	0	\$1,222.46	\$3,620.44
	TOTAL	\$870.72	\$133.26	\$1,394.00	\$9,120.96	\$4,146.12	\$1,222.46	\$16,887.52
	% GASTO	5.15	0.78	8.25	54	24.55	7.23	100
Reactivos incluidos en kits		\$270 \$472	0	0	\$9,120.96	\$4,146.12	\$1,222.46	\$14,313.99
Kit 1	\$1,192.00 / biblioteca							\$28,607.92
Kit 2	\$1,220.63 / biblioteca							\$29,295.33
Kit 3	\$2,347.64/biblioteca							\$56,343.52
Empresa mexicana 1	\$6,356.60 / biblioteca							\$152,558.4
Empresa mexicana 2	\$2,147.00 / biblioteca							\$51,528.00

Kit 1: NextFlex (BioScientific, 5132-03), Kit 2: NEBNext Multiplex (NEB, E7300S). Kit 3: TruSeq small RNA Sample Prep (Illumina, RS-200-0012). Cotizaciones realizadas en 2015. Todos los precios incluyen IVA.

Una de las aportaciones más importantes del protocolo que se propone es que, al ser económico, permite la construcción de un número mayor de bibliotecas, pudiendo incluir varias réplicas biológicas que serán útiles para mejorar el valor estadístico en el análisis de los datos.

8.7 Análisis de tiempo de preparación

Los dos métodos propuestos se realizaron en jornadas de trabajo de 8 horas diarias. Considerando que el manejo de un número alto de muestras de forma simultánea podría reducir los tiempos de preparación, pero que también podría inducir errores, se concluyó que la preparación de 6 bibliotecas simultáneas era un número adecuado. Además, la disponibilidad de los equipos en el laboratorio (por ejemplo, una cámara para 2 geles de acrilamida grandes) es limitante en el sentido de que sólo se pueden procesar 6 muestras a la vez. En la Tabla 22 se muestran los tiempos requeridos para llevar a cabo la construcción de 6 bibliotecas de RNAs pequeños empleando los protocolos propuestos. De acuerdo a esto, el método PAGE requiere 5 días de trabajo, mientras que el método directo puede completarse en 2 días.

Tabla 22. Inversión de tiempo necesaria para realizar 6 bibliotecas de RNAs pequeños empleando los protocolos propuestos en este trabajo.

Método PAGE	
Paso - actividad	
Día 1	7.1.1.1 Preparación de muestra, corrimiento electroforético, corte de la fracción de 20-30 nt y elución toda la noche
Día 2	7.1.1.1 Recuperación de la fracción 20-30 nt 7.1.1.2 Reacción de ligación, corrimiento electroforético, corte de productos y elución toda la noche.
Día 3	7.1.1.2 Recuperación de los productos. 7.1.1.3 Reacción de ligación, corrimiento electroforético, corte de productos y elución toda la noche.
Día 4	7.1.1.3 Recuperación de productos. 7.1.1.4 Reacción de transcripción reversa. 7.1.1.5 Reacción de PCR.
Día 5	7.1.1.5 Corrimiento electroforético y recuperación de productos. Cuantificación de las bibliotecas.
Método Directo	
Paso - actividad	
Día 1	7.1.3.1 Reacción de ligación 7.1.3.2 Reacción de ligación 7.1.3.3 Transcripción reversa 7.1.3.4 Reacción de PCR
Día 2	7.1.3.4 Corrimiento electroforético y recuperación de productos. Cuantificación de las bibliotecas.

8.8 Establecimiento del sistema de estudio *B. distachyon* y perfil temporal de desarrollo.

En este trabajo se eligió a *Brachypodium distachyon* Bd21 como modelo de estudio por tratarse de una monocotiledónea con genoma secuenciado y ciclo de vida corto. Aún cuando existen reportes sobre el ciclo de vida de *B. distachyon*, fue necesario cultivar la especie en las condiciones el cuarto climático y cámara de crecimiento del laboratorio para identificar cada una de sus etapas de desarrollo y su temporalidad. Para esto se establecieron cultivos a dos fotoperiodos, tal como se indica en la sección 7.5.1 de Materiales y Métodos.

Los resultados confirmaron que el fotoperiodo produce diferencias en la duración del ciclo de vida de *B. distachyon* si se toma como referencia el tiempo a floración. En el fotoperiodo largo (20 h luz / 4 h oscuridad), el tiempo a floración ocurre en el día 25 (± 2), mientras que en el fotoperiodo regular (16h luz / 8 h de oscuridad) ocurre el día 46 (± 5) (Fig. 26).

Los tiempos de vida registrados en este trabajo coinciden con los reportes previos del ciclo de vida de *B. distachyon* Bd21 para el fotoperiodo largo (Schwartz *et al.*, 2010).

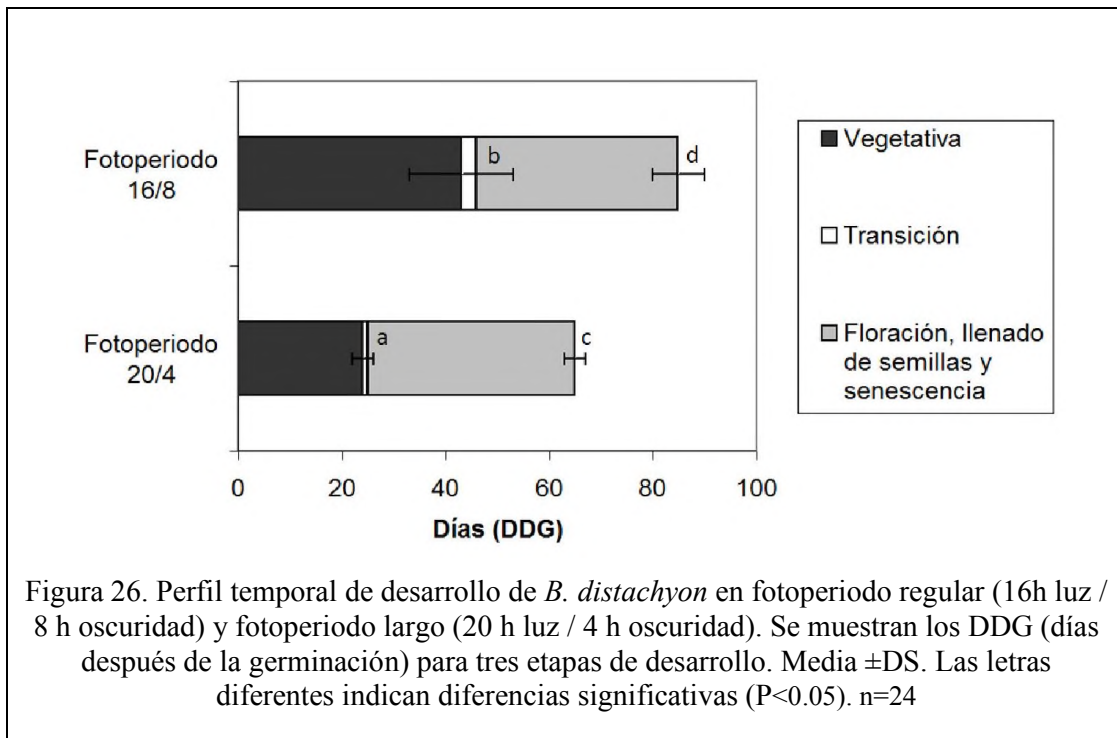
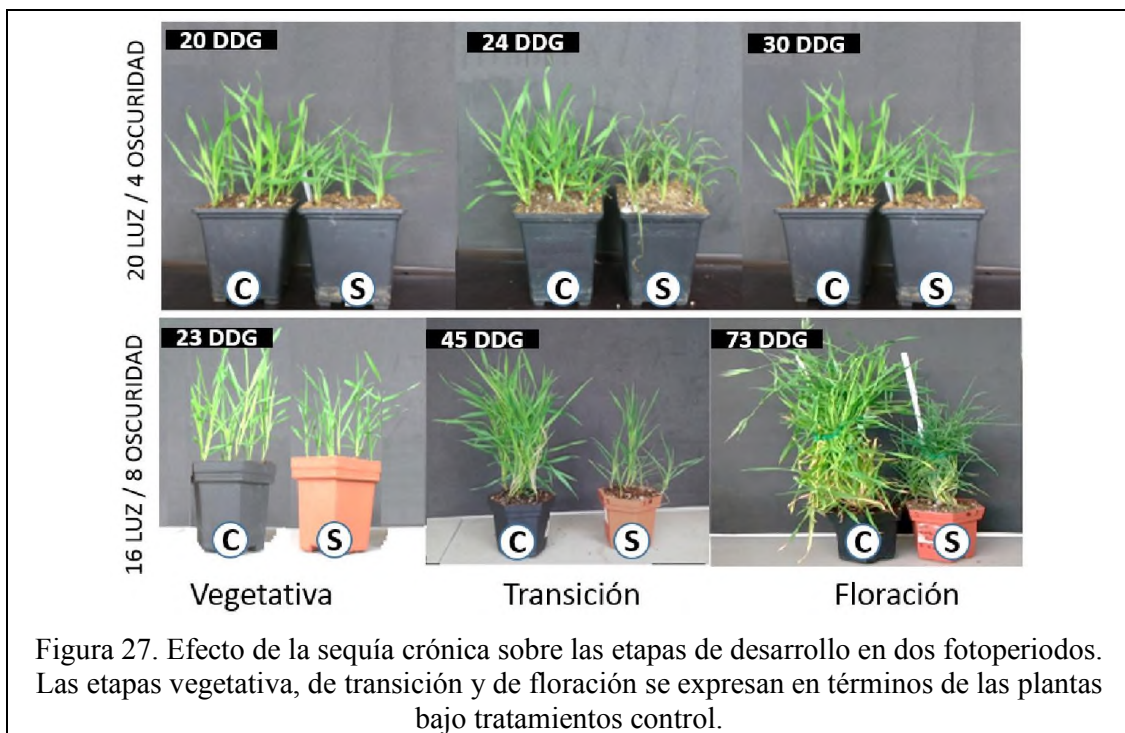


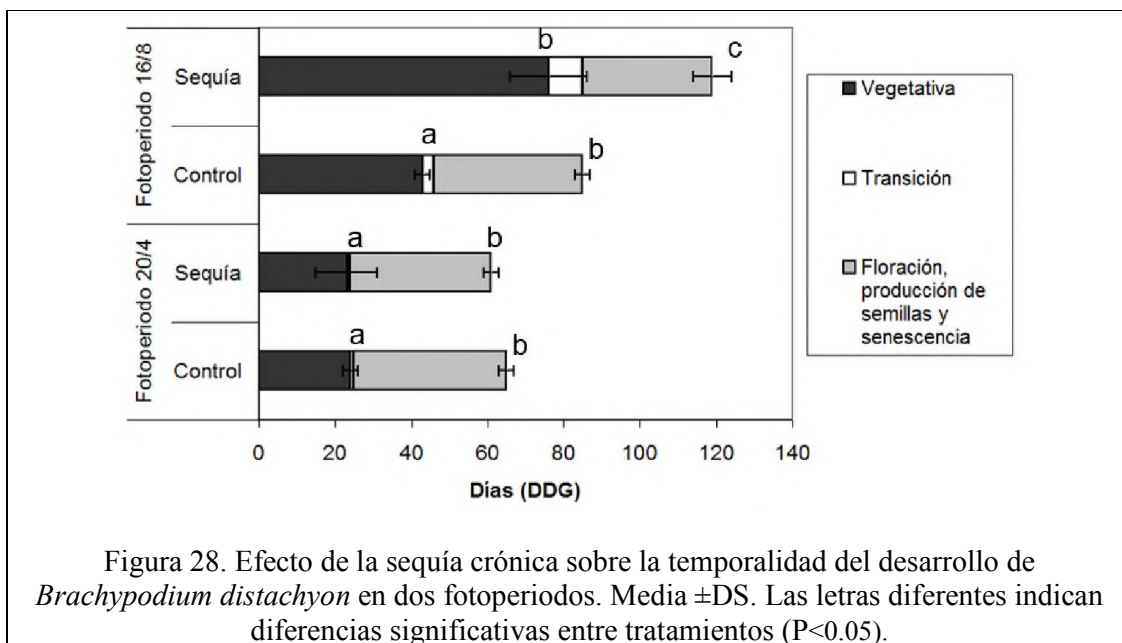
Figura 26. Perfil temporal de desarrollo de *B. distachyon* en fotoperiodo regular (16h luz / 8 h oscuridad) y fotoperiodo largo (20 h luz / 4 h oscuridad). Se muestran los DDG (días después de la germinación) para tres etapas de desarrollo. Media \pm DS. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). $n=24$

8.9 Efectos de la sequía sobre *B. distachyon*

Con la finalidad de investigar el efecto de la sequía crónica sobre el ciclo de vida y parámetros de desarrollo de *B. distachyon*, se diseñaron experimentos para inducir un estado permanente de déficit hídrico suficiente sin afectar irreversiblemente a las plantas. Las plantas sujetas a tratamiento control (con irrigación normal) y a tratamiento de estrés crónico, se observaron a lo largo de su ciclo de vida para registrar la temporalidad de su desarrollo bajo dos condiciones de fotoperiodo (largo y regular). En la Fig. 27 puede observarse el efecto de la sequía crónica sobre el desarrollo en los dos fotoperiodos.

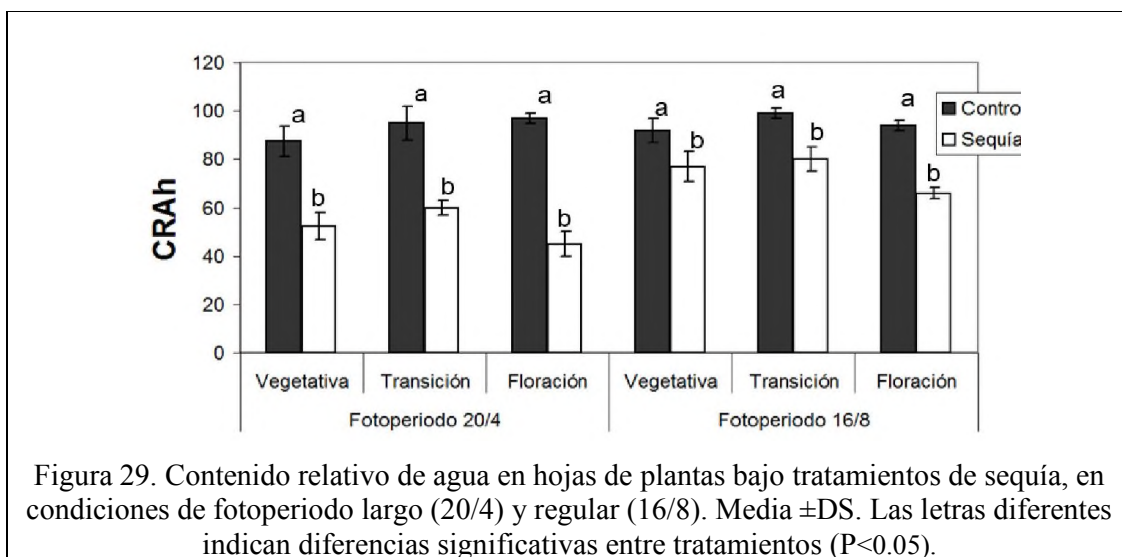


En la Figura 27 se observa que el tratamiento de sequía crónica produce cambios detectables a simple vista en las plantas, independientemente de la etapa de desarrollo. La diferencia predominante es el desarrollo de biomasa vegetativa, que es limitado cuando la planta se encuentra bajo estrés. Cabe señalar en este punto que el tipo de estrés que se ha inducido en las plantas es prolongado y de intensidad media, Por lo tanto, las plantas desarrollan respuestas adaptativas al déficit de agua, y una de éstas es la limitación de su tamaño.



El ciclo de vida, en especial el tiempo a floración, de *B. distachyon* es afectado por la sequía. Este efecto de plasticidad en el tiempo a floración es sólo perceptible en las condiciones de fotoperiodo regular (16/8). En el fotoperiodo largo no existen diferencias del tiempo a floración entre las plantas bajo tratamiento control y de sequía crónica.

Además del tiempo a floración, se registraron parámetros de desarrollo en cada una de las etapas (vegetativa, de transición, de floración), como la estatura de las plantas, el número de hojas y el número de ramificaciones. Adicionalmente, se registró el contenido relativo de agua en hojas (Fig. 29).



Los datos de contenido relativo de agua en hojas muestran que las plantas en tratamientos de estrés en el fotoperiodo largo tienen CRAh menor que las del fotoperiodo regular (Fig. 29). Esto probablemente se debe a que las plantas expuestas por más tiempo a la luz podrían intensificar su actividad fotosintética y su transpiración.

Por otra parte, se registró la estatura y el número de hojas y ramificaciones desarrolladas por las plantas en tratamientos control y bajo estrés (Figs. 30 y 31). Todos los parámetros registraron resultados afectados por el tratamiento de sequía, especialmente en las etapas de desarrollo posteriores al desarrollo vegetativo, cuando las plantas habían estado bajo estrés por un periodo prolongado. Fue notorio que en fotoperiodos largos las plantas mostraron menor crecimiento, reducción de hojas y ramificaciones comparados con el fotoperiodo regular, además de que el tiempo a floración en días largos ocurre antes que en el fotoperiodo regular, independientemente del estrés.

Las reducciones en parámetros de desarrollo debidas al tratamiento de estrés son respuestas que generalmente ocurren en las plantas cuando que experimentan sequía crónica. A diferencia de trabajos donde la sequía es progresiva y ocurre en corto tiempo, se espera que el estrés aplicado en este trabajo permita identificar nuevos elementos moleculares implicados en la respuesta al estrés crónico, que es probablemente la forma en que las plantas experimentan el déficit hídrico en condiciones naturales.

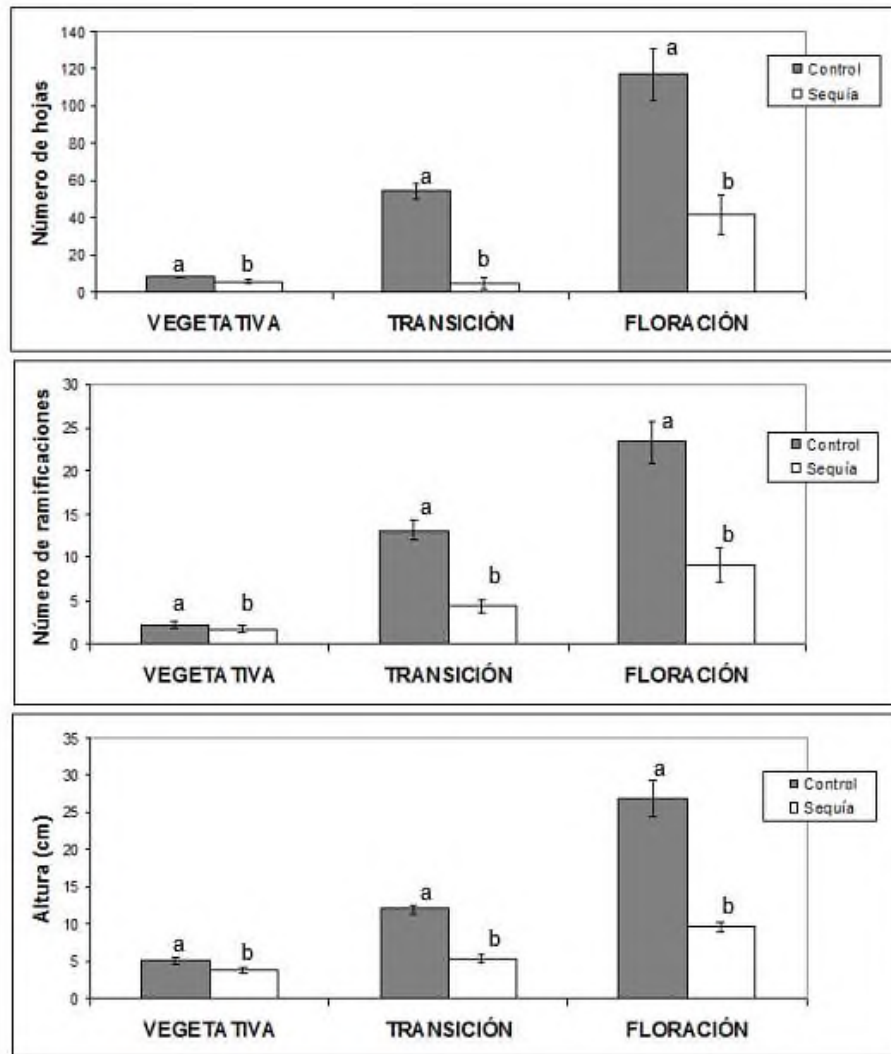


Figura 30. Efecto de la sequía y el fotoperiodo regular (16 h luz/8 h oscuridad) sobre parámetros de desarrollo en *B. distachyon*. Media \pm DS. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

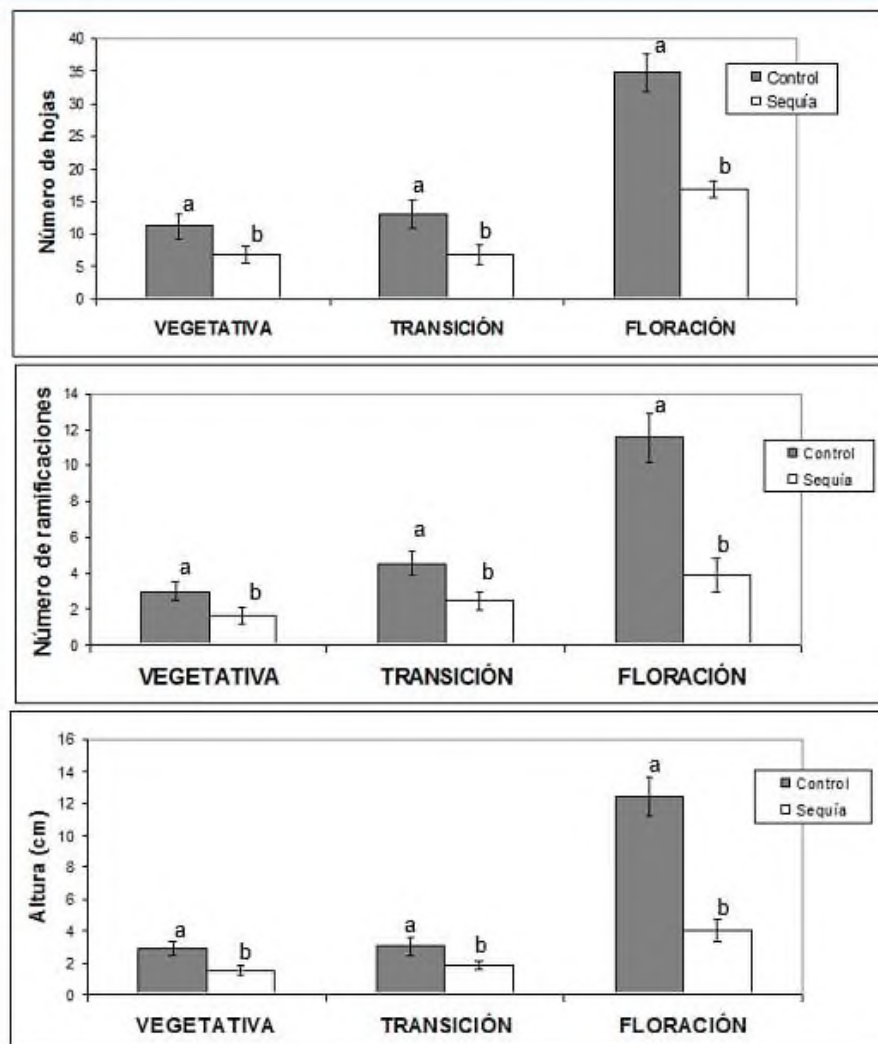


Figura 31. Efecto de la sequía y el fotoperiodo largo (20 h luz/4 h oscuridad) sobre parámetros de desarrollo en *B. distachyon*. Media \pm DS. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

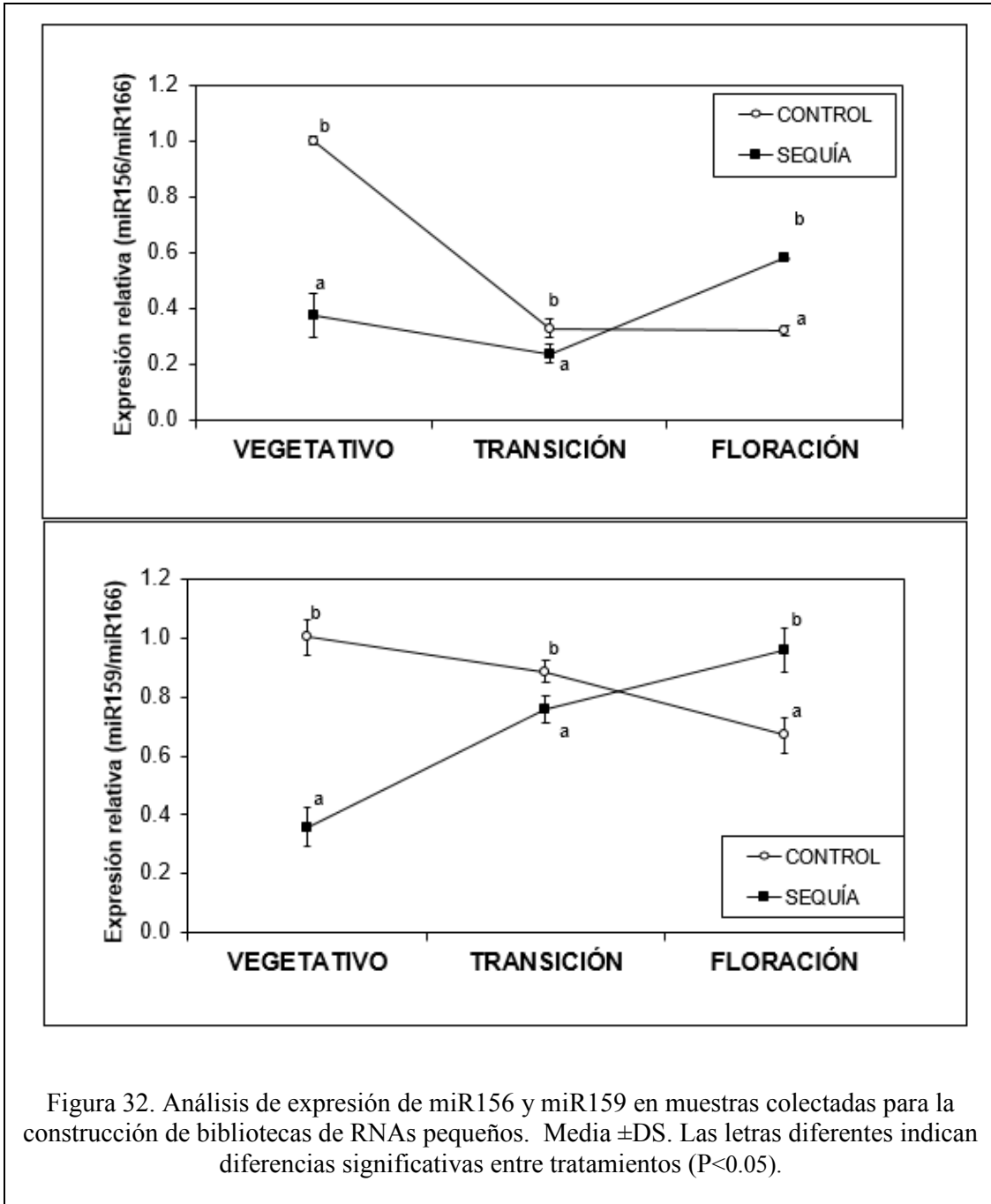
Con los resultados de los efectos de la sequía en parámetros de desarrollo de *B. distachyon*, se eligió el fotoperiodo regular para los experimentos posteriores, ya que es un fotoperiodo que asemeja más las condiciones naturales. Por lo tanto, se colectaron muestras de las tres etapas de desarrollo, en tratamientos control y sequía, para continuar con la construcción de bibliotecas empleando el protocolo propuesto en este trabajo.

8.10 Análisis de expresión preliminar de *B. distachyon*.

Previo a la construcción de las bibliotecas, se investigó la expresión de dos microRNAs individuales en las muestras colectadas. Estos microRNAs son miR159 y miR156. Se diseñaron oligonucleótidos para aplicar el método StemLoop, propuesto por Chen et al., (2005) y detectar los niveles de expresión de miR159 y miR156 en las tres etapas de desarrollo, en condiciones control y tratamiento de sequía. Los resultados se muestran en la Fig. 32.

De acuerdo a los resultados, miR156 se indujo al doble hacia la etapa de floración en *B. distachyon* bajo tratamiento de sequía, comparado con el control (Fig. 32). Se ha reportado que miR156 participa en la floración regulando negativamente a sus genes blanco, pertenecientes a la familia SPL (SQUAMOSA), los cuales son reguladores positivos de la floración. Naturalmente y bajo condiciones adecuadas, miR156 reduce su nivel de expresión cuando las plantas alcanzan la madurez para florecer, liberando los SPL de la represión para que induzcan la floración (Bertolini *et al.*, 2013; Spanudakis y Jackson, 2014; Achard *et al.*, 2004). De tal manera, el aumento en el nivel de expresión de miR156 podría ser la causa de que *B. distachyon* prolongue su fase juvenil-vegetativa y retrase por consiguiente la floración.

Por su parte, miR159 se ha asociado a la respuesta al estrés por sequía en *Vigna unguiculata* y en *Nicotiana tabacum* (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011; Frazier *et al.*, 2011), así como en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2008). También se ha comprobado que cuando miR159 se sobreexpresa, sus altos niveles tienden a inhibir la expresión de factores MYB, retrasando la floración e incluso, llegando a eliminar la producción de flores (Millar y Gubler, 2005). En el presente trabajo se confirmó que las muestras de *B. distachyon* presentan un ligero aumento de 0.3 unidades relativas en la expresión de miR159 en la etapa de transición y floración, lo cual es congruente con la observación de que las plantas bajo estrés retrasaron la floración.



Con el análisis preliminar se confirmó que las muestras colectadas eran adecuadas para los objetivos del trabajo y por lo tanto se procedió a la construcción de las bibliotecas de RNAs pequeños por el método directo.

8.11 Implementación del protocolo propuesto para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños

Las bibliotecas de RNAs pequeños se construyeron de acuerdo al método directo, con las modificaciones indicadas en la sección 7.8.3 de Materiales y Métodos, agregando un índice contenido en el oligonucleótido reverso (del 1 al 5 y el 7, Apéndice D). Se construyeron 6 bibliotecas, correspondientes a las tres etapas de desarrollo en el tratamiento control y el tratamiento de sequía crónica.

En la Fig. 33 se observan los productos obtenidos de la reacción de PCR para las bibliotecas individuales. El producto de menor tamaño, localizado entre 125 y 150 bp, corresponde al fragmento vacío, producido por la unión de los adaptadores, pero sin presencia de RNA pequeño. Este mismo producto se obtiene en el control negativo (NEG), cuya construcción se llevó a cabo con todos los componentes excepto RNAs pequeños. El producto ubicado entre 150 y 175 bp corresponde a la construcción que contiene los dos adaptadores y un RNA pequeño entre éstos, por lo tanto, los productos de este tamaño se cortaron del gel y se purificaron para su envío a la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

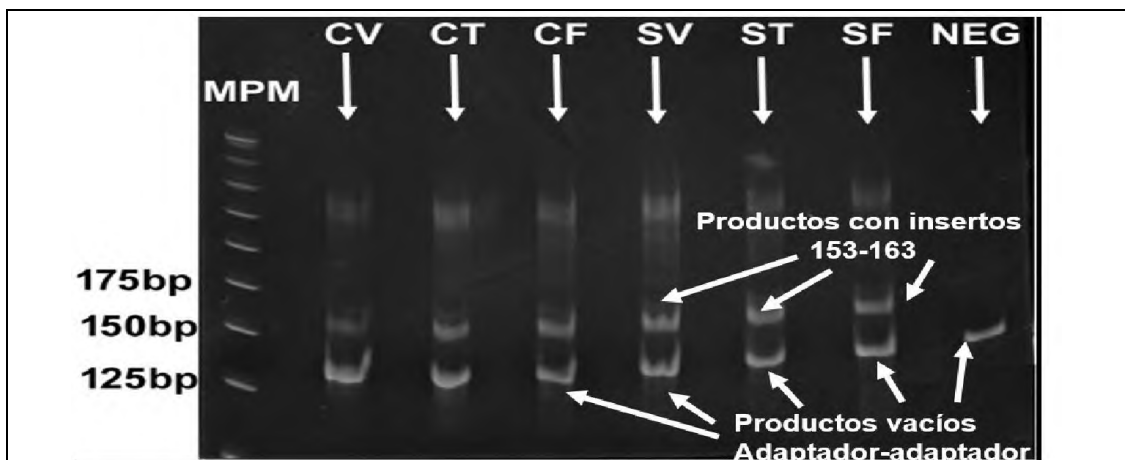


Figura 33. Productos finales de las bibliotecas de *B. distachyon* construidas a partir de plantas en tres etapas de desarrollo y dos condiciones de crecimiento. CV: Control vegetativo; CT: Control transición; CF: Control floración; SV: Sequía vegetativo; ST: Sequía transición; SF: Sequía floración. NEG: Control negativo (biblioteca construida sin RNAs pequeños).

8.12 Resultados de la secuenciación masiva

Como resultado de la secuenciación masiva, se obtuvo un total de 216, 563,580 secuencias de las 6 bibliotecas. Después de remover los productos vacíos (adaptador-adaptador), se obtuvo un total de 194, 401,830 lo que representa un porcentaje promedio de secuencias con inserto del $89.43 \pm 4\%$ por cada biblioteca secuenciada. Los resultados de la secuenciación se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. Resumen de resultados de la secuenciación masiva.

Etapas de desarrollo	Tratamiento	Número de secuencias	
		Totales	Con inserto / %
Vegetativo	Control	33,113,161	27,332,135 / 82.54
	Sequía	33,945,340	30,601,202 / 90.14
Transición	Control	31,692,781	27,808,009 / 87.74
	Sequía	38,433,131	34,674,762 / 90.22
Floración	Control	31,634,796	29,083,969 / 91.93
	Sequía	47,744,371	44,901,753 / 94.04
TOTAL		216,563,580	194,401,830 / 89.43

Uno de los objetivos más importantes de las compañías que desarrollan kits comerciales para la construcción de bibliotecas es disminuir la presencia de secuencias vacías (adaptador- adaptador) en las muestras a secuenciar. Aunque se emplean distintas estrategias para eliminar la causa de la formación de estos productos, que es principalmente el exceso de adaptadores residuales (no ligados) en las reacciones de ligación, no es posible eliminar totalmente estos productos vacíos. Por ejemplo, el kit NextFlex de BiooScientific presenta en su manual una imagen con el resultado típico de la construcción de bibliotecas, donde puede apreciarse claramente la presencia de los productos deseados y de los productos vacíos en proporción similar (BiooScientific, 2014). En el caso del kit Illumina, se emplea un oligonucleótido de RNA llamado Stop Oligo STP, el cual forma una horquilla y que se complementa con el adaptador 3' para bloquear su ligación en reacciones posteriores, limitando así su exceso (Illumina, 2014). Sin embargo, existen reportes de la aparición de “artefactos”, cuyo tamaño sugiere que algunas

moléculas del oligonucleótido bloqueador podrían estar actuando como RNA sustrato para la ligación, incorporándose a los productos con inserto.

Con el protocolo desarrollado en este trabajo, a pesar de que se ha reducido la concentración de adaptadores en las reacciones de ligación, se obtienen productos no deseados detectables en el gel de purificación; sin embargo, la purificación es suficiente para eliminar una gran cantidad de productos vacíos y obtener un alto porcentaje de productos con insertos, superior al 80% del total de secuencias, lo que permite obtener un número suficiente de secuencias para el análisis de expresión de microRNAs en sistemas biológicos como *B. distachyon*.

9. CONCLUSIONES

- Las modificaciones aplicadas a los protocolos convencionales de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños, tales como la reducción a dos pasos de purificación PAGE y la optimización de la concentración de adaptadores, fueron efectivas para el desarrollo de un protocolo *in house* que reduce el tiempo de preparación de las bibliotecas y minimiza la obtención de productos secundarios no deseados. Además, el uso del oligonucleótido bridge y de enzimas de diversas compañías reduce significativamente los costos de producción. Por lo tanto, se acepta la hipótesis 1.
- *B. distachyon* es capaz de tolerar el tratamiento de sequía crónica a lo largo de su ciclo de vida, por lo que es un buen modelo para el estudio de la respuesta molecular a dicho estrés.
- El tratamiento de sequía crónica aplicado en este trabajo tiene efectos detectables y cuantificables sobre *B. distachyon* y produce alteraciones en la expresión de microRNAs clave para la respuesta. Por lo tanto, se acepta la hipótesis 2.
- De acuerdo a los resultados de la secuenciación masiva, se concluye que el protocolo propuesto es adecuado para obtener secuencias de buena calidad y en número suficiente para el análisis de expresión de microRNAs.

10. PERSPECTIVAS

- Continuar aplicando el método propuesto en este trabajo para construir bibliotecas de RNAs pequeños que permitan el estudio de otros fenómenos biológicos en diversos organismos.
- Perfeccionar el método de construcción de bibliotecas para reducir aún más los costos. Se plantea probar la efectividad de enzimas alternativas de menor costo para sustituir a las de precio elevado.
- A partir de los resultados de secuenciación, realizar análisis bioinformático para identificar microRNAs de respuesta a sequía crónica que se expresen diferencialmente en las diferentes etapas de desarrollo de *B. distachyon*.
- Confirmar y validar la expresión de microRNAs de respuesta a sequía crónica en *B. distachyon* y extender el análisis a otras plantas monocotiledóneas.
- Analizar la expresión de microRNAs de respuesta a sequía crónica en variantes de *B. distachyon* con tolerancia al estrés y plasticidad del desarrollo contrastante.
- A partir del análisis de las bibliotecas y la identificación de microRNAs que alteran su expresión en la respuesta a sequía crónica, seleccionar microRNAs para su estudio funcional a través de la sobreexpresión en modelos vegetales.

11. REFERENCIAS

1. Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, Archer-Evans S, Manocha V, Vance V, Sundaresan V (2005) Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 15(1): 78–91.
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. Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat, *Plant Cell Environ.* 24: 1337–1344.
4. Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
5. AQUEDUCT (2015) Water risk atlas. World Resources Institute. <http://www.wri.org/applications/maps/aqueduct-atlas/>
6. 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 Molecular Biology* 10.1007.
7. Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15:2730-2741.
8. Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu Z, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu J-K, 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, Wu Z, Liu R (2013) Abiotic-stress associated microRNAs in plants: discovery, expression analysis and evolution. *Frontiers in Biology* 8: 189-197.
11. 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.
12. Barrios A N, Ritchie J, Smucker AJM (1998) El efecto de la sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en el frijol común. *Agronomía mesoamericana* 9(2): 1-8.
13. Beck EH, Fettig S, Knake C, Hartig K, Bhattarai T (2007) Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci.* 32: 501–510.
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. Chapter 5: DNA, RNA and the flow of genetic information. Ed. Freeman and Company. New York.
15. Bertolini E, Verelst W, Horner DS, Gianfranceschi L, Piccolo V, Inzé D, Pé ME, Mica E (2013) Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular Plant* 6: 423-443.
16. Biooscientific (2014) NextFlex Small RNA sequencing kit v2. <http://www.biooscientific.com/Portals/0/Manuals/NGS/5132-03-NEXTflex-Small-RNA-Seq-Kit-v2.pdf>

17. Bohnert HJ, Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations-making metabolism move. *Plant Biology* 1:267–274.
18. Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y (2004) Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(31): 11511–11516.
19. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185-90.
20. Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T., Van Montagu M, Inze D, Verbruggen N. (2000) Expression of cellcycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211: 632–640.
21. Calviño M, Messing J (2013) Discover of microRNA 169 gene copies in genomes of flowering plants through positional information. *Genome Biology and Evolution*.
22. Campos-De Quiroz (2002) Plant genomics: an overview. *Biol. Res.* 35: 385-399.
23. Chakrabortee S, Boschetti C, Walton LJ, Sarkar S, Rubinsztein DC, Tunnacliffe A (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function *PNAS* 104: 18073-18078.
24. 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. *Nucl. Acids Res.* 33: e179.
25. 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.
26. Chen X (2005) MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579: 5923- 5931.
27. CONAGUA (2015) http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=236&Itemid=74
28. Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163.
29. Dalmay T (2006) Short RNAs in environmental adaptation. *Proc. of The Royal Soc*, 273: 1579-1585.
30. Ding Y, Chen Z, Zhu C (2011) Microarray-based analysis of cadmium responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot*, 62: 3563–3573.
31. Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Mattick JS (2008) Differentiating protein-coding and non-coding RNA: Challenges and ambiguities. *PLOS Computational Biology* 4: e1000176.
32. Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Rougledge APM (2001) *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127: 1539-1555.
33. Eldem V, Okay S (2012) Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turk J Agric For* 37:1-21.
34. Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007) High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE*, 2: e219.

35. Farazi TA, Hoell JL, Morozov P, Tuschl T (2013) MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 774: 1-20.
36. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *J. Agron. Sustain. Dev.* 29: 185–212.
37. Ferreira TH, Gentile A, Vilela RD, Lacerda 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.
38. Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B (2010) Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta* 232: 1289-1308.
39. Fricke W, Akhiyarova G, Wei W, Alexandersson E, Miller A, Kjellbom P O, Richardson A, Wojciechowski T, Schreiber L, Vasselov D (2006) The short-term growth response to salt of developing barley leaf. *J. Exp. Bot.* 57: 1079-1095.
40. Ge Y, Li Y, Zhu YM, Bai X, Lv D K, Guo D, Ji W, Cai H (2010) Global transcriptome profiling of wild soybean (*Glycine soja*) roots under NaHCO₃ treatment. *BMC Plant Biol*, 10(1): 153.
41. Han Y, Zhang H, Wang Y, Ming F (2013) The Suppression of WRKY44 by GIGANTEA-miR172 Pathway Is Involved in Drought Response of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS One* 073541.
42. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S (2014) MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends in Mol Med* 20:460-469.
43. Illumina (2014) TrueSeq small RNA library prep guide. http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqsmallrna/truseq-small-rna-library-prep-guide-15004197-g.pdf
44. Illumina (2015) An introduction to next-generation sequencing technology. http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
45. Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol*, 3: 381-356.
46. Jeong DH, Green P (2013) The role of rice microRNAs in abiotic stress responses. *J. Plant Biol.* 56: 187-197.
47. Jeong DH, Schmidt SA, Rymarquis LA, Park S, Ganssmann M, German MA, Accerbi M, Zhai J, Fahlgren N, Fox SE, Garvin FD, Mockler CT, Carrington CJ, Meyers CB, and Green JP (2013) Parallel analysis of RNA ends enhances global investigation of microRNAs and target RNAs of *Brachypodium distachyon*. *Genome Biology* 14:R145.
48. Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Elsevier* 1465:324-342.
49. Johnson C, Bowman L, Adai A T, Vance V, Sundaresan V (2007) CSRDB: a small RNA integrated database and browser resource for cereals. *Nucleic Acids Res*, 35: D829–D833.
50. Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, 57: 19–53.
51. Jones-Rhoades MW, Bartel D P (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 14(6): 787–799.
52. Jung KH, An G, Ronald PC (2008) Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nat. Rev. Genetics* 9:91-101.

53. Justin S, Wood EF (2008) Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics* 31.1: 79–105.
54. Kantar M, Lucas S J, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta*, 233: 471–484.
55. Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozlic J, Meglic V (2007) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Mol. Breed.* 21: 159–172.
56. Kaya MD, Okçub G, Ataka M, Çikilic Y, Kolsarıcıa Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Agron.* 24: 291–295.
57. Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2011) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Bioch. Biophys. Acta* 1819: 137-148.
58. Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6: 262–267.
59. Koornneef M, Meinke D (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61: 909-921.
60. Kramer PJ (1983) Water relations of plants. New York Academic Press. San Diego, pp. 89-101.
61. Kumar R (2014) Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174: 93-115.
62. Kumar S, Yalaw AW (2012) Economic impacts of climate change on secondary activities: A literature review. *Low Carbon Economy* 3: 39-48.
63. Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, Bartel D P (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543): 858–862.
64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
65. Lindow M, Krogh A (2005) Computational evidence for hundreds of non-conserved plant microRNAs. *BMC Genomics*, 6(1): 119.
66. Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM (2008) MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat. Protoc.* 3: 563-578.
67. 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.
68. Liu HS, Li FM, Xu H (2004) Deficiency of water can enhance root respiration rate of drought-sensitive but not drought-tolerant spring wheat. *Agr. Water Manage.* 64: 41–48.
69. Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *The Plant Cell* 14:1605-1619.
70. Lu SF, Sun YH, Shi R, Clark C, Li LG, Chiang VL (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant cell* 17: 2186-2203.
71. Lu C, Jeong DH, KulkRNAi K, Pillay M, Nobuta K, German R, Thatcher SR, Maher C, Zhang L, Ware D, Liu B, Cao X, Meyers BC, Green PJ (2008) Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 4951–4956.
72. Lu C, KulkRNAi K, Souret FF, MuthuValliappan R, Tej SS, Poethig RS, Henderson IR, Jacobsen SE, Wang W, Green PJ, Meyers BC (2006) MicroRNAs and other small RNAs enriched in the *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase-2 mutant. *Genome Res*, 16: 1276–1288

73. Lu C, Meyers B C, Green P J (2007) Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods*, 43(2): 110–117.
74. Lu C, Tej SS, Luo SJ, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ (2005a) Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 309: 1567–1569.
75. Lu S, Sun Y H, Chiang V L (2008b) Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant J*, 55: 131–151.
76. Mallory AC, Bartel DP, Bartel B (2005) MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17: 1360-1375.
77. Maurel C, Chrispeels MJ (2001) Aquaporins. A Molecular Entry into Plant Water Relations. *Plant physiology* 125:135-138
78. McGinn J, Czech B (2014) Small RNA library construction for high-throughput sequencing. En: PIWI-Interacting RNAs: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1093.
79. NEB-New England Biolabs (2015) NEBNext Multiplex small RNA library prep for Illumina (Set 1). <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/FAC109E8FD1341339AEADA0A081814C7/Datacard%20or%20Manual E7300.pdf>
80. Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P (2006) The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2929-2945.
81. Nobuta K, Venu RC, Lu C, Beló A, Vemaraju K, KulkRNAi K, Wang WZ, Pillay M, Green PJ, Wang GL, Meyers BC (2007) An expression atlas of rice mRNAs and small RNAs. *Nat Biotechnol*, 25(4): 473–477.
82. North American Drought Monitor (2011) <http://www1.ncdc.noaa.gov/pub/data/cmb/drought/nadm/nadm-201106.pdf>
83. Pak J, Fire A (2007) Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315(5809): 241–244.
84. Palmer WC (1965) Meteorological drought. US Department of Commerce, Research Paper No. 45, 65 pp.
85. Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJ (2003) Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol.* 132: 1382–1390.
86. Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(10):3691-3696.
87. Peña-Castro JM, Gregorio-Ramírez O, Barrera-Figueroa BE (2013) Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química* 24(2): 237-246.
88. Quan RD, Shang M, Zhang H, Zhang J (2004) Improved chilling tolerance by transformation with betA gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Sci.* 166: 141–149.
89. Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev*, 20(24): 3407–3425.
90. Ramírez P, Brenes A (2002) Informe sobre las condiciones de sequía observadas en el Istmo Centroamericano en el 2001. Sistema de la Integración Centroamericana – Comité Regional de Recursos Hidráulicos.

91. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16: 1616-1626.
92. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4): 513–520.
93. Riboni M, Galbiati M, Tonelli C, Conti L (2013) GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Phys.* 162: 1706-1719.
94. Rubio Somoza I, Weigel D (2011) MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci.* 16: 258-264.
95. Schwartz CJ, Doyle MR, Manzaneda AJ, Rey PJ, Mitchell-Olds T, Amasino RM (2010) Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *Bioenerg. Res.* 3: 38-46.
96. Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, CRNAinci 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 Microarray. *The Plant Cell* 13: 61-72.
97. Song Y, Liu KJ, Wang TH (2014) Elimination of ligation dependent artifacts in T4 RNA ligase to achieve high efficiency and low bias microRNA capture. *PLoS ONE* 9: e94619.
98. Sorefan K, Pais H, Hall AE, Kozomara A, Griffiths-Jones S, Moulton V, Dalmay T (2012) Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing. *Silence* 3:4.
99. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12:301-309.
100. Sunkar R, Jagadeeswaran G (2008) In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC Plant Biol* 8: 37.
101. Sunkar R, Zhou XF, Zheng Y, Zhang WX, Zhu JK (2008) Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. *BMC Plant Biol* 8: 25.
102. Sunkar R, Zhu J K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16(8): 2001–2019.
103. Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.
104. Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, Santos DM (2010) MiR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231: 705-716.
105. Tuteja N (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signaling and Behavior* 2: 135-138.
106. Valdés-López O, Yang SS, Aparicio-Fabre R, Graham PH, Reyes JL, Vance CP, Hernández G (2010) MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytol*, 187: 805–818.
107. Vaucheret H, Béclin C, Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114:3083-3091.
108. Vaucheret H, Fagard M (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17: 29-31.

109. Verelst W, Bertolini E, De Bodt S, Vendepoele K, Demeulenaere M, Pè ME, Inzé D (2012) Molecular and physiological analysis of growth-limiting drought stress in *Brachypodium distachyon* leaves. *Molecular Plant* 6:311-22.
110. Wang M, Wang Q, Zhang B (2013) Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene* 530: 26–32.
111. Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T (2004) Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol*, 5(9): R65.
112. Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida Y (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.* 56: 1975–1981.
113. Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. *J. Exp. Bot.* 58: 1545–1555.
114. Zhang Z, Lee JE, Riemondy K, Anderson EM, Yi R (2013) High-efficiency RNA cloning enables accurate quantification of miRNA expression by deep sequencing. *Genome Biology* 14: R109.
115. 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: 585-90.
116. 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.

12. APÉNDICES

APÉNDICE A

Características de los métodos convencionales y el protocolo propuesto en este trabajo para la construcción de bibliotecas de RNAs pequeños.

	NextFlex (BiooScientific, 2014)	NEBNext (NEB, 2015)	TruSeq (Illumina, 2014)	PAGE (Lu <i>et al.</i> , 2007)	Directo (este trabajo)
Requerimiento de RNA total	1-10 µg	1-10 µg	1-10 µg	150-400 µg	1 µg (20µg si se purifica de 20-30 nt)
Purificación de RNA (20-30 nt)	Opcional	Opcional	Opcional	PAGE	Recomendado
Ligación del adaptador 3'	Adaptador preadenilado Illumina, con 4 bases degeneradas en el extremo 5' para eliminar bias	Adaptador preadenilado Illumina	Adaptador preadenilado Illumina	Adaptador preadenilado linker 1	Adaptador preadenilado linker 1
Eliminación del exceso de adaptador 3'	Separación selectiva por tamaño con partículas magnéticas	Bloqueo con el primer RT Illumina	Bloqueo con estructura stem-loop complementaria al adaptador	Purificación PAGE	NO
Ligación del adaptador 5'	Adaptador Illumina, con 4 bases degeneradas en el extremo 5' para eliminar bias	Adaptador Illumina	Adaptador Illumina	Adaptador Illumina	Adaptador Illumina
Eliminación del exceso de adaptador 5'	Separación selectiva por tamaño con partículas magnéticas	NO	NO	Purificación PAGE	NO
Síntesis de cDNA	Regular. Primer RT Illumina	Regular. Primer RT Illumina	Regular. Primer RT Illumina	Regular. Primer RT linker 1	Regular. Primer BRIDGE: Fusión linker 1-Illumina
PCR e indexado Illumina	Primers Illumina-Index	Primers Illumina-Index	Primers Illumina-Index	No se pueden usar primers Illumina-Index	Primers Illumina-Index
Purificación de productos	Purificación PAGE	Purificación PAGE	Purificación PAGE	Purificación PAGE	Purificación PAGE
Compatibilidad a la plataforma de secuenciación Illumina	Compatible	Compatible	Compatible	Compatible, pero requiere el uso de otros primers para secuenciar el index	Compatible

APÉNDICE B

AGUA DEPC

COMPONENTES	VOLUMEN
Agua desionizada	1000 mL
Dietilpirocarbonato (DEPC)	1 mL

Agregar 1mL de DEPC (Sigma, D5758) al agua desionizada y mantener en agitación toda la noche. Esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min. Mantener a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO PARA TINCIÓN

COMPONENTES	VOLUMEN
Agua desionizada	200 mL
Solución de bromuro de etidio (10mg/ml)	10 µL

GEL DESNATURALIZANTE DE AGAROSA AL 1 % (100ML) para RNA

COMPONENTES	VOLUMEN
Agarosa	1 gr
Agua DEPC	100 mL
MOPS 10X	10 mL
Formaldehído	18 mL

Disolver la agarosa en 100mL de agua DEPC (D5758), dejar enfriar un poco, cuando ya no esté muy caliente agregar el formaldehído y el MOPS mezclar cuidadosamente y proceder a guardar a temperatura ambiente.

GEL DE AGAROSA PARA ADN (100 ML)

COMPONENTES	VOLUMEN
Agarosa	1 gr
TBE 1x	100 mL

En un frasco con tapa de 250 mL añadir 100 mL de TBE 1X (Apéndice B) y 1g de agarosa. Calentar y agitar la solución en microondas o una parrilla hasta disolver la agarosa. No permitir que la mezcla se sobrecaliente.

AMORTIGUADOR TBE 10X

COMPONENTES	VOLUMEN
TRIZMA base	108 gr
Ácido bórico	55 gr
EDTA (0.5 M)	40 mL
Agua tratada con DEPC	Hasta 1000 mL

Para prepara un litro de amortiguador, diluir TRIS base en 100 mL de agua DEPC (D5758), después agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente. Agregar EDTA y aforar a 1000 mL, dejar en agitación toda la noche y esterilizar al día siguiente A 121°C por 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

GEL DE ACRILAMIDA A 15 % DESNATURALIZANTE (100 ML)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	10 mL
Acrilamida 40% (19:1 bis)	37.5 MI
Urea	48 gr
Agua DEPC	Hasta 100 mL

Para un volumen de 35mL adicionar 120 µL de APS 10% y 35 µL de TEMED (Thermo Scientific, 17919). Pesar la urea primero, adicionarlo en un frasco de vidrio. Medir la acrilamida y agregarlo cuidadosamente al frasco con la urea, adicionar luego la solución de TBE. Disolver en un horno de microondas, atemperar y aforar hasta 100mL Separar en alícuotas de 35 mL. Adicionar el APS y el TEMED (17919, Thermo Scientific) segundos antes de adicionar el gel en los cristales.

GEL DE ACRILAMIDA 10 % DESNATURALIZANTE (20mL)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	2 MI
Acrilamida 40% (19:1 bis)	5 MI
Urea	9.6 gr
Agua DEPC	Hasta 20 mL

Para un volumen de 5 mL agregar 35 µL de APS 10% y 3.5 µL de TEMED (17919, Thermo Scientific)
Pesar la urea primero, adicionarlo en un frasco de vidrio. Medir la acrilamida y agregarlo cuidadosamente al frasco con la urea, adicionar luego la solución de TBE. Disolver en un horno de microondas, atemperar y aforar hasta 20 mL
Separar en alícuotas de 5 mL. Adicionar el APS y el TEMED (17919, Thermo Scientific) segundos antes de adicionar el gel en los cristales.

GEL DE ACRILAMIDA NATIVO AL 6% (5 ML)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	500 μ L
Acrilamida 40% (19:1 bis)	750 μ L
Agua desionizada estéril	Hasta 5 mL

Mezclar la acrilamida, el agua, y el TBE 10X. Agregar 35 μ L de APS 10% y 3.5 μ L de TEMED (17919, Thermo Scientific). Agitar bien por unos segundos y proceder a agregarlo en los cristales de la cámara vertical.

ACETATO DE SODIO 3 MOLAR pH 5.2 (200 mL)

Pesar 49.22g de NaOAc grado biología molecular (mw 82.03), Disolver en 100 mL de agua destilada estéril. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y ajustar a un volumen de 200 mL con agua destilada estéril. Mezclar bien, esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

MOPS 10X

COMPONENTE	VOLUMEN
MOPS	20.927 g
Acetato de sodio	5.44 g
EDTA (0.5 M)	10 mL
NaOH (1 N)	Aproximadamente 10 mL
Agua DEPC	Hasta 500 ml

Disolver el acetato de sodio en 400 mL de agua DEPC (D5758). Adicionar al MOPS y disolver. Agregar el EDTA. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 N. Aforar a 500 mL con agua DEPC (D5758). Almacenar a temperatura ambiente.

BUFFER DE CARGA PARA RNA 5X

COMPONENTE	VOLUMEN
Formamida	3084 μ L
Formaldehido	720 μ L
MOPS 10X	4 mL
EDTA 0.5 Molar	80 μ L
Azul de bromofenol	16 μ L
Bromuro de etidio	10 mg
Glicerol	2mL
Agua DEPC	Aforar hasta 10 mL

Agregar en un tubo Corning de 15 mL con tapa y mezclar suavemente cada uno de los componentes para evitar la formación de burbujas. Dosificar en Eppendorf de 1.5 mL y almacenarlos a 4 °C.

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCION DE PLASMIDOS

SOLUCION 1

Componente	VOLUMEN (μ l)
Tris HCl	125
EDTA	100
Agua desionizada	4775
TOTAL	5000

Adicionar el EDTA al agua desionizada y disolver bien. Proceder a agregar el Tris Ácido Clorhídrico disolviendo. El Tris HCl queda a 25 mM y el EDTA a 10mM.

SOLUCION 2

Componente	VOLUMEN (μ l)
NaOH 10 Normal	100
SDS 5%	1000
Agua desionizada	3900
TOTAL	5000

Se adiciona el NaOH al agua, posteriormente se agrega el SDS quedando al final el NaOH a 0.2N y el SDS al 1%

SOLUCION 3

Componente	VOLUMEN (μ l)
Acetato de Potasio 5 molar	3000
Acido Glacial Acético	575
Agua desionizada	1425
TOTAL	5000

Disolver el acetato de potasio en el agua, posteriormente agregar al ácido acético glacial, dejando el CH₃COOK a 3M y el ácido acético glacial en 5M.

NOTA: Las soluciones 1 y 3 se mantienen a 4°C.

ELABORACION DEL MEDIO LB SOLIDO CON AMPICILINA

Materiales para preparar 600 ml de medio LB solido (20 cajas Petri).

COMPONENTES	CANTIDAD (gr)
Triptona	6
Extracto de levadura	3
NaCl	6
Agar	9
Total	24

Mezclar los componentes en 500 mL de agua destilada, elevar el pH a 7.0 con NaOH a 1M y aforar en 600 mL con agua destilada, posteriormente esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg² por 15 minutos.

Después de esterilizar, dejar enfriar un rato el medio aproximadamente a 40-45 °C y agregar en campana de flujo laminar los 600 µL de ampicilina, mezclar bien e inmediatamente vaciar en cajas Petri.

Por ultimo proceder a sellar las cajas y guardar a temperatura ambiente hasta por una semana o por un mes a 4°C.

PREPARACION DE MEDIO LB LÍQUIDO CON AMPICILINA (200 ML)

COMPONENTES	CANTIDAD (gr)
Triptona	2
Extracto de levadura	1
NaCl	2
Total	5

Se mezclan los componentes en 150 mL de agua destilada, se eleva el pH a 7.0 con NaOH 1M, se afora a 200, se esteriliza en autoclave a 15 lb/pulg2 por 15 minutos, se deja enfriar y se procede a añadir en campana de flujo laminar los 200 µL de ampicilina mezclando bien y se guarda el frasco contenedor a temperatura ambiente.

X-GAL

100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido

Disolver bien en 2mL de N, N'- dimetilformamida.

Cubrir con aluminio y almacenar a -20°C

OTRAS SOLUCIONES

PREPARACION DE EDTA 0.5 MOLAR (100 ML)

Pesar 14.612 gr de EDTA y disolver en 80 mL de agua tratada con DEPC (D5758), una vez disuelto, proceder a ajustar el pH a 8.0 con NaOH 1 molar, como paso final, aforar a 100 mL con agua en que se disolvió y esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg2 por 15 minutos.

1 LITRO DE SOLUCION DE TBE 10X

SUSTANCIA	VOLUMEN
Trizma base	108 gr
Ácido bórico	55 gr
EDTA pH 8.0	40 ml

Disolver los componentes en 800 mL de agua tratada con DEPC (D5758), proceder a aforar después a 1000mL, dejar en agitación durante toda la noche, esterilizar y guardar.

SOLUCIÓN DE NaCl 0.4 M

COMPONENTES	VOLUMEN
NaCl	0.46752 gr
Agua DEPC	20 mL

Pesar el NaCl, agregarlo al agua DEPC (D5758), mezclar bien y esterilizar a 15 lb/pulg2 por 15 minutos.

APÉNDICE C

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO SUNSHINE Y VERMICULITA

Para la preparación del sustrato, se ocupan 3 volúmenes de sustrato SUNSHINE mezcla número 3 fardo gordo 3.8 ft³ 1071 y 1 volumen de vermiculita.

Se adiciona primero el sustrato y después la vermiculita, se mezclan y se esterilizan a 15 lb/pulg² por 60 minutos. Una vez el sustrato estéril y atemperado se adiciona el fertilizante desbalanceado 15N-5P-20K (Nitrofoska Perfect) el cual se calcula con la siguiente formula:

Peso de un volumen de 1 litro de sustrato por 0.02%

El fertilizante se distribuye uniformemente en la mezcla y se guarda en un contenedor de plástico.

Maceración de muestra vegetal

MACERACION DE MUESTRAS DE *BRACHYPODIUM*

MATERIALES

Contenedor de unicel

Nitrógeno líquido

Tubos Eppendorf de 1.5 µL rotulados

Capsulas y morteros de porcelana

Espátula

Recipiente pequeño para adicionar nitrógeno.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se adiciona nitrógeno suficiente a un contenedor
- 2.- Se sacan las muestras del ultracongelador y se agregan al contenedor con nitrógeno.
- 3.- Se adiciona suficiente nitrógeno al mortero de porcelana hasta que este se ponga frío y se agrega la muestra.
- 4.- Se macera la muestra de forma uniforme y se agrega nitrógeno para evitar que la muestra se dañe, se macera hasta que la muestra tome una consistencia como un polvo.
- 5.- Una vez macerada la muestra se procede a introducir la espátula y los tubos al contenedor de nitrógeno, se sacan y se procede a adicionar la muestra a los tubos.

NOTA: No dejar que la muestra se ponga de coloración verde, para esto adicionar de vez en cuando nitrógeno, así como introducir la espátula dentro del contenedor para evitar que se pegue la muestra.

- 6.- La cantidad que se introduce en los tubos es de un volumen de 0.5 mL. En caso en que haya mucha muestra se agrega en tubos de 15 mL.

7.- Se Introducen los tubos al nitrógeno y se procede a guardarlos a -80°C .

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

MATERIALES Y REACTIVOS.

Tubos Eppendorf de 1.5 μL

Nitrógeno líquido

Recipiente pequeño para adicionar nitrógeno

Pinzas largas

Pipetas de 1000, 100 y 200 μL

Reactivo Trizol

Cloroformo

Isopropanol

Etanol al 80 %

Vortex

Puntas para pipeta

Hielo

Gradilla

Agitador de doble piso

Microcentrifuga refrigerada

Recipiente de unicel limpio

Nota: Se sacan los tubitos con muestra en un recipiente de unicel con nitrógeno para evitar que la muestra se deteriore.

PROCEDIMIENTO

1.- Se agrega a un volumen de muestra de 500 μL (anteriormente macerada) 1 mL del reactivo Trizol y se agita en el vortex para que la muestra se homogenice uniformemente e inmediatamente después se coloca en un agitador de doble piso (Cole Parmer) a fin de mantener la muestra en agitación por 5 minutos.

2.- Se adiciona a la muestra 200 μL de cloroformo y se agita con la mano durante 15 o 20 segundos y se incuba la muestra a temperatura ambiente por 3 minutos.

3.-Se Centrifuga la muestra a 13000 rpm (revoluciones por minuto) a 4°C por 15 minutos, al término de la centrifugación se distinguen 3 fases.

4.- Se retiran los tubos de la microcentrifuga y son colocados en hielo, se extrae la parte superior del tubo (fase acuosa y transparente) y se coloca en tubos nuevos, además se colocan los tubos con la fase acuosa en hielo. Se desecha el tubo con la interfase y fase orgánica.

5.- A los tubos nuevos con la fase acuosa se le agrega de nuevo 200 μ L de cloroformo y se agita con la mano por 15 o 20 segundos y se incuban por 3 minutos.

6.-Se Centrifugan por 15 minutos a 13000 rpm, en este paso se distinguen dos fases acuosas.

7.- Retirar el sobrenadante es decir la fase acuosa superior y se adicionan en tubos nuevos (colocando los tubos nuevos con el sobrenadante en hielo), se desechan los tubos con el remanente de la parte inferior.

8.- Se adicionan a los tubos con el sobrenadante 1 mL de isopropanol y agitar por 20 segundos e incubar a temperatura ambiente por 15 o 20 minutos.

9.- Se Centrifugan los tubos a 13 000 rpm por 30 minutos a 4°C, al término se retiran los tubos y se colocan en hielo. En este paso se pueden observar las pastillas de RNA.

10.-Se retira todo el contenido del tubo vaciándolo en un vaso de precipitados dejando solamente la pastilla de RNA y se colocan los tubos en hielo.

11.- Adicionar a los tubos con la pastilla de RNA 1 mL de etanol (al 80% preparado con agua DEPC (D5758) para lavar la pastilla obtenida.

NOTA: Los tubos con el etanol al 80 % pueden ser almacenados hasta 1 año a -20 °C o hasta una semana a 4 °C.

12.- Se agitan los tubos con el etanol y la pastilla en el vortex por 5 o 10 segundos y se centrifugan a 13 000 rpm a 4 °C por 15 minutos.

13.- Al término de la centrifugación se colocan los tubos en hielo y se desecha el etanol en un recipiente dejando solamente la pastilla de RNA.

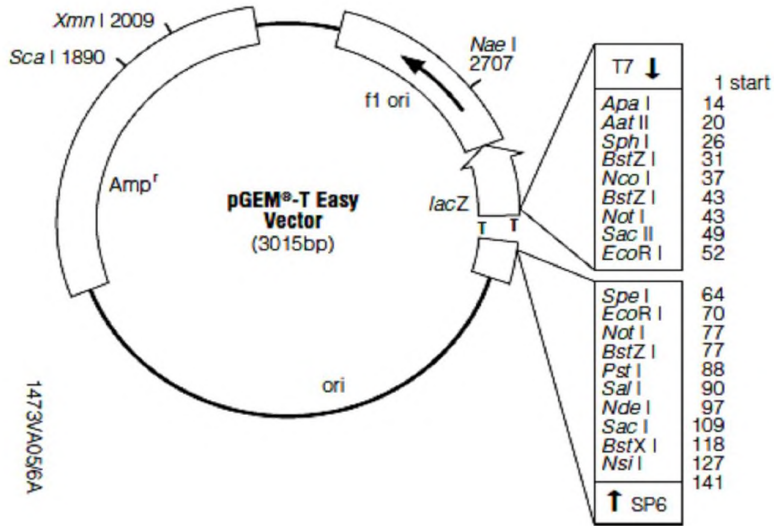
14.- Se seca la pastilla dejando escurrir muy lentamente boca abajo los tubitos con la pastilla sobre una servilleta o papel absorbente muy limpio por 10 minutos.

NOTA: No permitir que la pastilla de RNA se seque demasiado porque perderá solubilidad.

15.- A la pastilla libre de etanol, se le adiciona 30 μ L de agua DEPC (D5758) y se disuelve muy bien con una pipeta estéril.

16.- Se guardan las muestras a -80°C para experimentos posteriores.

PUNTOS DE REFERENCIA PARA LA SECUENCIA DEL VECTOR p GEM – T Easy



Sitio de iniciación de transcripción de la polimerasa	1
Región de clonación multiple	10-128
(-17 a +3) promotor de la polimerasa RNA SP6	139-158
Sitio de iniciación de transcripción de la polimerasa RNA SP6	141
Sitio de unión del adaptador de secuenciación reversa pUC/M13	176-197
Codón de inicio lacZ	180
Operador lac	200-216
Región codificante a β-lactamase	1337-2197
Región del fago f1	2380-2835
Secuencias del operon lac	2836-2996, 166-395
Sitio de unión de la secuenciación del adaptador hacia adelante pUC/M13	2949-2972
(-17 a +3) promotor de la polimerasa de RNA T7	2999-3

PROCOLO PARA LA PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS CON ACETATO DE
SODIO

- 1.- Aforar el volumen del plásmido a 300 μ L con agua (desionizada, esterilizada y tratada con luz UV), disolver bien.
- 2.- Adicionar el 10 % de acetato de sodio 3M (pH 5.2) (Apéndice B) sobre el total del volumen, mezclar bien.
- 3.- Agregar a los tubos 3 volúmenes de etanol absoluto, mezclar en el vortex.
- 4.- Incubar las muestras a -20 °C por 2 horas para permitir la sedimentación del ácido nucleico.
- 5.- Al termino de las 2 horas proceder a centrifugar por 20 o 30 minutos en una microcentrifuga refrigerada (Thermo Scientific, Fresco 21) a 4 °C y a una velocidad de 13000 rpm.
- 6.-En este paso se observa la pastilla de ADN, proceder a desechar el sobrenadante dejando únicamente la pastilla.
- 7.- Realizar 2 lavados con 1 mL de etanol al 70% centrifugando a 13000 rpm por 5 minutos y desechar el sobrenadante evitando que la pastilla de ADN no se elimine.
- 8.- Secar la pastilla en un papel muy limpio poniendo los tubos boca abajo por alrededor de 15 minutos o retirar el agua con una punta estéril.
- 9.- Diluir la pastilla en 20 μ L de Amortiguador de elución.
- 10.- Medir la concentración en el nanodrop.

APÉNDICE D

SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS, ADAPTADORES Y SONDAS

Adaptador Linker 1 (IDT)

5'-rAppCTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/-3'

Adaptador Illumina 5' (IDT)

5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC 3'

Oligonucleótido RT

5'-ATTGATGGTGCCTACAG-3'

Primer Illumina 5' PCR

5'-ATGATACGGCGACCACCGACAGGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA-3'

Primer Illumina 5' PCR TruSeq

5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA-3'

Oligonucleótido reverso, índice A

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGATTGATGGTGCCTACAG-3'

Oligonucleótido reverso, índice B

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGACGTGATGATTGATGGTGCCTACAG-3'

Oligonucleótido reverso, índice C

5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAACATCGGATTGATGGTGCCTACAG-3'

Oligonucleótido BRIDGE

5'-CCTTGGCACCCGAGAATTCCAGATTGATGGTGCCTACAG-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 1

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 2

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 3

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 4

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 5

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, índice 7

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTACTGGAGTTCCTTGGCACCC
GAGAATTC-3'

Oligonucleótido Stem Loop miR166, SL-166

5' AAATTGCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGTCAGAGCCACCTGGGCA
ATTTGGGGAA - 3'

Oligonucleótido Stem Loop miR156, SL-156

5'AAATTGCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGTCAGAGCCACCTGGGCA
ATTTGTGCTC - 3'

Oligonucleótido Stem Loop miR159, SL-159

5'AAATTGCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGTCAGAGCCACCTGGGCA
ATTCAGAGC - 3'

Oligonucleótido directo miR166

5'-GTGACTCGGACCAGGCTTCA-3'

Oligonucleótido directo miR156

5'-GCGCGGGTTGACAGAAGAGAGC-3'

Oligonucleótido directo miR159

5'- CGGCTGCGTTTTGGATTGAAGGG-3'

Sonda TaqMan universal

FAM/CAGAGCCAC/ZEN/CTGGGCAATTT/3IABkFQ

APÉNDICE E

DESGLOSE DE GASTOS DE PRODUCCIÓN DE BIBLIOTECAS

Desglose de costos MÉTODO PAGE

Sol. TBE 10X

Componente	1000 ml	Costo por litro
TRIZMA base	108g	\$186
Ácido bórico	55g	\$51.48
EDTA	5.84g	\$11.92
TOTAL		\$249.4

7.1.1.1 Selección de RNAs de 20-30 nt. Primera purificación en gel PAGE (

Gel 15% desnaturalizante

Componente	100 ml	Costo por 100 ml	Costo por 280 ml (8 geles/24 RNAs)
Acrilamida	37.5 ml	\$108.71	\$ 631.568
Urea	48 g	\$114.36	
TBE10X	10 ml	\$2.49	
TOTAL		\$225.56	

Buffer de carga II (Para 400 µg de RNA total)

Costo por RNA (266 µl c/u)	Costo por 24 RNAs
\$59.94	\$1438.56

Buffer de carga II (Para 12 µg de RNA total)

Costo por RNA (12 µl c/u)	Costo por 24 RNAs
\$2.70	\$64.80

ZR ladder

Cantidad por gel	Costo por gel grande	Costo por 8 geles/24 RNAs
15 µl	\$47.98	\$383.84

TBE 1X

Cantidad por corrida	Costo por corrida	Costo por 4 corridas /8 geles
2 l	\$ 49.88	\$199.52

NaCl (sol. 0.4M)

Costo por muestra \$1.15 x muestra	Costo por 24 muestras
	\$27.6

Filtro SpinX

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$58	\$1394.00

Glicógeno

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$2.19	\$52.62

Etanol

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$3.36	\$80.64

7.1.1.2 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' y efecto del DMSO y el PEG 8000. Segunda purificación en gel PAGE.

Ligación

Componente	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Adaptador Linker 1	1.85	\$7930.32
T4 RNA LIGASA 2	297.42	
RNase OUT	31.16	
TOTAL	\$330.43	

Gel 15% desnaturalizante

Componente	Costo x 100 ml	Costo por 80 ml (24 muestras/ 8 geles chicos)
Acrilamida	108.71	\$ 180.4
Urea	114.36	
TBE10X	2.49	
TOTAL	\$225.56	

Buffer de carga II

Gel de carga II		Costo x muestra	Costo por 24 muestras
	20µl x muestra	\$4.5	\$108.0

Ladder 10 bp

10 bp DNA ladder		Costo por gel	8 geles
	3µl x gel	\$59.02	\$472.00

Filtro SpinX

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$ 58	\$1394.00

Glicógeno

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$2.19	\$52.62

Etanol

	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
2 ml x muestra	\$3.36	\$80.64

7.1.1.3 Ligación del adaptador en el extremo 5'. Tercera purificación en gel PAGE.

Ligación

Componente	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Adaptador Illumina 5'	\$1.06	\$1,190.64
T4 RNA LIGASA 1	\$17.39	
RNase OUT	\$31.16	
TOTAL		

Gel 10% desnaturalizante

Componente	100 ml	Costo x 100 ml	Costo por 80 ml (24 muestras/ 8 geles chicos)
Acrilamida	25 ml	\$72.47	\$151.456
Urea	48 g	\$114.36	
TBE10X	10 ml	\$2.49	
TOTAL		\$189.32	

Gel de carga II

	Costo x muestra	Costo por 24 muestras
20µl x muestra	\$4.5 x muestra	\$108

10 bp DNA ladder

	Costo por gel	Costo por 8 geles
3µl x gel	\$59.02	\$472.00

Filtro SpinX

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$58	\$1,394.00

Glicógeno

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$2.19	\$52.62

Etanol

	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
2 ml x muestra	\$3.36	\$80.64

7.1.1.4 Transcripción reversa

Componente	Cantidad por muestra	Costo por muestra	24 muestras
Primer RT	4.5 µl x muestra	\$0.10	\$4419.12
dNTPs	1 µl x muestra	\$3.00	
RNase OUT	1 µl x muestra	\$31.16	
SuperScriptII	1 µl x muestra	\$149.87	
TOTAL		\$184.13	

7.1.1.5 Amplificación e indizado de las bibliotecas

Reacción de PCR

Componente		Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Primer directo	0.5	\$0.073	\$1,222.46
Primer reverso	0.5 µl x muestra	\$0.073	
dNTPs	0.5 µl x muestra	\$3	
Phusion Taq pol	0.2 µl x muestra	\$47.79	
TOTAL		\$50.93	

Gel 6% nativo

Componente	Cantidad para 100 ml	Costo por 100 ml	280 ml (8 geles/24 muestras)
Acrilamida	15 ml	\$43.48	\$128.716
TBE 10X	10 ml	\$2.49	
TOTAL		\$45.97	

Buffer de carga II

	Costo x muestra	Costo por 24 muestras
50 µl x muestra	\$11.25	\$270.00

10 bp DNA ladder

	Costo por gel	Costo por 8 geles
3 µl x gel	\$59.02	\$472.00

Desglose de costos MÉTODO DIRECTO

7.1.3.1 Ligación del adaptador preadenilado al extremo 3' del RNA.

Ligación

Componente	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Adaptador Linker 1	1.85	\$7930.32
T4 RNA LIGASA 2	297.42	
RNase OUT	31.16	
TOTAL	\$330.43	

7.1.3.2. Ligación del adaptador al extremo 5' de los RNAs pequeños.

Ligación

Componente	Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Adaptador Illumina 5'	\$1.06	\$1,190.64
T4 RNA LIGASA 1	\$17.39	
RNase OUT	\$31.16	
TOTAL		

7.1.3.3 Transcripción reversa. Reacción de retrotranscripción

Componente	Cantidad por muestra	Costo por muestra	24 muestras
Primer RT	4.5 µl x muestra	\$0.10	\$4419.12
dNTPs	1 µl x muestra	\$3.00	
RNase OUT	1 µl x muestra	\$31.16	
SuperScriptII	1 µl x muestra	\$149.87	
TOTAL		\$184.13	

7.1.3.4 Amplificación e indizado de las bibliotecas

Reacción de PCR

Componente		Costo por muestra	Costo por 24 muestras
Primer directo	0.5	\$0.073	\$1,222.46
Primer reverso	0.5 µl x muestra	\$0.073	
dNTPs	0.5 µl x muestra	\$3	
Phusion Taq pol	0.2 µl x muestra	\$47.79	
TOTAL		\$50.93	

Gel 6% nativo

Componente	Cantidad para 100 ml	Costo por 100 ml	280 ml (8 geles/24 muestras)
Acrilamida	15 ml	\$43.48	\$128.71
TBE 10X	10 ml	\$2.49	
TOTAL		\$45.97	

Buffer de carga II

	Costo x muestra	Costo por 24 muestras
50 µl x muestra	\$11.25	\$270.00

10 bp DNA ladder

	Costo por gel	Costo por 8 geles
3µl x gel	\$59.02	\$472.00

Glicógeno

Costo por muestra	Costo por 24 muestras
\$2.19	\$52.62