



Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

ANÁLISIS FISIOLÓGICO Y DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS
DE LA RESPUESTA A INUNDACIÓN Y SEQUÍA EN MAÍZ
(*Zea mays ssp. mays*) Y TEOCINTLE (*Zea luxurians*)

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

PRESENTA:

I.B. Lissette Gallegos Suárez

Directora de Tesis:

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Co-Director de Tesis:

Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García

Tuxtepec, Oax., Marzo de 2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/023
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 14 de febrero de 2018

C. LISSETTE GALLEGOS SUÁREZ

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

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

Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Presidente
Dr. Jesús Hinojosa Moya	BUAP	Vocal
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Secretario
Dr. Miguel Peña Rico	UNPA	1er Suplente
Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACyT	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado



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

Vo. Bo. **VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

C.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

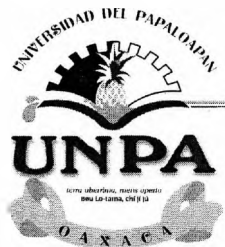
CAMPUS TUXTEPEC

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

OFICIO	DEP/2018/012
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 9 de marzo de 2018

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 de la **C. Lissette Gallegos Suárez**, matrícula **14140008**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Análisis fisiológico y de expresión de micrnas de la respuesta a inundación y sequía en maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teocintle (*Zea luxurians*)**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente



Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Lissette Gallegos Suárez
C.c.p. Archivo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, y la Co-Dirección del Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García, con el apoyo del Proyecto Colaborativo UC-MEXUS 2014 auspiciado por The University of California Institute for Mexico and the United States y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La sustentante, Lissette Gallegos Suárez, contó con Beca CONACYT para estudios de maestría, asignada al programa de Maestría en Biotecnología (PNPC 003131), y beca de Mujeres Indígenas.

Los resultados de este trabajo se presentaron como poster en el XVI Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, realizado en la Ciudad de Querétaro, Qro. del 7 al 11 de diciembre de 2015.

Lisette Gallegos-Suárez, José Francisco Pulido-Barajas, Alyn Flores-Herrerías, Ariana Arlene Huerta-Heredia, Julián M. Peña-Castro, Blanca E. Barrera-Figueroa, 2015. Expression analysis of water stress-regulated microRNAs in teosinte.

INDICE GENERAL

	Pag
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. Introducción	5
1.1 La agricultura y el agua.....	5
1.2 La sequía	6
1.3 La inundación.....	7
1.4 Respuesta de las plantas al estrés hídrico.....	8
1.5 Los microRNAs (miRNAs).....	10
1.6 El maíz y el teocintle como modelos de estudio.....	11
1.6.1 El maíz (<i>Zea mays</i> ssp. <i>mays</i>).....	11
1.6.2 <i>Zea luxurians</i> , una especie de teocintle.....	15
2. Justificación	17
3. Hipótesis	18
4. Objetivo general	18
4.1 Objetivos específicos.....	18
5. Materiales y Métodos	19
5.1 Material vegetal.....	19
5.2 Sustrato empleado en los experimentos y su preparación.....	19
5.3 Siembra y cultivo	19
5.4 Tratamientos de estrés y análisis de supervivencia.....	20
5.5 Tratamientos de estrés secuenciales.....	21
5.6 Contenido relativo de agua en hojas.....	22
5.7 Análisis de miRNAs de respuesta a sequía e inundación en maíz y teocintle...	23
5.8 Predicción de genes blanco.....	25
6. Resultados y discusión	25
6.1 Tolerancia a estrés hídrico en maíz y teocintle.....	25
6.1.1 Tolerancia a sequía.....	29
6.1.2 Tolerancia a inundación	32
6.2 Respuesta a tratamientos secuenciales de sequía e inundación	35
6.3 Observaciones sobre la tolerancia a sequía e inundación en plantas.....	42
6.4 Expresión de miRNAs en maíz y teocintle.....	44
6.4.1 Análisis de bibliotecas control.....	45
6.5 Análisis de expresión en respuesta al estrés hídrico.....	51
6.5.1 Panorama general de la expresión de miRNAs.....	51
6.5.2 Expresión diferencial de miRNAs en respuesta a la inundación.....	54
6.5.3 Expresión diferencial de miRNAs en respuesta a la sequía.....	55
6.5.4 Integración funcional de miRNAs de respuesta al estrés.....	56
7. Conclusiones	60
8. Perspectivas	61
9. Referencias	62
10. Anexo	67

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Fenómenos meteorológicos ocurridos en México de 2004 a 2011.....	7
Figura 2. Catástrofes agrícolas ocurridas de 1995-2003, por eventos climáticos extremos.....	8
Figura 3. Mecanismos de acción reguladora de los miRNAs sobre sus transcritos blanco	11
Figura 4. Producción de los principales cereales en México durante el periodo 1996-2006.....	12
Figura 5. Superficie sembrada de maíz grano en el territorio Nacional desde 1994 hasta 2010.....	12
Figura 6. Volumen de producción de maíz grano en el territorio Nacional desde 1994 hasta 2010.....	17
Figura 7. Clasificación del teocintle.....	18
Figura 8. Morfología de la planta y la mazorca del teocintle y del maíz moderno y su relación filogenética.....	18
Figura 9. Tratamientos de estrés y control para maíz y teocintle.....	20
Figura 10. Contenido de agua en el sustrato durante el estrés por sequía progresiva.....	21
Figura 11. Desarrollo de las plantas en etapa vegetativa.....	23
Figura 12. A) Maíz, y B) Teocintle, expuestos a sequía progresiva.....	24
Figura 13. Porcentaje de supervivencia en plantas de maíz y teocintle bajo estrés por sequía progresiva.....	25
Figura 14. A) Zea mays, y B) Teocintle, expuestos a inundación.....	25
Figura 15. Porcentaje de supervivencia de maíz y teocintle a la inundación durante el tratamiento de inundación total.....	26
Figura 16. Plantas de maíz (Zea mays) tratadas con A) sequía, o B) inundación (sumersión), o C) estrés secuencial.....	27
Figura 17. Tratamientos secuenciales de sequía-inundación a las dosis indicadas.....	32
Figura 17 (continuación). Tratamientos secuenciales de inundación-sequía a las dosis indicadas.....	35
Figura 18. Porcentaje de supervivencia a tratamientos únicos y secuenciales de inundación y sequía.....	37
Figura 19. Contenido Relativo de Agua en hojas (CRA), de maíz VS-536,.....	42
Figura 20. MicroRNAs más abundantes en plantas de maíz y teocintle en condiciones control, expresados en veces por millón (TPM).....	42
Figura 21. Expresión de secuencias miR166 en las bibliotecas de maíz y teocintle.....	44
Figura 22. Horquilla precursora de zma-miR166a y abundancia de sus secuencias maduras en las bibliotecas control de maíz y teocintle.....	45
Figura 23. Panorama general de la expresión diferencial de miRNAs en respuesta a la sequía y la inundación en maíz y teocintle.....	47
Figura 24. Análisis de expresión de secuencias de la familia miR159 y sus genes blanco.....	54
Figura 25. Modelo integrador de los miRNAs identificados y los procesos biológicos que se asocian a sus genes blanco.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla 1. MicroRNAs con expresión diferencial en maíz y teocintle bajo condiciones control de crecimiento.....	48
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMEN

El estrés hídrico es la condición que se produce como resultado de alteraciones en la disponibilidad de agua. En su ambiente natural, las plantas están expuestas a ciclos intermitentes de escasez y exceso de agua debida a las alteraciones en el ciclo del agua. La escasez del agua en el campo se conoce como sequía. Por otra parte, el exceso de agua en el campo se conoce como anegación o inundación. La sequía y la inundación son las causas principales de pérdidas agrícolas en el campo. Las plantas han desarrollado una diversidad de estrategias para responder al estrés hídrico a través de ajustes a nivel fisiológico, morfológico y bioquímico, que están regulados a nivel molecular. En la regulación molecular de la respuesta al estrés hídrico se ha reconocido la participación de pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs. Los microRNAs regulan negativamente la expresión de genes a los que reconocen por complementariedad de secuencias, y con esto, controlan finamente la expresión de genes de respuesta al estrés.

En el presente trabajo de tesis se tuvo como objetivo investigar la tolerancia a sequía e inundación en la planta de maíz (*Zea mays ssp. mays*) y de teocintle (*Zea luxurians*), e identificar microRNAs que podrían conectar la respuesta a ambos tipos de estrés. Para esto, se realizaron tratamientos de sequía e inundación completa (sumersión) por tiempos y se registró el tiempo máximo suficiente para alcanzar la muerte del 50% de las plantas, o tiempo letal 50% (TL₅₀). Como resultado, se observó que no existieron diferencias aparentes o detectables entre maíz y teocintle para tolerar al estrés por sequía, ya que ambas plantas alcanzaron la TL₅₀ a los 11 días de tratamiento. En cambio, el estrés por inundación reveló que teocintle tuvo mayor capacidad para tolerar el estrés y sobreponerse a la condición adversa reanudando su desarrollo, ya que su TL₅₀ en inundación fue de 5 días, mientras que en maíz fue de 2-3 días. Adicionalmente, se observó que un evento primario de inundación aumentó la capacidad para tolerar un evento secundario posterior de sequía. Con la finalidad de identificar microRNAs que podrían mediar la tolerancia a ambos tipos de estrés, se

analizaron seis bibliotecas de RNAs pequeños de maíz y teocintle en condiciones control, sequía e inundación. Este análisis reveló que ambas respuestas tendieron mayoritariamente a la represión de microRNAs. Las plantas de maíz y de teocintle expuestas a estrés hídrico expresaron de forma diferencial un conjunto de miRNAs entre los que se encuentran miR159, miR167, miR166, miR398, miR408 y miR528, que mediante su represión podrían liberar del control postranscripcional a sus genes blanco. Estos genes blanco participarían en la protección del estrés oxidativo y en las respuestas hormonales relacionadas a los procesos de desarrollo y de respuesta al estrés abiótico.

Los miRNAs identificados constituyen una referencia que será de utilidad para la aplicación de estrategias biotecnológicas con base científica, tendientes a la obtención de maíz con tolerancia simultánea a sequía e inundación para el futuro.

ABSTRACT

Water stress is the condition that is produced as a result of alterations in water availability. In its natural environment, plants are exposed to intermittent cycles of lack and excess of water, due to alterations in water cycle. The lack of water in the field is known as drought. On the other hand, the excess of water in the field causes waterlogging or complete flooding. Drought and flooding are the main causes of agricultural losses in the field. Plants have evolved a diversity of strategies to respond to water stress through a series of physiological, morphological and biochemical adjustments, all of them regulated at the molecular level. Molecular regulation to water stress needs the participation of small RNA molecules called microRNAs or miRNAs. MiRNAs negatively regulate the expression of genes to which they recognize by sequence complementation, and in that way, miRNAs exert fine-tuned control of target gene(s) expression in the response to stress.

This work aimed to investigate the tolerance to drought and flooding in the maize plant (*Zea mays* ssp. *mays*) and in teosinte (*Zea luxurians*), and to identify regulatory miRNAs that could act in the crosstalk of responses to both kinds of stress. For this, time-course experiments of drought and submergence stress were performed. The maximum time enough to cause death to 50% of plants, or lethal time 50% (LT₅₀), was registered. As a result, there were no detectable differences in the capacity of maize to tolerate drought stress since both plants reached the TL₅₀ by 11 days of treatment. In contrast, flooding stress revealed teosinte had higher capacity to tolerate stress, overpassing the adverse condition and resuming its development, as its TL₅₀ under flooding stress was of 5 days, while in maize it was of 2-3 days. In addition, it was observed that a primary event of flooding increased the capacity for tolerating a drought event as secondary stress. With the objective of identifying miRNAs that could act in crosstalk pathways to mediate tolerance to both kinds of stress, six small RNAs from maize and teosinte under

control, drought and flooding treatments were analyzed. This analysis revealed that both responses had a major trend towards repression of miRNAs. The plants under water stress expressed differentially a set of miRNAs, among them, miR159, miR167, miR166, miR398, miR408 y miR528, which through its repression could liberate their target genes from post-transcriptional control. Their target genes participate in the oxidative stress protection and in hormonal responses related to development and response to abiotic stress.

The miRNAs identified in this work constitute a reference that will probe usefulness for applying biotechnological strategies with scientific fundament, intended for the development of maize with simultaneous tolerance to drought and flooding for the future.

1. Introducción

1.1 La agricultura y el agua

La agricultura es una actividad productiva importante para el desarrollo de las naciones. En México, se dedica el 10.5% del territorio total, al cultivo de diversas especies vegetales como maíz, frijol y arroz, entre otras (Landeros-Sánchez *et al.*, 2014). Por tanto, la agricultura constituye la actividad económica más importante en las poblaciones rurales representando el mayor porcentaje del ingreso familiar (SAGARPA, 2004).

El agua es un recurso necesario para el desarrollo de las plantas, ya que de ésta dependen todos los procesos biológicos, como el desarrollo y la producción de semillas. Al alterarse la disponibilidad del agua, se alteran las funciones vitales de las plantas, y esto trae como consecuencia pérdidas económicas en la agricultura, y la disminución de la calidad de vida de las familias que cultivan el campo (FAO, 2012).

En México, el 87% de los cultivos agrícolas se mantienen en régimen de temporal, es decir, dependen del agua de precipitación, (INEGI, 2014). Sin embargo, se estima que se pierde el 12% de estos cultivos debido a falta o exceso de agua (Palacios-Vélez, 2011). El resto de los cultivos se lleva a cabo con agua de riego, lo que implica costos adicionales para llevar agua a lugares remotos y contar con la infraestructura adecuada. La disponibilidad de agua de precipitación es, por lo tanto, fundamental para el desarrollo de la agricultura sustentable.

Desafortunadamente, como resultado del cambio climático se ha generado un desequilibrio en el ciclo de precipitaciones. Estos desequilibrios ponen año con año en riesgo el rendimiento de los cultivos, y por ende el abasto de alimentos.

Es preocupante que México sólo produzca el 58% de los alimentos que consume (El Siglo de Durango, 2014), y que esto pueda agravarse si se tienen pérdidas en cultivos ocasionadas por los cambios en la periodicidad, temporalidad e intensidad de las lluvias. Los fenómenos extremos que tienen como componente común la alteración en la disponibilidad de agua en el campo, y que causan impacto negativo en la productividad de las plantas, son las sequías y las inundaciones. Tan sólo en 2012, en Sinaloa, el principal productor de maíz en México, la sequía afectó un total de 100, 000 hectáreas, y en el caso del maíz produjo pérdidas por \$9, 000 millones de pesos en todo el país (CNN México, 2012).

1.2 La sequía

La sequía es un fenómeno meteorológico que ocurre cuando la precipitación en un período de tiempo es menor que el promedio, y cuando esta deficiencia de agua es lo suficientemente grande y prolongada como para dañar las actividades humanas (García y Fuentes, 1999).

México es uno de los países más afectados por la sequía. Entre 2004 y 2011 se registraron 1,054 contingencias climatológicas en todo el país, una de cada tres fue catalogada como sequía (34.9%). Las precipitaciones del verano de 2011 presentaron anomalía, lo cual se tradujo en una condición de sequía agropecuaria, principalmente en la región norte y centro del país (Fig. 1) (INEGI, 2011).

La sequía tiene efectos adversos para la actividad agrícola y ganadera en México. En el año agrícola 2011 se siniestraron tres millones 467 mil 570 hectáreas de cultivos cíclicos, 62% a causa de la sequía. Se dejaron de producir 4 millones 159 mil toneladas de productos agrícolas, con una pérdida económica de 7 mil 188 millones de pesos y 117 mil empleos. Se estima que 70 mil 902 cabezas de ganado bovino murieron o fueron sacrificadas por efectos de la sequía agropecuaria (SIAP, 2013).

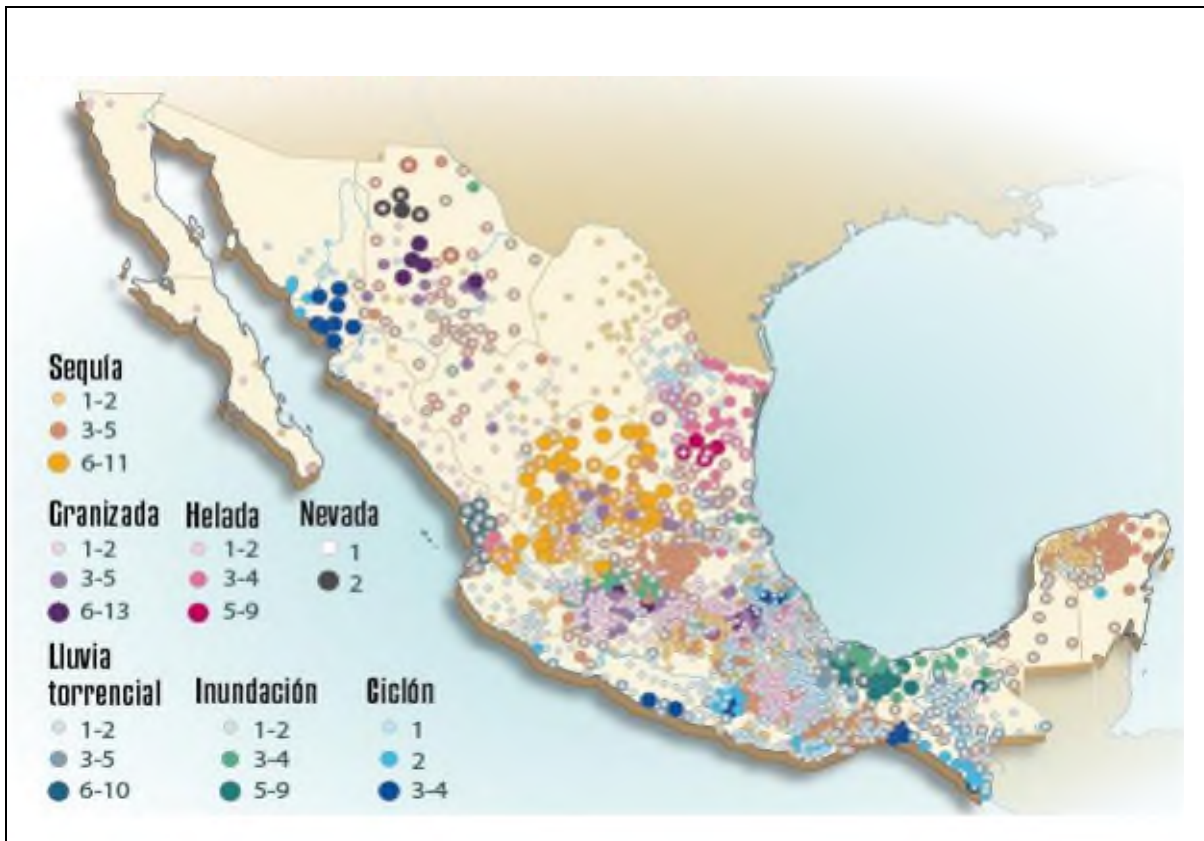


Figura 1. Fenómenos meteorológicos ocurridos en México de 2004 a 2011 (INEGI, 2011). Los números en la imagen representan el número de eventos ocurridos.

1.3 La inundación

De acuerdo al Servicio Climatológico Nacional de Estados Unidos, la inundación se define como el incremento en el nivel de agua en la tierra normalmente seca,

causada por el desbordamiento de un río, o por lluvias densas y excesivas, entre otras causas posibles (NOAA, 2015). Gran parte del territorio mexicano sufre por lluvias excesivas que provocan inundaciones severas. Después de la sequía, los huracanes y en general las inundaciones, se ubican como la segunda causa de pérdidas económicas en agricultura debidas a factores ambientales (Fig. 2)

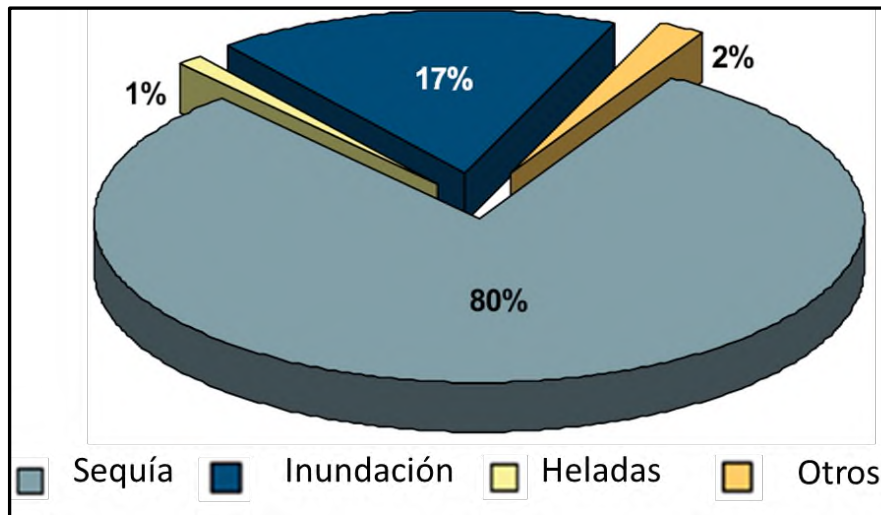


Figura 2. Catástrofes agrícolas ocurridas de 1995-2003, por eventos climáticos extremos (Agroasemex, 2006).

1.4 Respuesta de las plantas al estrés hídrico

El estrés hídrico se refiere a la alteración del contenido de agua disponible para las plantas, ya sea por déficit en el caso de la sequía, o por exceso en el caso de la inundación. Las plantas responden a la sequía y a la inundación ajustando la expresión de sus genes para desencadenar cambios bioquímicos y fisiológicos (Ahuja *et al.*, 2010). La sequía induce cambios para limitar la salida de agua por las hojas, desacelerar su crecimiento y reajustar su metabolismo. Por su parte, la

inundación puede estimular el crecimiento para sobrepasar la columna de agua en exceso y escapar a la inundación, o bien, para detener su crecimiento y conservar su energía hasta que el nivel de agua disminuya y pueda continuar con su desarrollo (Fukao y Xiong, 2013).

Aunque inicialmente podrían ser vistos como estreses opuestos, se ha sugerido que existe un enlace molecular entre la respuesta a la sequía y la respuesta a la inundación, a partir de la demostración de que el gen SUB1A, responsable de la resistencia a la inundación en arroz, también confiere tolerancia a la sequía (Fukao *et al.*, 2011), lo que lleva a preguntarse si un evento de inundación podría preparar a la planta para tolerar un evento de sequía posterior, y viceversa. Por otra parte, el hecho de que el gen SUB1A codifique un factor de transcripción, y que SUB1A confiera tolerancia a ambos tipos de estrés hídrico en arroz, sugiere que, de existir algún enlace molecular, éste podría ser de función reguladora.

Además del gen SUB1A, existen otros genes clave en la adaptación a la sumersión que también se asocian a la sequía como SNORKEL 1 y 2 (Hattori *et al.* 2009) y EREBP1 (Jisha *et al.*, 2015).

Los cambios que experimentan las plantas para responder al estrés son resultado de ajustes en la expresión de sus genes. Estos ajustes pueden seguir dos direcciones: 1) algunos son inducidos para activar funciones de respuesta y defensa al estrés, y 2) otros son reprimidos para limitar procesos que no son necesarios para la supervivencia de la planta. Los mecanismos para regular los cambios en la expresión de los genes son fundamentales para la tolerancia.

Se ha reportado que durante el estrés hídrico las plantas regulan cambios en la expresión de los genes mediante la acumulación de moléculas de RNAs pequeños no codificantes, llamados microRNAs (miRNAs), que tienen funciones centrales en la respuesta al estrés y el desarrollo de las plantas (Barrera-Figueroa *et al.*, 2013).

1.5 Los microRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son pequeñas moléculas endógenas de RNA no codificante, de 20-30 nucleótidos de longitud, presentes en todos los organismos eucariotas, que se generan a partir de un RNA largo con estructura tallo-asa. En plantas, la actividad de los miRNAs es determinante para el desarrollo, la morfología, el metabolismo y la respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Jeong y Green, 2013; Kumar, 2014).

Los miRNAs actúan mediante complementación de su secuencia con la de genes o transcritos específicos, llamados blanco, a los que se hibridan y de esta forma los marcan de forma específica para silenciarlos (Fig. 3). Al marcarlos, los miRNAs impiden la transcripción de los genes blanco, o bien, si ya fueron transcritos, evitan su traducción y/o favorecen su degradación (Xie *et al.*, 2008). Cuando esta actividad se lleva a cabo sobre los genes, a nivel de DNA, se conoce como silenciamiento génico transcripcional (TGS). Cuando sucede sobre los transcritos, es decir, sobre RNA, se conoce como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) (Xie *et al.*, 2008).

Por lo tanto, cuando un miRNA se acumula, se espera que la expresión de su gen o genes blanco se reprima; y cuando un miRNA disminuye su expresión, se espera que su(s) transcrito(s) blanco se acumulen.

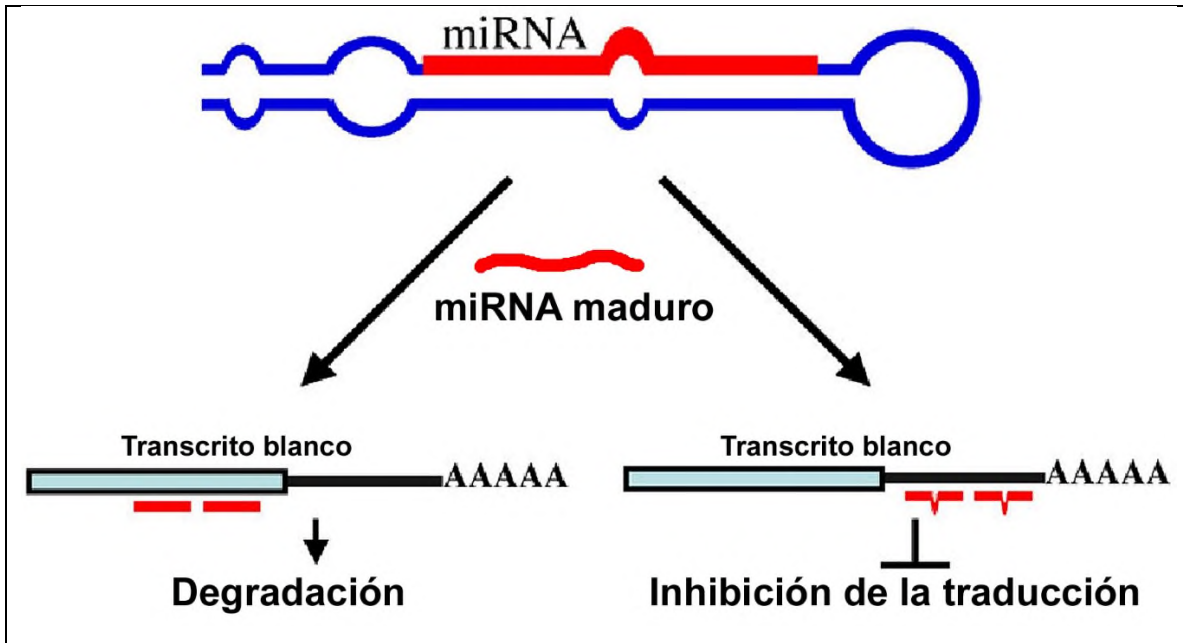


Figura 3. Mecanismos de acción reguladora de los miRNAs sobre sus transcritos blanco.

Debido a la naturaleza regulatoria central que presentan los miRNAs, es posible que la respuesta cruzada a estreses ambientales, como la sequía y la inundación, esté conectada a través de estos elementos.

1.6 El maíz y el teocintle como modelos de estudio

1.6.1 El maíz (*Zea mays ssp. mays*)

El maíz es uno de los cultivos más importantes en México desde el punto de vista alimentario e industrial. En relación a los cereales, el maíz acapara el mayor porcentaje de producción (Fig. 4). En 2011 se sembraron 7, 750, 301 Has y se cosecharon 17, 635, 417 toneladas (INEGI, 2012). Aunque claramente se ha disminuido la superficie de tierra dedicada a su cultivo en los años recientes, se ha aumentado el volumen de producción (Figs. 5 y 6).

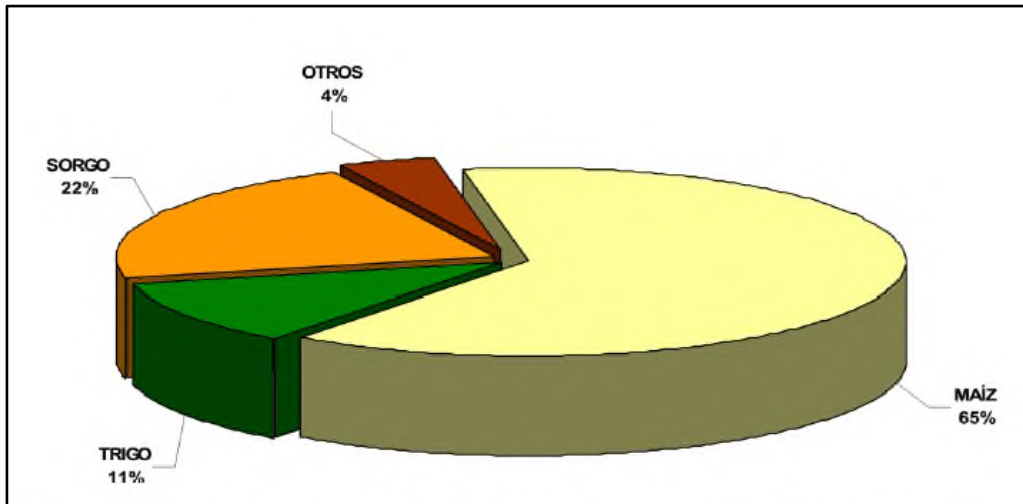


Figura 4. Producción de los principales cereales en México durante el periodo 1996-2006 (SIAP, 2012).



Figura 5. Superficie sembrada de maíz grano en el territorio Nacional desde 1994 hasta 2010. (INEGI, 2012).

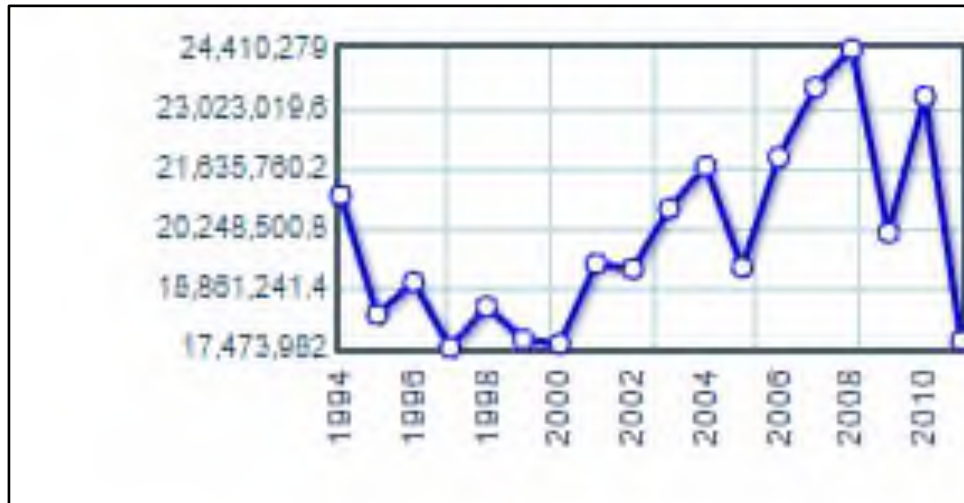


Figura 6. Volumen de producción de maíz grano en el territorio Nacional desde 1994 hasta 2010. (INEGI, 2012).

La mayor parte del maíz mexicano se produce bajo régimen de temporal. Alrededor del 85.5% del maíz que se sembró entre 1996 y 2006 fue de temporal (SIAP, 2012). El hecho de que la mayor parte del maíz se cultive en superficie de temporal hace que se encuentre constantemente amenazada por la sequía o por la inundación, o por eventos secuenciales de ambos tipos de estrés.

El maíz es sensible a la sequía y a la inundación, por lo que ha sido objeto de estudio para identificar las bases de su respuesta al estrés hídrico. Recientemente, Campbell *et al.* (2015) analizó un gran número de líneas de maíz para seleccionar tolerantes y sensibles a la inundación y realizar análisis del transcriptoma. Como resultado, identificó un elemento molecular QTL llamado *Subto16* responsable del 22% de la variación fenotípica observada entre las líneas de maíz. Por otra parte, Yu *et al.* (2015) realizó análisis proteómico e identificó proteínas de respuesta a la inundación en las raíces de maíz, revelando que el estrés moviliza elementos que forman una red compleja y que participan principalmente en la regulación del metabolismo, la energía, el transporte y la defensa.

En lo que respecta a la sequía, el maíz ha sido extensivamente evaluado para identificar elementos moleculares con la finalidad de emplearlos en el mejoramiento genético. Por ejemplo, Chen *et al.* (2012) realizó un estudio para evaluar una variedad de líneas de maíz e identificar aquellas que presentan mayor tolerancia a sequía y a altas temperaturas. Mediante la medición de diversos parámetros fisiológicos de tolerancia, como el contenido relativo de agua, seleccionó líneas tolerantes que pueden ser útiles para generar nuevas líneas híbridas con mayor capacidad de tolerar el estrés. Por otra parte, Zheng *et al.* (2010) empleó microarreglos para analizar el transcriptoma de dos líneas de maíz bajo tratamientos de sequía, una tolerante y una sensible, identificando diferencias en la expresión de genes de transporte y de síntesis pared celular entre las dos líneas. Adicionalmente observaron que los niveles de los genes inducidos por sequía en la línea tolerante se recuperaban más rápidamente cuando las plantas se rehidrataban, en comparación con la línea sensible. Esto sugiere que la tolerancia a la sequía también depende de la capacidad de las plantas para ajustarse rápidamente a los cambios en la disponibilidad de agua.

La participación de miRNAs en la respuesta a estrés hídrico también ha sido estudiada en maíz. Wang *et al.* (2014) analizó cuatro líneas de maíz e identificó una variedad de miRNAs de respuesta a la sequía, como miR159 y miR168, entre otros. Li *et al.* (2013) identificó 29 familias de miRNAs de respuesta a sequía en una línea de maíz tolerante, entre los que se encuentran los miRNAs miR156, miR159 y miR319.

Uno de los primeros reportes de miRNAs de respuesta a inundación en maíz es el trabajo de Zhang *et al.* (2008), que mediante el uso de microarreglos detectó la inducción de los miRNAs miR166, miR167, miR171 y miR396 en la fase temprana del tratamiento de inundación. Por otra parte, los miRNAs miR159, miR395, miR474 y miR528 redujeron su expresión en la fase temprana pero la aumentaron en la fase tardía de la inundación. Con el análisis de los genes blanco de los miRNAs identificados, se demuestra que los miRNAs participan en la regulación

de las adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas del maíz al estrés por inundación.

1.6.2 *Zea luxurians*, una especie de teocintle

El teocintle es considerado el antecesor silvestre del maíz y está formado por una variedad de especies y subespecies relacionadas (Fig. 7). En general, los teocintles son plantas que no tienen utilidad como alimento para consumo humano y se les clasifica como malas hierbas o malezas. Se les emplea ocasionalmente para alimentar al ganado cuando escasea el forraje (Bedoya y Chávez-Tovar, 2010). Las diferentes especies de teocintle y el maíz se distinguen por la morfología de la planta y de su mazorca (Fig. 8).



Figura 7. Clasificación del teocintle. Tomado de www.biodiversidad.gob.mx

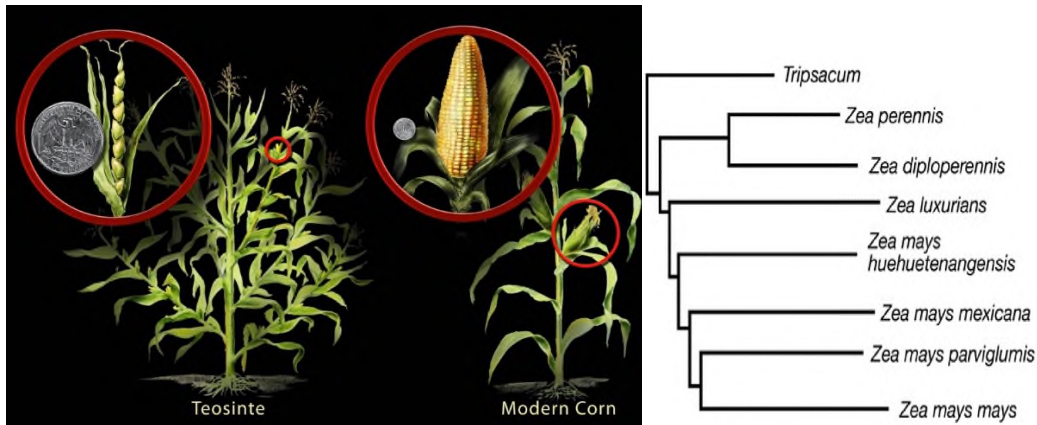


Figura 8. Morfología de la planta y la mazorca del teocintle y del maíz moderno y su relación filogenética (Imagen de Lasbury, 2013).

Entre las especies de teocintle anuales se encuentra *Zea luxurians* (Fig. 7). *Z. luxurians* y el maíz tienen genomas de distinto tamaño (Poggio *et al.*, 1998). Se estima que el maíz divergió de *Z. luxurians* hace aproximadamente 140,000 años (Ross-Ibarra *et al.*, 2009), a diferencia de otras especies de teocintle como *Zea mays ssp. parviglumis*, que divergió hace aproximadamente 9,000 años (Matsuoka *et al.*, 2002) (Fig. 8). Recientemente, un estudio demostró que la diferencia en tamaño entre maíz y *Z. luxurians* se atribuye principalmente a la presencia y repetición de elementos transponibles (TEs) (Tenailon *et al.*, 2011).

Se considera que los teocintles tuvieron gran influencia en la variabilidad genética y el desarrollo de las principales razas de maíz en América, por lo tanto, su germoplasma es una fuente valiosa para la transferencia de la tolerancia al estrés en maíz y con gran utilidad para la identificación de mecanismos que pudieron haberse perdido durante la domesticación del maíz. *Z. luxurians*, a pesar de ser una especie poco estudiada en comparación con otros teocintles, posee una marcada tolerancia superior a la inundación de acuerdo a observaciones de campo, por lo que es un buen modelo para conducir la investigación de la respuesta molecular al estrés hídrico.

2. Justificación

En su ambiente natural, las plantas sufren de diversos tipos de estrés en combinación o consecutivos. A lo largo de su ciclo, un mismo cultivo puede sufrir sequía durante algún tiempo y a continuación sufrir inundación por lluvias excesivas, y viceversa. A pesar de que la sequía y la inundación son inicialmente fenómenos de naturaleza opuesta, se ha demostrado que existen vínculos moleculares entre estos tipos de estrés, y que su naturaleza es reguladora (Fukao *et al.* 2011). Esto indicaría que la habilidad de las plantas para tolerar diferentes tipos de estrés depende, al menos en parte, de la existencia de puntos de entrelazamiento entre las rutas de respuesta.

Se ha demostrado la existencia de puntos de entrecruzamiento o *crosstalk* en las respuestas a la sequía, el frío y la alta salinidad que implican la participación de microRNAs estableciendo nodos en redes reguladoras (Qin *et al.*, 2015). No obstante, a pesar del gran número de trabajos que se han realizado para estudiar la respuesta al estrés hídrico mediada por elementos reguladores como los miRNAs, no existen reportes en los que se compare y se discuta directamente la posibilidad de que los miRNAs funcionen como vínculos integradores de las respuestas a la sequía y la inundación, ni de que la exposición inicial al estrés por sequía prepare a las plantas para tolerar la inundación, o viceversa.

Por su papel central en la regulación de la expresión genética, los miRNAs se proponen como una de las soluciones más prometedoras para el mejoramiento de la tolerancia y la productividad en plantas de cultivo (Zhou y Luo, 2013). En este trabajo se propuso el estudio fisiológico de la tolerancia y la implicación de miRNAs de respuesta a sequía e inundación en maíz y teocintle para investigar su importancia en la probable tolerancia cruzada a ambos tipos de estrés. Con el conocimiento de las bases moleculares de la respuesta al estrés hídrico en teocintle será posible proponer herramientas para el mejoramiento de la tolerancia simultánea a la sequía y la inundación en maíz, mediante la expresión de miRNAs.

3. Hipótesis

3.1 La exposición previa a un evento de estrés hídrico proporciona tolerancia a un evento subsecuente de estrés hídrico opuesto en plantas de maíz y teocintle.

3.2 Existen microRNAs con patrones de acumulación similar en la respuesta al estrés por inundación y por sequía en plantas de maíz y teocintle.

4. Objetivo general

Determinar la tolerancia de plantas de maíz y teocintle a estrés secuencial de inundación y sequía y analizar los patrones de acumulación de microRNAs de respuesta al estrés.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1 Determinar los tiempos letales 50 (TL₅₀) de sequía e inundación en plantas de maíz y teocintle, para establecer un sistema adecuado para el estudio de la tolerancia.

4.1.2 Evaluar fisiológicamente la tolerancia a la inundación, a la sequía, a los tratamientos secuenciales de inundación tras sequía, y sequía tras inundación, en maíz y teocintle.

4.1.3 Analizar la expresión diferencial de microRNAs de respuesta a estrés por inundación y sequía en maíz y teocintle.

4.1.4 Elaborar un modelo teórico que integre la implicación de los miRNAs identificados y su función, en el contexto de los genes blanco que se encuentran bajo su regulación.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material vegetal

En este trabajo se empleó maíz comercial *Zea mays subsp. mays* de la variedad VS-536, y la especie de teocintle *Zea luxurians*. El teocintle *Z. luxurians* fue recomendado por el M.C. Flavio Aragon Cuevas para este estudio por ser un teocintle que ha mostrado una alta tolerancia a la inundación en los campos donde se cultiva, de acuerdo a sus observaciones personales. Las semillas fueron donadas del Banco de Germoplasma de Especies Nativas de Oaxaca, del INIFAP, por vía del M.C. Flavio Aragon Cuevas.

5.2 Sustrato empleado en los experimentos y su preparación

El sustrato utilizado en todos los experimentos fue la mezcla de sustrato Cosmopeat:Perlita, en relación 3:1. Antes de ser utilizado, el sustrato fue homogenizado y esterilizado a 121°C durante 1 hora. El fertilizante empleado fue el 15 N-5P-20K Nitrofoska Perfect a razón del 2%, el cual se agregó por única ocasión. Una vez esterilizado y adicionado con fertilizante, el sustrato se hidrató a máxima retención de agua, a una relación de 1.5 grs. de agua/grs. de sustrato, (Ortíz-Yescas, 2016).

5.3 Siembra y cultivo

La siembra se llevó a cabo en macetas del número 1, de 13 cm de diámetro por 9 cm de altura con capacidad de 0.6 litros, con tres individuos cada una. Para el caso de la inundación, se agregó a las macetas un contrapeso, que consistió en colocar piedras en el fondo de la maceta antes de agregar el sustrato, y una vez agregado el sustrato, se colocó una malla ajustada sobre la boca de la maceta

para evitar la pérdida de sustrato durante el tratamiento de inundación. Una vez realizada la siembra, las plantas se crecieron en malla-sombra y se regaron diariamente para asegurar su óptimo desarrollo.

5.4 Tratamientos de estrés y análisis de supervivencia

Para los experimentos preliminares y finales se empleó el mismo sistema descrito anteriormente. Con la finalidad de comparar la tolerancia de los genotipos de maíz y teocintle, se realizaron cinéticas de estrés progresivo y se analizó la supervivencia. Para esto, se aplicó una sequía progresiva dejando de regar las plantas que se sometieron a estrés, o inundando paulatinamente hasta lograr la sumersión de las plantas completas, hasta obtener el 100% de muerte en cada tipo de estrés. Se aplicaron tratamientos por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días sin agua disponible en suelo para sequía, y 1, 2, 3, 4 días en sumersión en una tina de 210 litros.

Para el caso de la sequía, se cuantificó el contenido de agua en el suelo a medida que transcurría el tiempo de estrés. Para esto, al inicio de los experimentos se colocaron macetas testigo que contenían 100g de sustrato seco. Estas macetas, al igual que el resto de macetas para cada experimento, se llevaron a un contenido de 1.5g de agua por g de sustrato. A medida que transcurría el estrés se tomaron las macetas testigo y se cuantificaba el peso fresco para hacer el cálculo del contenido de agua en suelo con base en el peso seco inicial del sustrato.

Los experimentos de sequía e inundación se llevaron a término, y al final se permitió a las plantas recuperarse por tres días después del estrés para cuantificar el porcentaje de supervivencia en cada caso.

5.5 Tratamientos de estrés secuenciales

Las plantas de maíz y teocintle se sometieron a estreses únicos y consecutivos con combinaciones de tiempo letal, tal como lo muestra la Fig. 9, manteniendo un grupo de plantas en condiciones de control, es decir, con riego continuo. Los tratamientos de estrés fueron: sequía, inundación, y dos tratamientos combinados de sequía e inundación y viceversa, para lo cual se emplearon plantas de maíz y teocintle en etapa v3, aproximadamente 8 después de la germinación (ddg) para el maíz, y 12 ddg para el teocintle, haciendo colectas para el análisis fisiológico al término de cada tratamiento de estrés y su respectivo control.

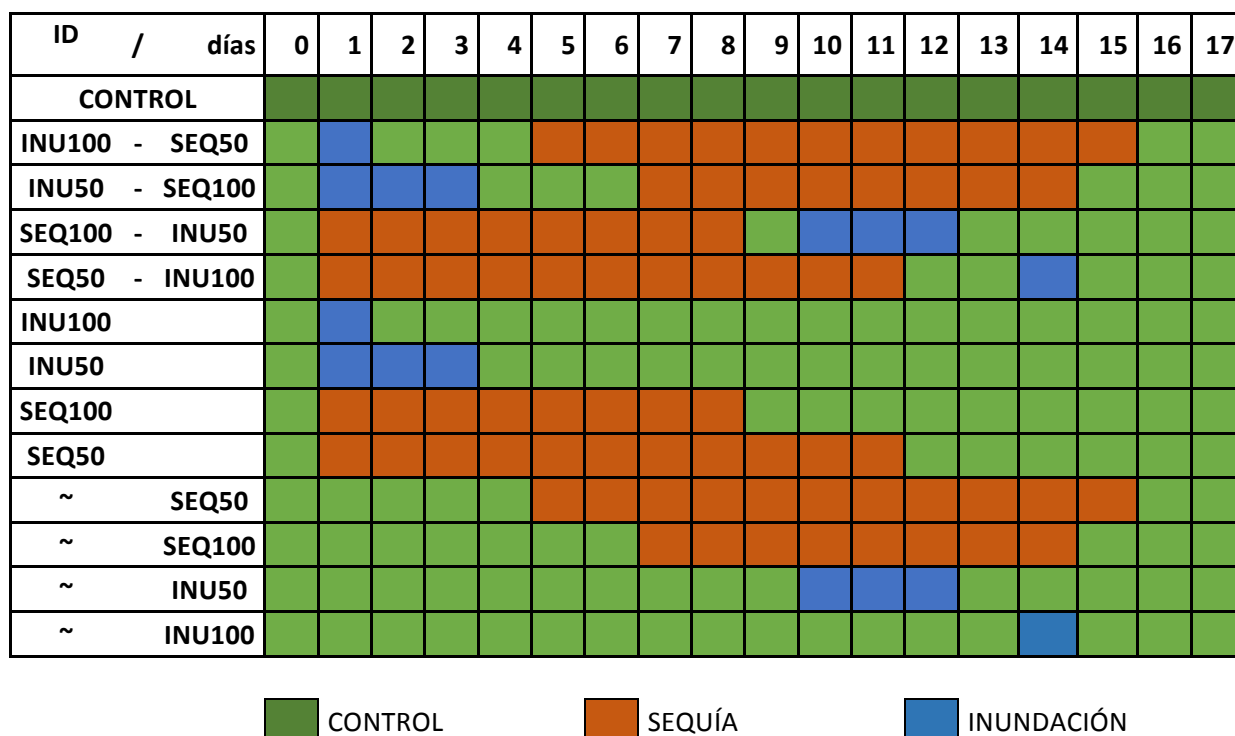


Figura 9. Tratamientos de estrés y control para maíz y teocintle.

De acuerdo a la Fig. 9, el primer tratamiento es el CONTROL, el cual contó con riego diario. El segundo tratamiento es INU100-SEQ50, es un tratamiento de

estrés secuencial, donde las plantas primero se inundaron durante 1 día con una dosis calculada previamente con 100% de sobrevivencia. De manera consecutiva al terminar el estrés las plantas se llevaron a su peso inicial por aproximadamente 5 días y finalizado este tiempo fueron estresadas por sequía progresiva con cese de riego durante 11 días. El tiempo de la sequía fue calculado para dar un 50% de sobrevivencia. El tercer tratamiento es INU50-SEQ100, el cual se llevó a cabo con la misma metodología que el anterior, pero cambiando las dosis de tiempo, para dar una sobrevivencia del 50% en inundación. Las plantas se inundaron 3 días y para 100% de sobrevivencia y después de alcanzar su peso inicial (aproximadamente 5 días), se dejaron de regar durante 8 días. El cuarto tratamiento es SEQ100-INU50. En este tratamiento las plantas se estresaron primeramente con sequía durante 8 días con una dosis de 100% de sobrevivencia y pasado este tiempo las plantas fueron regadas y al día siguiente se inundaron durante 3 días. El quinto tratamiento es SEQ50-INU100, el cual se llevó a cabo con la misma metodología que el anterior, pero cambiando las dosis de tiempo, para dar una sobrevivencia del 50% en sequía y 100% en inundación. Las plantas se dejaron de regar durante 11 días, terminado este tiempo se regaron y al día siguiente se procedió a inundarlas 1 día. Los tratamientos siguientes fueron estreses únicos de sequía e inundación que se llevaron a la par de los tratamientos secundarios. La sequía con 100% de sobrevivencia se llevó a cabo durante 8 días sin riego, y la de 50% de sobrevivencia se logró sin riego durante 11 días. Para el caso de la inundación con un 100% de sobrevivencia, las plantas se inundaron durante 1 día, y para la inundación con 50% de sobrevivencia, las plantas se inundaron durante 3 días.

5.6 Contenido Relativo de Agua en hojas (CRA)

Con la finalidad de cuantificar el nivel de deshidratación en el tejido se realizó la medición del Contenido Relativo de Agua al término de los tratamientos, tomando una hoja de planta para conocer el peso fresco (Pf). Después de pesarla, la hoja

se sumergió en agua desionizada durante 24 horas y al término de éstas, se secó de manera breve y se pesó para de esta manera conocer el peso turgente (P_t). Después de esto se secó en el horno a 70 °C, durante 48 horas, hasta que estuvieron a peso constante. Finalizado el tiempo de secado, se registró el peso seco (P_s). Con las tres mediciones se procedió a calcular el Contenido Relativo de Agua de acuerdo a la ecuación de Barrs y Weatherley (1968):

$$CRA = \frac{P_f - P_s}{P_t - P_s} * 100$$

5.7 Análisis de miRNAs de respuesta a sequía e inundación en maíz y teocintle.

Con el objetivo de explorar los perfiles de expresión de microRNAs en maíz y teocintle bajo estrés hídrico, se construyeron seis bibliotecas de RNAs pequeños. Tres de las seis bibliotecas, correspondientes a maíz bajo condiciones control, sequía e inundación, fueron analizadas en una tesis previa del grupo de investigación (Pulido-Barajas 2017).

Las tres bibliotecas restantes corresponden a teocintle (*Zea luxurians*) y fueron analizadas como parte del presente trabajo, empleando procedimientos de construcción y análisis similares a los reportados por Pulido-Barajas (2017). Brevemente, después de construidas, las bibliotecas se enviaron a la Universidad de California para su secuenciación en la plataforma Illumina HiSeq2500. Una vez obtenidos los archivos de secuenciación, las bibliotecas se sometieron al análisis de calidad y depuración de secuencias vacías. Al final, con los archivos depurados, se realizó la cuantificación de las secuencias presentes en cada biblioteca, por separado.

La búsqueda de secuencias en las bibliotecas se realizó mediante el programa TextPad, que permite realizar búsqueda de palabras en archivos, sin necesidad de

abrir los archivos. Al inicio, la búsqueda se limitó inicialmente a las 321 secuencias de miRNAs maduros anotadas en la miRBASE para maíz. Posteriormente, el análisis se extendió a miRNAs maduros de todas las plantas monocotiledóneas. Una vez obtenida la abundancia de cada secuencia en las bibliotecas, se aplicó un método de normalización con la finalidad de equilibrar la representación de cada secuencia en cada biblioteca, es decir, obtener la abundancia de cada secuencia por cada millón de secuencias globales en la biblioteca. Este parámetro se conoce como TPM (Times Per Million) o veces por millón. El cálculo se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$TPM = \frac{\text{Número de secuencias del miRNA}}{\text{Número total de secuencias}} \times 1\,000\,000$$

Después de registrar los TPMs para cada miRNA, se calculó la expresión diferencial entre dos bibliotecas de interés. Por ejemplo, para identificar miRNAs de respuesta a sequía, se compararon las bibliotecas control y sequía correspondientes. La expresión diferencial se expresó como Log₂ y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión diferencial} = \text{Log}_2 \frac{\text{TPM miRNA biblioteca problema}}{\text{TPM miRNA biblioteca referencia}}$$

Para facilitar el análisis, se consideraron las siguientes categorías de comparación:

En función del genotipo
Log ₂ (LC/MC)
Log ₂ (MC/LC)
En función del estrés
Log ₂ (LS/LC) y Log ₂ (LI/LC)
Log ₂ (MS/MC) y Log ₂ (MI/MC)

Donde, LC: *Luxurians* (teocintle) Control, LI: *Luxurians* (teocintle) Inundación; LS: *Luxurians* (teocintle) Sequía; MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación, MS: Maíz Sequía.

Los miRNAs con valores de Log_2 mayores o iguales a 0.58 se consideraron inducidos, mientras que miRNAs con valores de Log_2 menores o iguales a -0.58 son miRNAs reprimidos por la condición problema.

5.8 Predicción de genes blanco

Para predecir o confirmar predicciones de genes blanco de miRNAs, se empleó el servidor psRNAtarget. Para investigar la anotación funcional de los genes blanco se empleó Phytozome.

6. Resultados y discusión

6.1 Tolerancia a estrés hídrico en maíz y teocintle

Como primer paso en este trabajo, fue necesario determinar los niveles de intensidad del estrés por sequía e inundación en el sistema experimental propuesto en función de la duración de los tratamientos, de tal forma que se pudieran seleccionar adecuadamente los tiempos de muestreo. Para esto, se realizaron pruebas preliminares de estrés progresivo de sequía y sumersión que permitieron observar la aparición de síntomas en el modelo biológico, y su posterior supervivencia, en función de la duración de los tratamientos.

En el caso del tratamiento de sequía, se cuantificó el efecto la suspensión del riego sobre el contenido de agua en el sustrato. Como se observa en la Fig. 10, a partir de la suspensión del riego ocurre una disminución rápida de agua en el sustrato durante los primeros cuatro días, seguida por una pérdida relativamente lenta los días siguientes. Esto puede deberse a que el sustrato pierde primero el agua que está retenida superficialmente en sus partículas, por efecto de drenaje, por evaporación y por extracción por parte de la planta, y posteriormente pierde con mayor dificultad el agua que está fuertemente retenida a las partículas más finas del sustrato, lo que amortigua la pérdida observada al inicio.

Una vez que el sustrato ha alcanzado niveles mínimos de hidratación, comienza la etapa crítica del estrés, ya que el agua que la planta ha retenido comienza a ser insuficiente para sostener el desarrollo, con lo que la planta pierde gradualmente la capacidad para sobrevivir, hasta que es incapaz de recuperarse, aunque se reanude el riego. En el sistema experimental empleado, el nivel crítico comienza después de los ocho días de suspensión del riego (Fig. 10), por lo que este nivel de hidratación se considera el mínimo suficiente, y en adelante se ubicará como el punto 0 en la escala de días sin agua disponible en el sustrato, a partir del cual

comienza la disminución en la supervivencia de las plantas (recuadro rojo en la Fig. 10).

Con el sistema experimental propuesto, el sustrato experimenta una disminución gradual del contenido de agua que permite un nivel de estrés progresivo adecuado. Durante la pérdida gradual, la planta podría realizar ajustes fisiológicos y moleculares que le permitirían tolerar en el mediano plazo, contrario al caso del choque hídrico, en el que la disminución rápida de la hidratación ocasionaría una respuesta emergente de tolerancia en el corto plazo.

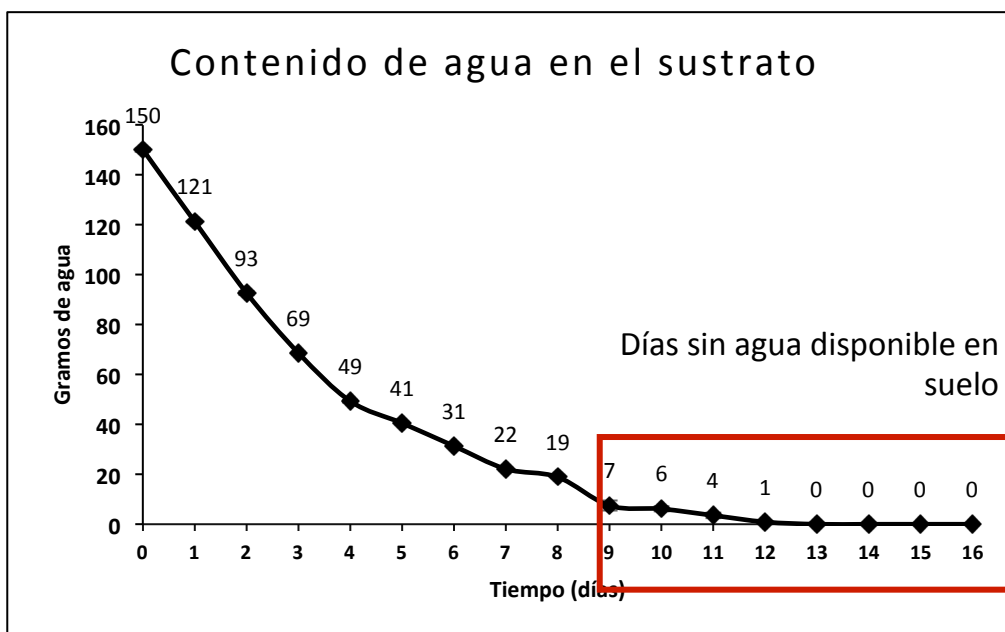


Figura 10. Contenido de agua en el sustrato durante el estrés por sequía progresiva.

Los experimentos preliminares permitieron además seleccionar el tiempo de desarrollo adecuado en las plantas para iniciar los tratamientos. Dado que el sistema experimental para el tratamiento de sumersión requería la inundación total de la planta en el agua, fue importante establecer la edad inicial de las plantas más adecuada para garantizar que su estatura durante el tiempo de tratamiento no sobrepasara el nivel del agua. Adicionalmente, era importante que tanto maíz como teocintle presentaran el mismo nivel de desarrollo, con la finalidad de que

los resultados de las pruebas de tolerancia fueran comparables. A partir de los resultados, se determinó que a 8 ddg, el maíz alcanzaba un grado de desarrollo (4 hojas abiertas) comparable al que presentaba teocintle a los 12 ddg (Fig. 11). Por lo tanto, se seleccionaron dichos tiempos de desarrollo para realizar los experimentos subsecuentes.




INICIO DEL ESTRÉS		
Maíz	Teocintle	
Maíz VS-536	Parviglumis	Luxurians
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapa V2 ▪ 8 ddg 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapa V2 ▪ 12 ddg 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etapa V2 ▪ 12 ddg
		

Figura 11. Desarrollo de las plantas en etapa vegetativa. Se indican los días después de la germinación (ddg) requeridos para alcanzar la etapa V2 en las condiciones de cultivo empleadas. Para referencia de un teocintle subespecie, se incluye en el centro una imagen de *Zea mays ssp. parviglumis*.

6.1.1 Tolerancia a sequía

Una vez establecidos los tiempos adecuados de tratamiento, se realizaron ensayos para analizar la tolerancia a la sequía en maíz y en teocintle. Para estos ensayos se analizó la respuesta en términos de su capacidad para sobrevivir al tratamiento de sequía por periodos de tiempo determinados. Así se determinaron los tiempos letales (TL) que no permitían la supervivencia (TL_0), que permitían la supervivencia del 50% de las plantas (TL_{50}) y que permitían la supervivencia del 100% de las plantas al límite mínimo de contenido de agua en suelo (TL_{100}).

Las imágenes mostradas en la Fig. 12 refieren el estado de las plantas de maíz (Fig. 12a) y teocintle (Fig. 12b) tras haber sido sometidas a sequía progresiva por diferentes periodos de tiempo. En ambas especies, los primeros signos visibles de estrés por déficit hídrico, como el enrollamiento de las hojas, aparecen al primer día sin agua disponible en el suelo y van en aumento al transcurrir el tiempo. Las plantas sometidas a sequía progresiva se muestran con un visible menor desarrollo y menos masa foliar, con respecto al control mantenido en condiciones óptimas de hidratación.

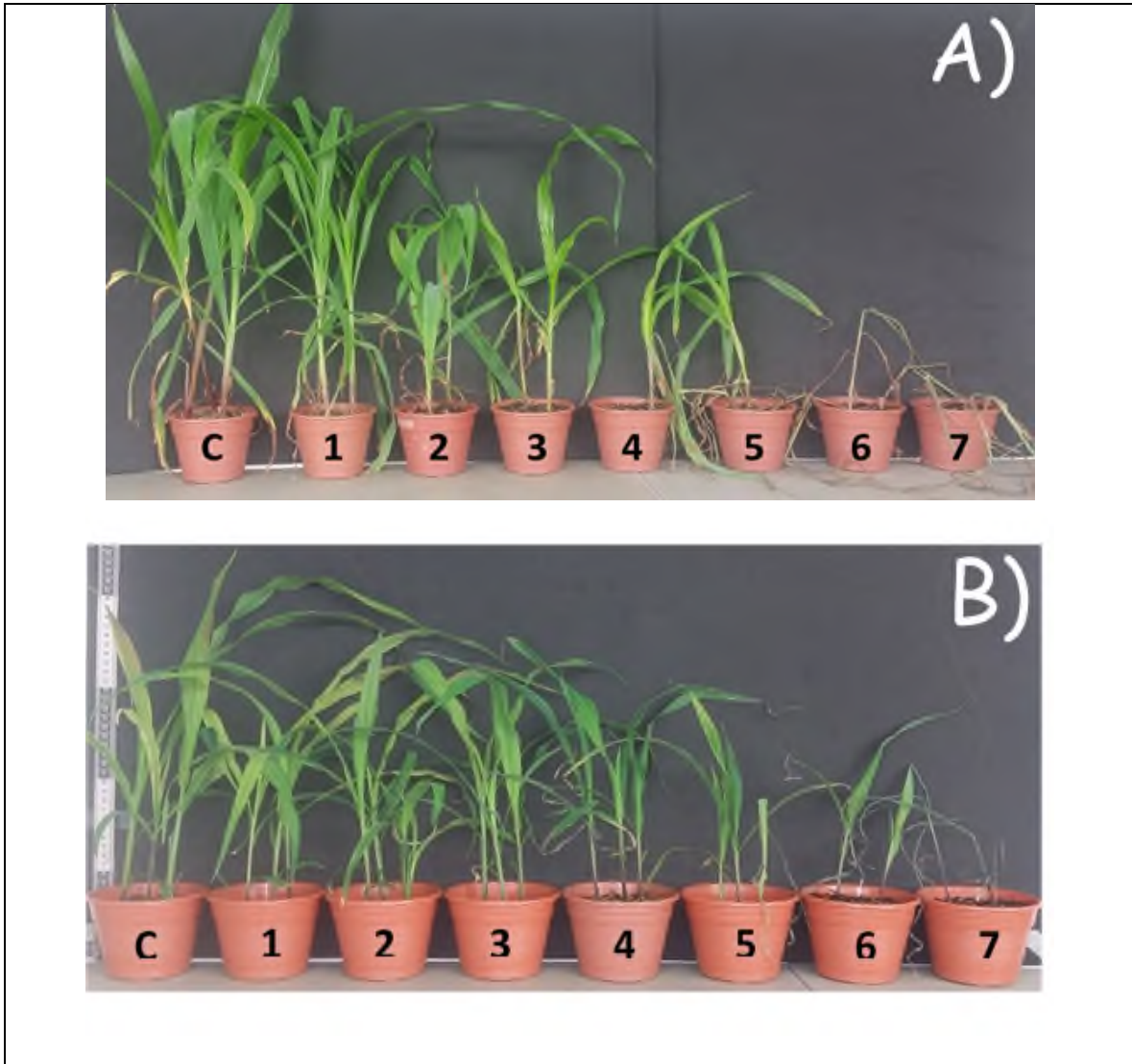


Figura 12. A) Maíz, y B) Teocintle, expuestos a sequía progresiva. La primera planta es el control y enseguida se presentan las plantas sometidas a sequía por el número de días indicado a partir de que no queda agua disponible en el sustrato.

En cuanto al porcentaje de supervivencia a sequía como parámetro de tolerancia, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre ambas especies a lo largo del experimento de sequía progresiva (Fig. 13). En maíz, el tiempo letal 50 (TL_{50}) ocurre 3 días después de que la planta se queda sin agua disponible en el suelo (correspondiente a 11 días a partir de que se suspende el riego). Este dato no muestra diferencia estadística significativa respecto al TL_{50} para teocintle.

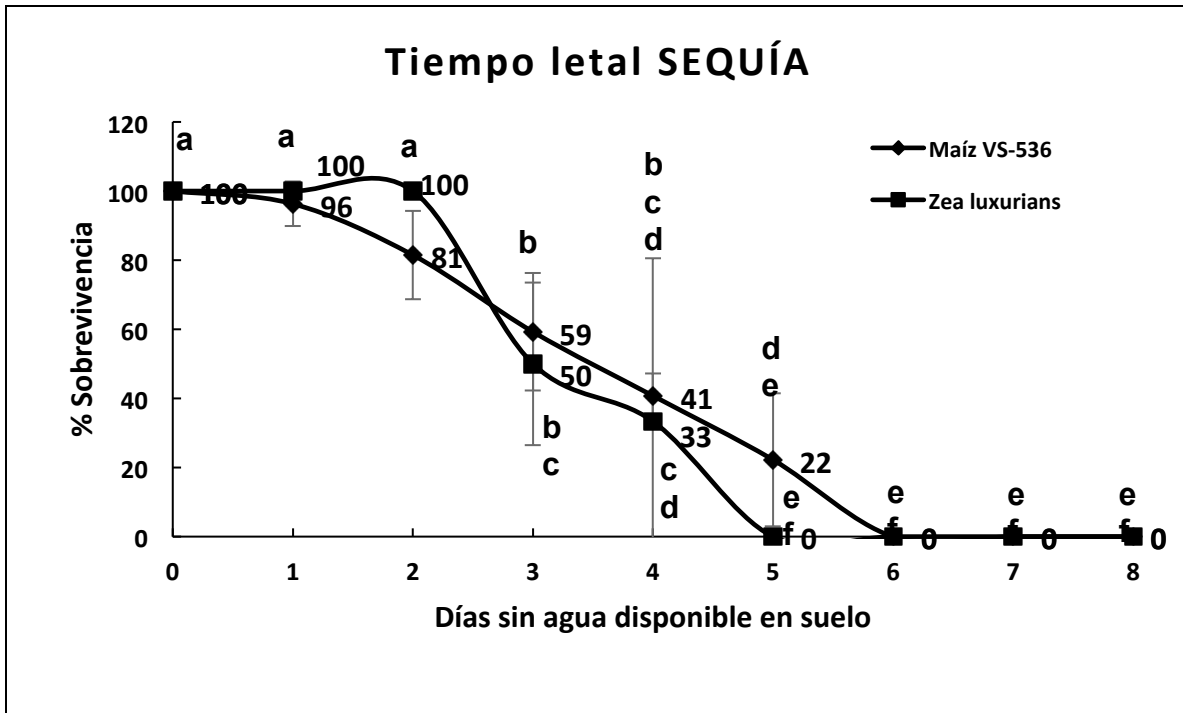


Figura 13. Porcentaje de supervivencia en plantas de maíz y teocintle bajo estrés por sequía progresiva. La gráfica muestra la media \pm SD de 3 experimentos para maíz VS-536 y 1 experimento para teocintle (*Zea luxurians*), las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, ANOVA con una $n=3-5$ ($\alpha=0.05$ Prueba de Fisher)

A pesar de no mostrar diferencias significativas en los porcentajes de supervivencia (Fig. 13), se observaron diferencias claras entre maíz y teocintle sometido a seis días de tratamiento. Como se observa en la Fig. 12, las plantas de maíz sometidas a sequía por seis días muestran daño severo, mientras que las plantas de teocintle sometidas al mismo tiempo de estrés, aún presentan tejido verde, lo que en un principio sugirió que las plantas podrían recuperarse del estrés. No obstante, las plantas de teocintle no desarrollaron más hojas tras la liberación del estrés, por lo que no se consideraron como sobrevivientes. De esta manera, el porcentaje de supervivencia no permitió diferenciar la tolerancia a sequía entre las dos especies estudiadas, en caso de existir, por lo que es importante remarcar que se trata de un parámetro extremo, y que la definición de tolerancia en base a este parámetro considera únicamente la consecuencia final

del estrés. Es probable que otras mediciones fisiológicas, como el contenido de clorofila, la superficie foliar verde, o el ajuste osmótico, puedan determinar de forma más efectiva las probables diferencias en tolerancia entre las dos especies.

6.1.2 Tolerancia a inundación

En el experimento preliminar de sumersión realizado al inicio del trabajo, se observó que maíz y teocintle presentaban diferente capacidad para mantener su viabilidad ante la exposición al estrés. Las plantas de maíz perdían su color y empezaban a manifestar signos de necrosis cuando el tratamiento sobrepasaba los cinco días, mientras que las plantas de teocintle mostraban menor daño en ese tiempo. Con base en el experimento preliminar, se diseñó un experimento de sumersión durante 10 días y se analizó la tolerancia al estrés mediante el porcentaje de supervivencia de las plantas.

En la Fig. 14 se muestran imágenes de las plantas sometidas a sumersión por distintos periodos de tiempo. En el caso del maíz (Fig. 14a), las plantas presentan tolerancia al estrés por un tiempo de tratamiento limitado. Después de cuatro días de estrés las plantas no son capaces de sobrevivir. En contraste, teocintle muestra una mayor capacidad para mantener sus signos de vitalidad, incluso al día seis de sumersión. Pasado el día seis de tratamiento, las plantas de teocintle comienzan a desarrollar amarillamiento, hasta perder su capacidad de sobrevivir al día 10 de tratamiento.

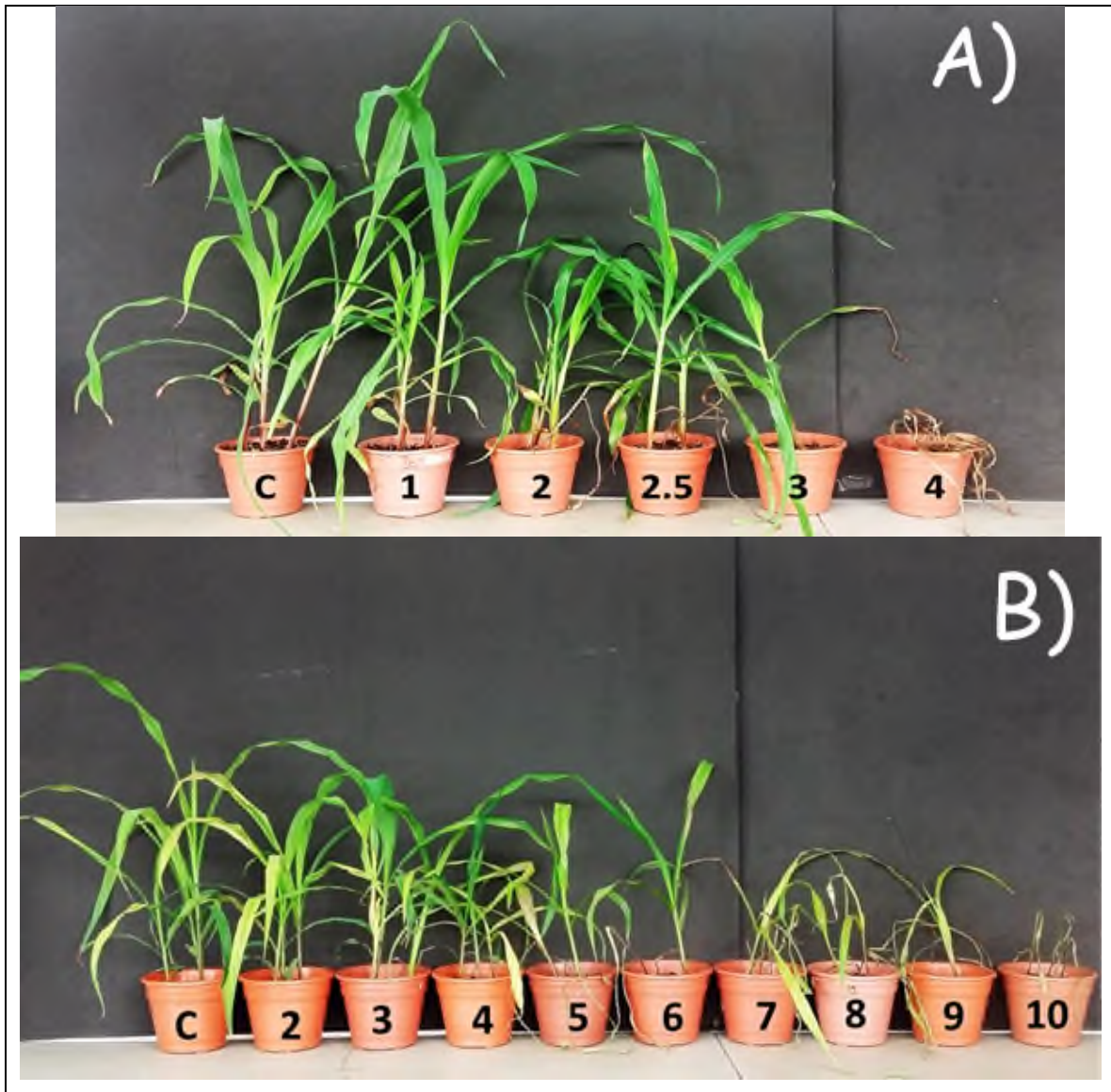


Figura 14. A) *Zea mays*, y B) *Teocintle*, expuestos a inundación. La primera planta es el control y enseguida se presentan las plantas sometidas a inundación (sumersión) por el número de días indicado.

La gráfica en la Fig. 15 muestra la tolerancia de plantas de maíz y teocintle a la inundación en función de su supervivencia al estrés. De acuerdo a los resultados, se establece que el TL_{50} para teocintle ocurre a los 5 días en sumersión, mientras para maíz, el TL_{50} es de 2-3 días en sumersión. Por lo tanto, teocintle posee una capacidad mayor para tolerar la sumersión que maíz, en términos de la protección de su viabilidad y la supervivencia al estrés.

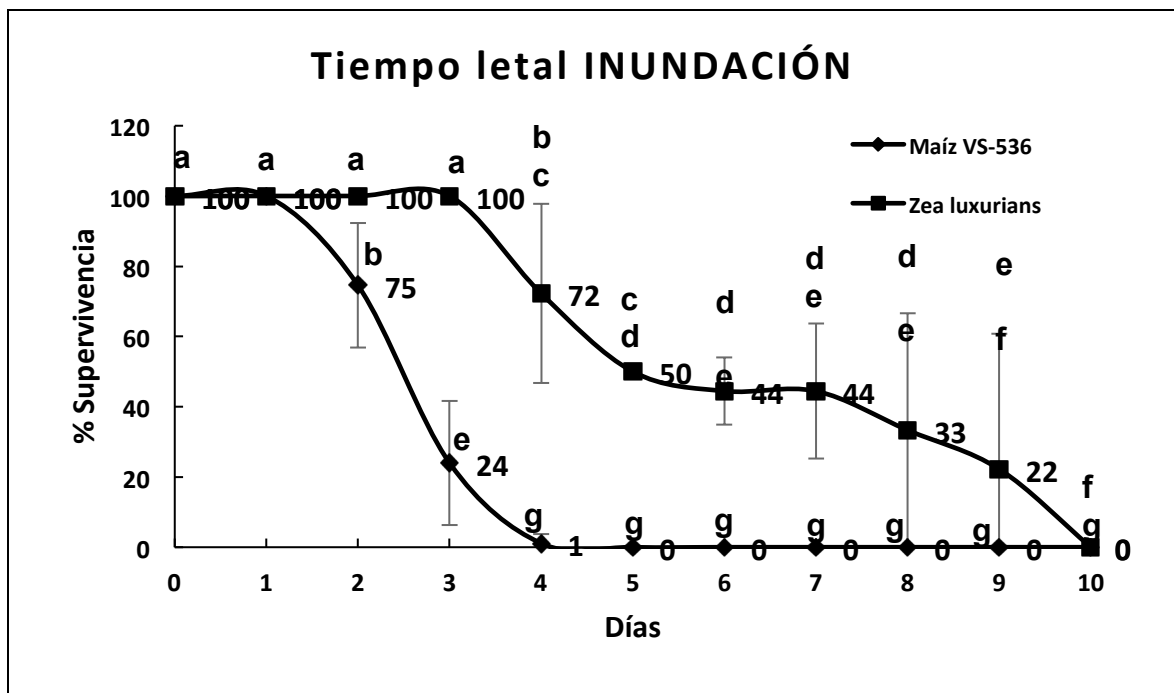


Figura 15. Porcentaje de supervivencia de maíz y teocintle a la inundación durante el tratamiento de inundación total. La gráfica muestra la media \pm SD de 3 experimentos para maíz VS-536 y 1 experimento para teocintle (*Zea luxurians*), las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, ANOVA con una $n=3-5$ ($\alpha=0.05$ Prueba de Fisher).

Con el objetivo de evaluar la tolerancia a la inundación en plantas, se han empleado diversos parámetros fisiológicos y morfológicos. En el caso del teocintle y el maíz, la tolerancia se ha determinado en base a una serie de características como el grado de daño foliar, el contenido de clorofila de las hojas y el peso seco de la planta después de la inundación, y la formación de aerénquima constitutivo o inducible bajo las condiciones de estrés (Mano y Omori, 2013). Además del aerénquima, se ha asociado la mayor tolerancia a la inundación a la capacidad de formación de barreras radiales que limitan la pérdida de oxígeno en raíces adventicias en teocintle (Abiko *et al.*, 2012). Otro parámetro de tolerancia a la inundación es el WTC (Coeficiente de tolerancia a la inundación), que compara el desarrollo de las plantas, en términos de longitud y peso seco de parte aérea y raíces, entre plantas sometidas a tratamientos control y de inundación (Qiu *et al.*, 2007).

Aunque no se puede negar su importancia, en este trabajo no se midieron los parámetros clásicos de tolerancia al estrés anteriormente mencionados, sino que se optó por obtener información definitiva de la capacidad del maíz y del teocintle para tolerar la sequía y la inundación, representada en el potencial para proteger funciones vitales que les permiten recuperarse del estrés y sobrevivir. En monocotiledóneas como el arroz, la capacidad de recuperación después de la inundación o de la sequía, es una de las características de tolerancia más prominentes en los genotipos tolerantes (Fukao *et al.*, 2011; Rivera-Contreras *et al.*, 2016). Por lo tanto, en este trabajo se cuantificó la supervivencia a la sequía y la inundación como marcador fisiológico de tolerancia.

6.2 Respuesta a tratamientos secuenciales de sequía e inundación

En el ambiente natural, el cultivo de maíz se lleva a cabo en zonas donde la sequía y la inundación pueden presentarse de forma alternada durante un mismo ciclo de cultivo, lo que haría posible la existencia de rutas de respuesta entrecruzada en dicha especie. Con la finalidad de analizar el tipo de contribución que tendría un estrés primario o secundario sobre los efectos de un evento único de estrés, en términos de la capacidad de la planta para conservar la viabilidad, se diseñaron ensayos de supervivencia considerando los tiempos letales críticos (TL₅₀ y TL₁₀₀) determinados previamente para ambos estreses y realizando tratamientos únicos o en combinaciones, tal como se indica en las secciones 5.4 y 5.5 de Materiales y Métodos.

Dentro de las plantas sujetas a un solo tipo de estrés, existen dos categorías para permitir la comparación con los estreses combinados: por una parte, se tienen plantas tratadas con estrés único temprano (SEQ o INU), comparables con tratamientos primarios y, por otra parte, plantas tratadas con estrés único tardío (~SEQ o ~INU), comparable con tratamientos secundarios, de acuerdo a lo indicado en la sección 5.5

Las imágenes de la Fig. 16 muestran el aspecto general de las plantas sometidas a tratamientos de estrés únicos y secuenciales. Las plantas sujetas a estrés único, para ambas categorías, se muestran en los paneles a y b de la Fig. 16, y en el panel c se muestran las plantas tratadas con estrés secuencial a las dosis de tiempo letal (TL) indicadas. En todos los tratamientos se observaron los efectos negativos del estrés sobre el desarrollo de las plantas.

Con fines de comparación, en la Fig. 17 se remarcan los ejemplares tratados que fueron sometidos a estrés secuencial, relacionándolos con los estreses únicos correspondientes, donde se observa lo siguiente:

- 1) El caso de la sequía seguida por inundación. El tratamiento de sequía como estrés único a las dosis TL100 y TL50 produjo síntomas notorios sobre las plantas, como el marchitamiento y la disminución del desarrollo, mientras que la inundación como estrés único no mostró efectos tan severos. Sin embargo, cuando los tratamientos se aplicaron en secuencia, el efecto primario causado por la sequía resultó irreversible, y aunque la inundación también contribuyó al daño, lo hizo de forma minoritaria.
- 2) El caso de la inundación seguida por sequía. El tratamiento de inundación como estrés único produjo efectos dependientes de la dosis (TL) aplicada. En las plantas se observó principalmente la disminución del crecimiento. Por su parte, los tratamientos de sequía aplicados también produjeron efectos negativos en las plantas. Sin embargo, cuando la sequía estuvo antecedida por el tratamiento de inundación, las plantas presentaron una vitalidad elevada, comparada con el tratamiento de sequía único, y al menos aparentemente, las plantas que se sometieron a inundación y sequía se asemejan a las que solo fueron tratadas con inundación.

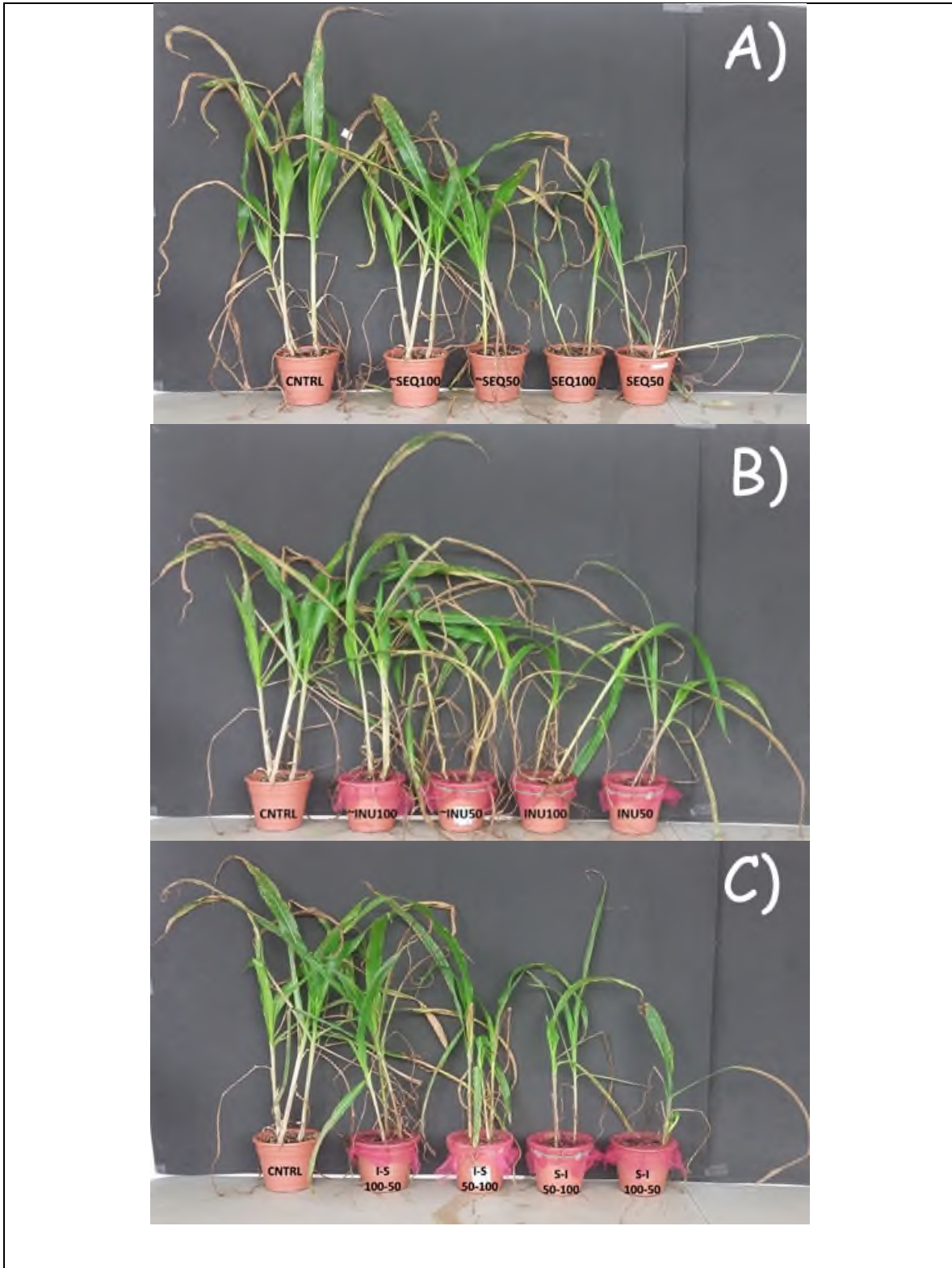


Figura 16. Plantas de maíz (*Zea mays*) tratadas con A) sequía, o B) inundación (sumersión), o C) estrés secuencial a las dosis indicadas en las macetas.

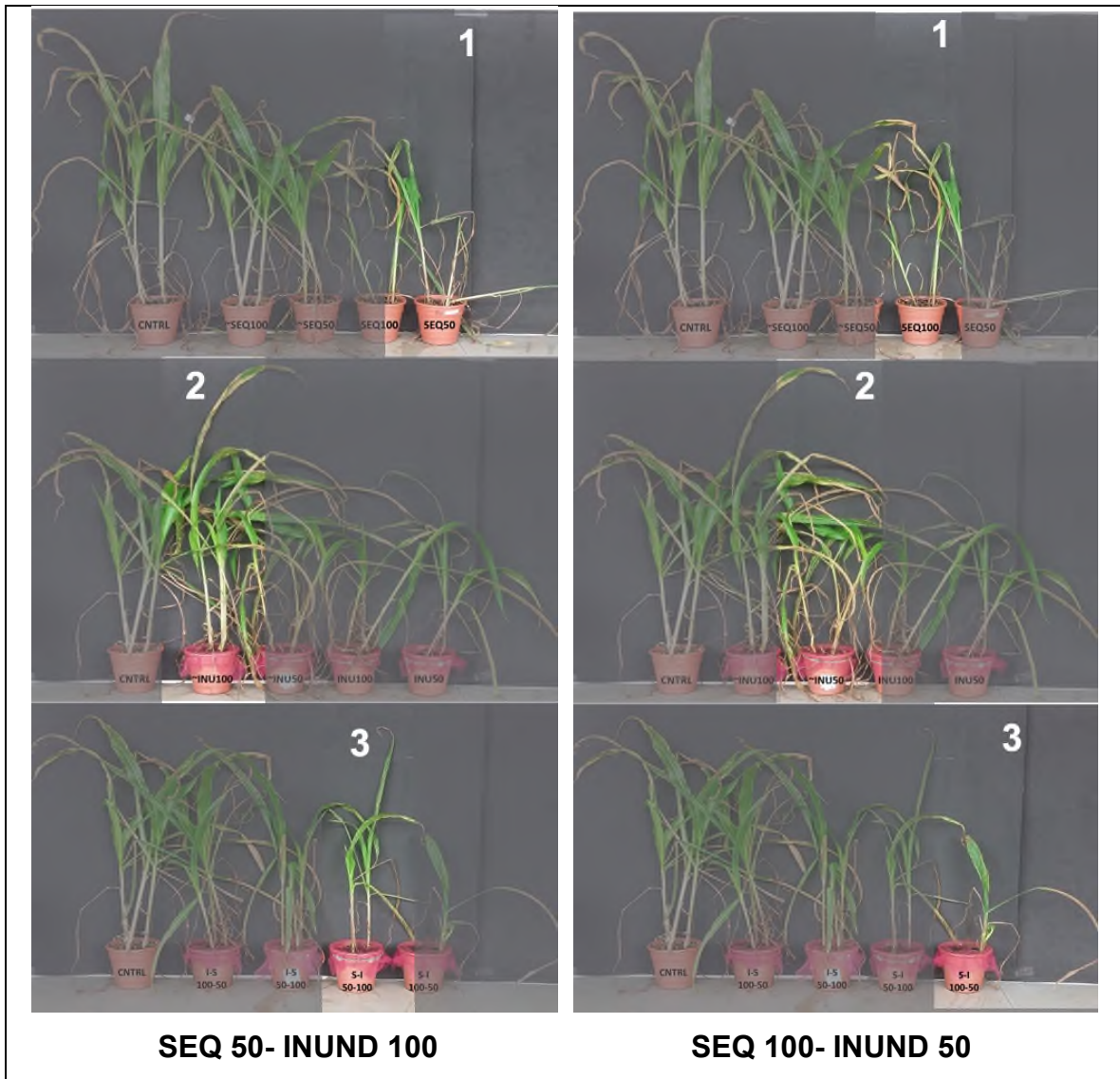


Figura 17. Tratamientos secuenciales de sequía-inundación a las dosis indicadas. Se señala 1) el tratamiento primario, 2) el tratamiento secundario, y 3) el tratamiento secuencial.

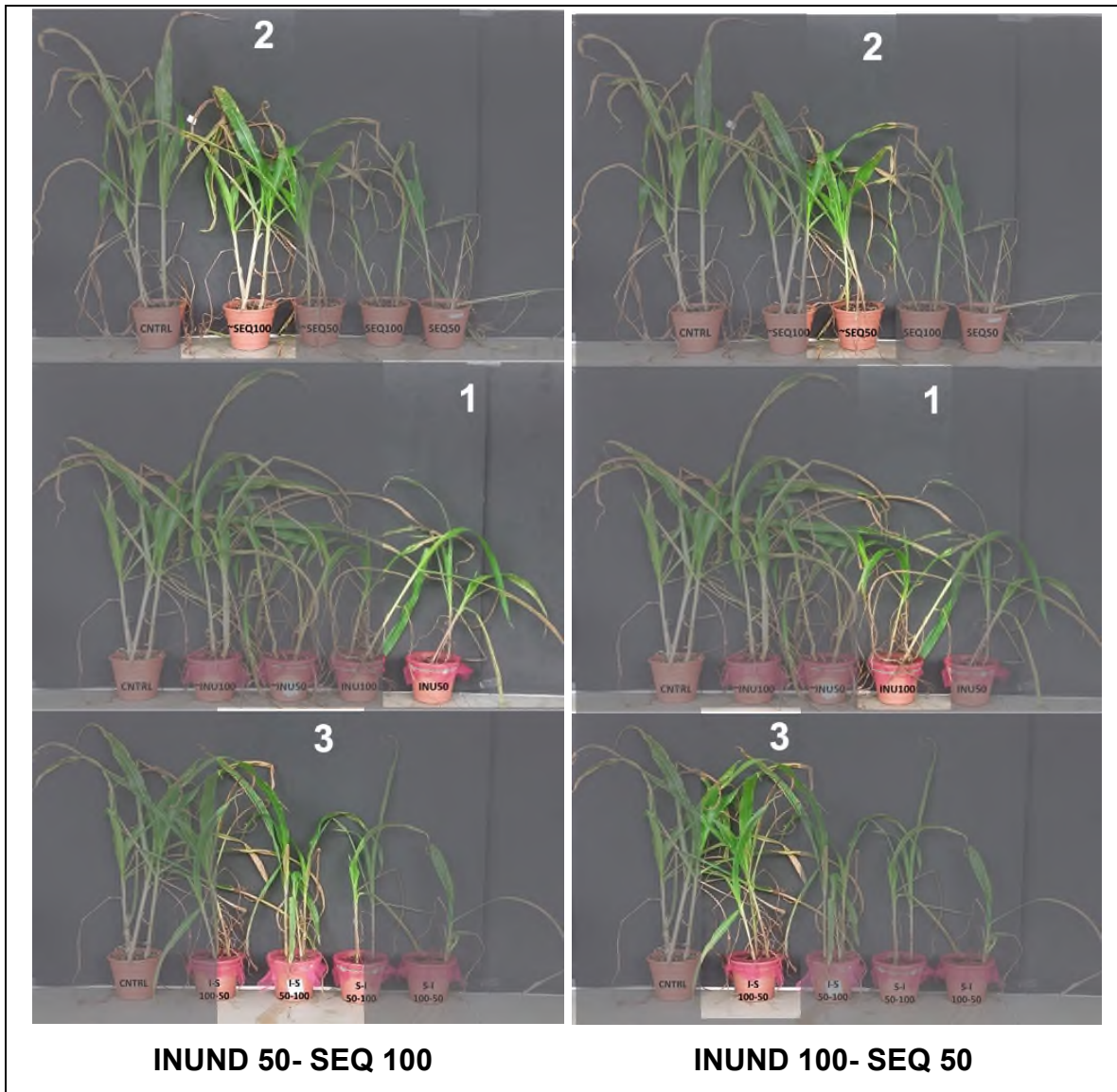


Figura 17 (continuación). Tratamientos secuenciales de inundación-sequía a las dosis indicadas. Se señala 1) el tratamiento primario, 2) el tratamiento secundario, y 3) el tratamiento secuencial.

En cuanto a la supervivencia de las plantas, se observó que el tratamiento de inundación con 100% de supervivencia, seguido de sequía con 50% de supervivencia (INU100-SEQ50), produjo los mejores resultados en relación al resto de los tratamientos (Fig. 18), con una supervivencia del 98%, que es mayor de lo esperado. Por su parte, el tratamiento secuencial INU50-SEQ100 mantiene

la supervivencia al primer estrés (alrededor de 75%), donde el primer estrés dado por inundación no predispone a la planta al segundo estrés dado por sequía. De manera contraria ocurre en los tratamientos de SEQ100-INU50 y SEQ50-INU100, donde la supervivencia de las plantas es menor a la esperada siendo de 29 y 9% respectivamente.

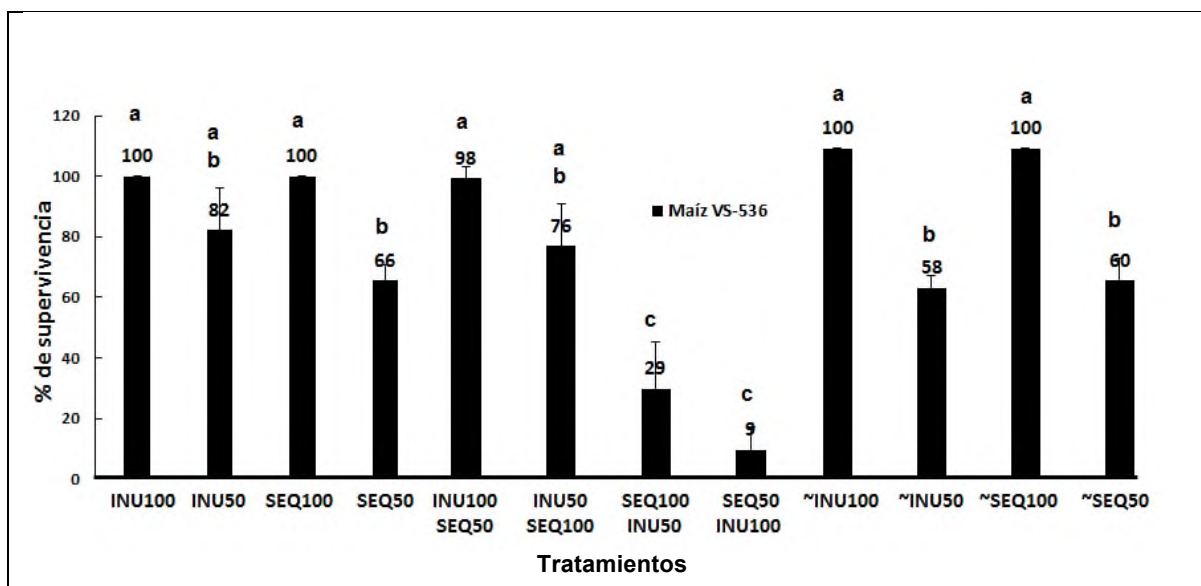


Figura 18. Porcentaje de supervivencia a tratamientos únicos y secuenciales de inundación y sequía. La gráfica muestra la media \pm SD de 3 experimentos para maíz VS-536. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, ANOVA con una $n=3-5$ ($\alpha=0.05$ Prueba de Fisher). El símbolo ~ antecediendo la leyenda de estrés indica los controles de referencia para el estrés secundario.

De manera interesante, se observó en el caso de los tratamientos primarios, que las TL₅₀, por sí mismas resultaron con una supervivencia mayor de lo esperado (Fig. 18). Sin embargo, si se considera que en las plantas que pasan de un tratamiento de INU100 a otro de SEQ50, se debía al menos haber reducido su supervivencia a la del estrés secundario (~SEQ₅₀, Fig. 18), y que esta situación no ocurrió, entonces se puede hipotetizar que la inundación tendría un efecto protector que minimiza los daños de un evento consecutivo de sequía.

Al inicio de este trabajo se planteó que el tratamiento de inundación inicial seguido por sequía debía diseñarse de forma adecuada, ya que después de la inundación,

el contenido de agua en el sistema sustrato:planta estaría saturado y debería asegurarse que alcanzara un estado normal de hidratación antes de pudiera iniciarse el estrés por sequía. Para eliminar cualquier sesgo, las macetas en estos experimentos fueron pesadas después del tratamiento de inundación, y se esperó hasta que alcanzaran el peso de las macetas control, para poder iniciar el tratamiento de sequía.

De esta manera, sin importar si provenían de un evento de inundación, las plantas que se trataron con sequía (INU-SEQ y ~SEQ) se ajustaron al mismo peso antes de iniciar el tratamiento de sequía, con la finalidad de que su estado hídrico fuera el mismo. Adicionalmente, se cuantificó el contenido relativo de agua en hojas al término de los tratamientos. La Fig. 19 muestra que las plantas que se sometieron a estreses secuenciales se encontraban en igualdad de condiciones hídricas con respecto a sus controles de estrés único.

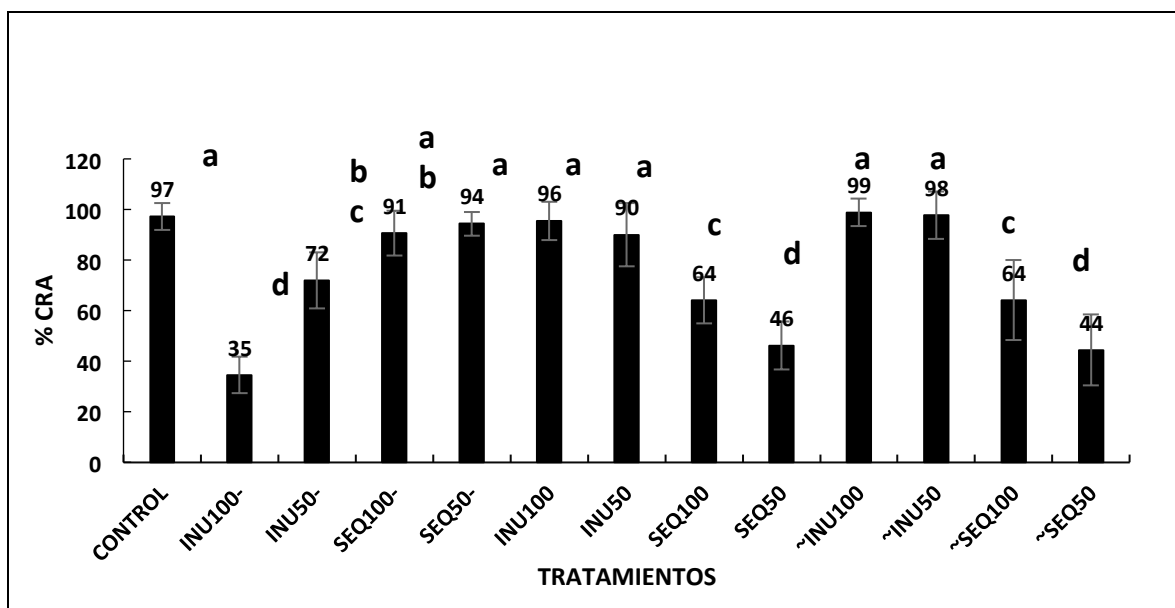


Figura 19. Contenido Relativo de Agua en hojas (CRA), de maíz VS-536. La gráfica muestra la media \pm SD, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, ANOVA con una $n=3$ ($\alpha=0.05$, prueba de Tuckey).

Es importante notar que el contenido relativo de agua en hojas de las plantas tratadas con INU100-SEQ50 y su control respectivo de estrés secundario, ~SEQ₅₀ mostraron los valores más bajos, de 35 y 44 en promedio, respectivamente, sin diferencias estadísticamente significativas, y que a pesar de haber concluido los tratamientos con CRAs similares, su supervivencia no fue igual, sino de 98 y 60%, respectivamente. Esto sugiere que aún con un estado hídrico bajo al final de los tratamientos, las plantas pueden tener capacidades que no dependen directamente del nivel de hidratación al nivel de tejido, pero que les permiten recuperar la vitalidad cuando el agua ya no es un recurso limitante.

6.3 Observaciones sobre la tolerancia a sequía e inundación en plantas

En trabajos previos del laboratorio realizados con la planta monocotiledónea modelo *Brachypodium distachyon*, se observó que el tratamiento de estrés por sumersión por corto tiempo, aplicado en etapas muy tempranas del desarrollo, lograba alterar eventos que sucederían varias semanas después en la planta. Específicamente, las plantas que estuvieron sometidas a la sumersión por un breve periodo de tiempo eran capaces de recuperarse, pero un proceso que ocurriría varias semanas después, como es el tiempo a floración, se veía atrasado por efecto del estrés, y así las plantas presentaban floración tardía (Flores-Herrerías, 2016). Por lo tanto, resulta claro que la inundación tiene efectos duraderos en el mediano plazo y así es lógico considerar que un evento de sumersión en maíz, por breve que fuera, podría tener efectos sobre la respuesta a un estrés subsecuente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el tratamiento de sumersión tiene efecto positivo sobre la capacidad del maíz para sobrevivir a un evento posterior de sequía. Cabe señalar que a la fecha no existen trabajos publicados que hayan abordado los efectos del estrés hídrico secuencial, por lo que las observaciones derivadas de este trabajo solo pueden compararse con referencias

previas de trabajos sobre estrés único. Las hipótesis acerca de los mecanismos que permitirían la posibilidad de que un estrés primario brinde tolerancia a un estrés secundario y de naturaleza opuesta son diversas, y pueden implicar la participación de rutas entrecruzadas entre ambos tipos de estrés, o de elementos moleculares comunes involucrados en diferentes etapas de la respuesta, desde la percepción del estrés, hasta la regulación génica a todos los niveles. En apoyo de esta idea, se tienen antecedentes de que en ciertas subpoblaciones de arroz coexiste la tolerancia a sequía y la inundación (Rahman y Zhang, 2017). Además, de acuerdo a Fukao *et al.* (2011), se demostró que existe al menos un factor de transcripción, llamado SUB1A, que podría constituir un nodo regulador positivo de la tolerancia simultánea en arroz, ya que las plantas de arroz que lo sobreexpresan son altamente tolerantes a la inundación y también a la sequía.

El caso de SUB1A es un ejemplo de un factor que al expresarse en arroz permite la tolerancia a ambos tipos de estrés, y esto podría explicar por qué las plantas en sequía son más tolerantes si pasaron por un evento de inundación previo. Si la inundación activa genes de tolerancia que mantienen su expresión aun cuando la inundación ha cedido, como corresponde al efecto en el largo plazo característico de la respuesta a la inundación, las plantas estarán protegidas en el siguiente evento de estrés, en este caso, la sequía, y por lo tanto serán tolerantes.

Es importante considerar que existen otros elementos comunes en la respuesta molecular a la sequía y la inundación que actúan de forma diferencial para la tolerancia, es decir, de forma opuesta en cada uno de los tipos de estrés. Un ejemplo de esto es ETHYLENE OVERPRODUCER 1-LIKE, OsETOL1, un gen cuyo producto regula negativamente la síntesis de etileno en arroz. OsETOL1 se induce a niveles similares en respuesta a la sumersión y a la sequía (Du *et al.*, 2014). Su inducción tiene un efecto positivo en la tolerancia a la sumersión, ya que aumenta la síntesis de etileno y con esto estimula el consumo de carbohidratos que favorecen la elongación de la planta para el alivio de la hipoxia. En contraste, en plantas de arroz en etapa reproductiva sujetas a sequía, la inducción de

OsETOL1 tiene un efecto negativo en la tolerancia, ya que a pesar de que las plantas retienen muchas hojas verdes, las flores muestran una pérdida significativa de la fertilidad, y esto afecta la productividad (Du *et al.*, 2014). En este caso, OsETOL1 no sería en principio un buen candidato para incrementar simultáneamente la tolerancia a la sequía y la inundación, aunque en un futuro se podría explorar la posibilidad de encontrar un switch regulador específico, que mediante ingeniería genética o selección, permitiera su expresión durante la inundación y la reprimiera eficientemente durante la sequía.

Con base en todo lo anterior, la selección de candidatos para el mejoramiento de la tolerancia simultánea a la sequía e inundación requiere la identificación de elementos moleculares comunes en la respuesta a ambos tipos de estrés y de su caracterización funcional en la tolerancia. Sin embargo, el hecho de que un gen se exprese en forma similar (de forma común) en los dos tipos de estrés no garantiza que tengan el mismo efecto en la tolerancia, como en el caso de OsETOL1. Si se aprovecha el uso modelos con tolerancia contrastante, como es el caso del maíz y del teocintle, es posible superar esa limitación partiendo de un modelo tolerante, y aproximarse a la identificación de elementos con efectos positivos en la tolerancia a ambos tipos de estrés, como en el caso de SUB1A.

A partir de estas observaciones, se decidió continuar este trabajo hacia la identificación de microRNAs, al ser elementos reguladores maestros posiblemente implicados en el entrecruzamiento de las rutas de respuesta, y con influencia potencial en la tolerancia observada en teocintle.

6.4 Expresión de miRNAs en maíz y teocintle

Para identificar microRNAs de respuesta al estrés hídrico, se construyeron seis bibliotecas de RNAs pequeños que se analizaron contra la base de datos de microRNAs de maíz. La base de datos de microRNAs posee 321 secuencias

maduras de microRNAs de *Zea mays*. Un escrutinio de dichas secuencias permitió observar que de las 321 secuencias maduras de *Zea mays*, solo 81 son secuencias únicas. El resto, 120 secuencias maduras, tienen más de un representante con la misma secuencia. Por lo tanto, para reducir el análisis a secuencias únicas, en el caso de las que resultaron redundantes, se tomó solo una como referencia y se eliminó al resto, para dar un total de 201 secuencias. Estas 201 secuencias maduras constituyeron el índice de microRNAs de maíz que se empleó para el análisis de expresión.

De las 201 secuencias maduras, 89 se expresaron en al menos una de las especies, y no se encontró evidencia de las 112 secuencias restantes. La ausencia de estas secuencias en las bibliotecas se debe probablemente a que no se expresan, o su expresión esté sujeta a otras condiciones de crecimiento o etapas de desarrollo no analizadas en este trabajo, o bien, en un caso menos probable, a que sus niveles de acumulación están por debajo de los límites de detección de las técnicas empleadas.

Además de las secuencias de maíz, se realizó la búsqueda de microRNAs reportados en otras plantas, encontrando 44 secuencias adicionales expresadas en al menos una de las especies. Con esto, el análisis final incluyó 89 secuencias maduras de microRNAs de maíz y 44 reportadas en otras plantas, dando un total de 133. La lista de microRNAs expresados, incluyendo los conteos en TPM y su expresión comparativa, se presenta en el Anexo 1.

6.4.1 Análisis de bibliotecas control

Con la finalidad de observar similitudes y diferencias constitutivas (sin influencia del estrés) en la expresión de microRNAs, se comparó la abundancia de lecturas en las bibliotecas de maíz y teocintle en condiciones control. El análisis reveló que las plantas de maíz en la condición control expresaron todos los microRNAs

analizados (133 secuencias), mientras que teocintle expresó únicamente 107 en la misma condición. La diferencia de 26 microRNAs pudo deberse a que en general, las bibliotecas de teocintle rindieron menor número total de secuencias que las de maíz. A pesar de esta diferencia, resultó interesante que los microRNAs más abundantes de maíz fueron también los más abundantes en teocintle. En la Fig. 20 se muestra la abundancia e identidad de los 5 microRNAs con mayor número de secuencias en ambas bibliotecas.

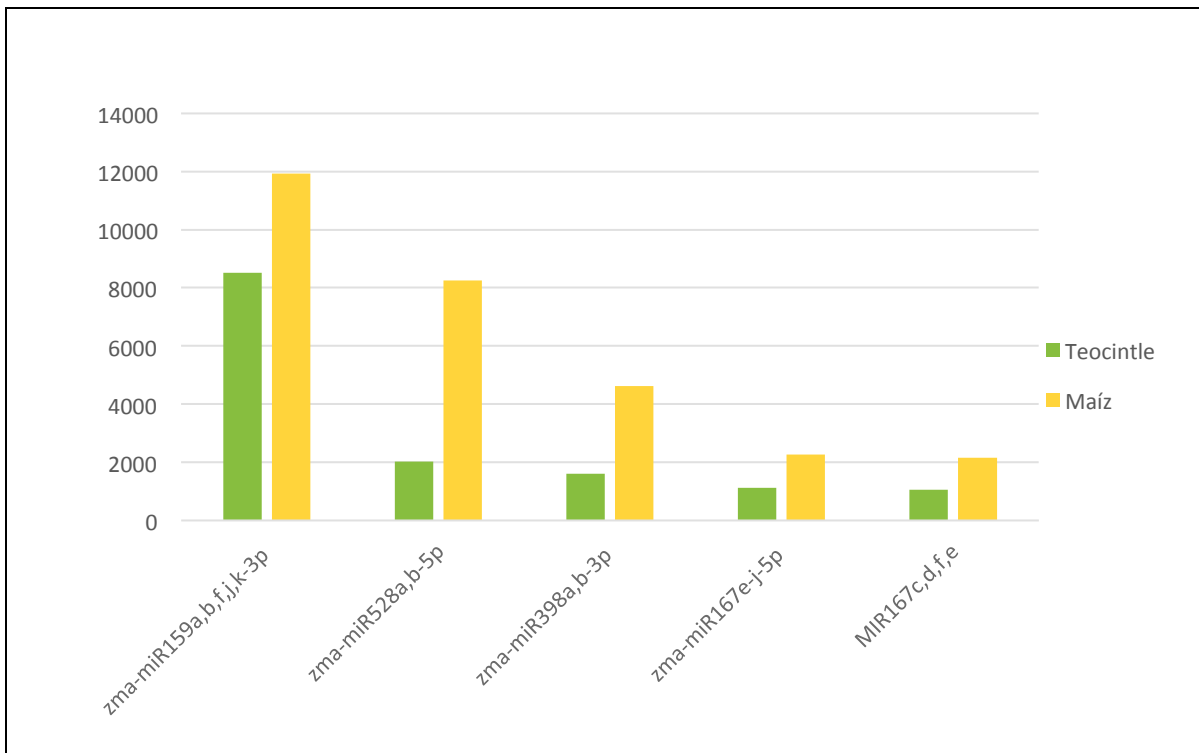


Figura 20. MicroRNAs más abundantes en plantas de maíz y teocintle en condiciones control, expresados en veces por millón (TPM).

De acuerdo a los datos de secuenciación, miR159 fue el más abundante en ambas especies. MiR159 tiene efecto regulador sobre factores de transcripción MYB, los cuales forman una familia amplia con diversidad funcional en plantas. Los MYB participan en la regulación del desarrollo, metabolismo, señales hormonales, defensa a enfermedades y respuesta al ambiente, entre otras (Ambawat *et al.*, 2013). Los factores MYB se han asociado ampliamente al ácido

abscísico, que es una hormona importante en la respuesta al estrés abiótico en plantas (Roy *et al.*, 2016).

Por otro lado, el segundo miRNA más abundante fue miR528, el cual regula a la superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidasa (POD), que participan en la respuesta antioxidante (Balyan *et al.*, 2017). El microRNA398 fue el tercer miRNA más abundante, y al igual que miR528, regula a CSD1 y CSD2, dos superóxido dismutasas dependientes de cobre implicadas en la respuesta antioxidante en plantas (Sunkar *et al.*, 2006; Jagadeeswaran *et al.*, 2009). Finalmente, en la cuarta y quinta posición de abundancia, se encontraron dos secuencias de la familia miR167. MiR167 ejerce control postranscripcional de factores de respuesta a auxinas (ARF), los cuales se inducen en respuesta al estrés hídrico (Liu *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, la abundancia de los 5 miRNAs mencionados permitiría mantener bajo control a genes clave para la respuesta al estrés, mismos que en condiciones normales no serían necesarios. La expresión elevada de dichos miRNAs en las plantas control es indicativo del nivel de represión que se tiene sobre los genes blanco mencionados. Además, es remarcable el hecho de que la expresión elevada de estos microRNAs sea un fenómeno conservado en las dos especies bajo estudio.

Adicionalmente, se realizó el análisis de expresión diferencial entre las dos especies bajo condiciones control, encontrando un total de 64 miRNAs que presentan mayor acumulación en teocintle que en maíz, expresado como valores de $\text{Log}_2 \text{LC/MC}$ mayores o iguales a 0.58 (Anexo 1), mientras que 25 miRNAs se acumularon mayoritariamente en maíz, en comparación a teocintle. Brevemente, los miRNAs más relevantes que se derivaron de este análisis comparativo se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. MicroRNAs con expresión diferencial en maíz y teocintle bajo condiciones control de crecimiento.

miRNAs aumentados en teocintle			
MiRNA	Secuencia	Log2 LC/MC	Gen(es) blanco
MIR397a,b	ATTGAGTGCAGCGTTGATGAA	4.86	LAC
zma-miR166j,k,n-3p	TCGGACCAGGCTTCAATCCCT	4.03	HD-ZIP III
MIR396a//MIR396d//	TCCACAGGCTTTCTTGAAGT	2.81	GRF
zma-miR166a-3p	TCGGACCAGGCTTCAATCCCT	1.63	HD-ZIP III
zma-miR408a,b	CTGCACTGCCTCTCCCTGGC	1.48	PLANTACYANIN, LAC,CUPREDOXIN
zma-miR166b-i-3p	TCGGACCAGGCTTCAATCCCT	1.45	HD-ZIP III
zma-miR396f-3p	GGTCAAGAAAGCTGTGGGAAG	1.45	GRF
MIR408d	TGCACTGCCTCTCCCTGGC	1.41	PLANTACYANIN, LAC,CUPREDOXIN
zma-miR168a,b-5p	TCGCTTGGTGCAGATCGGGAC	0.84	
miRNAs aumentados en maíz			
MiRNA	Secuencia	Log2 MC/LC	
MIR408	CAGGGATGAGGCAGAGCATGG	11.09	PLANTACYANIN, LAC,CUPREDOXIN
zma-miR408b-5p	CAGGGACGAGGCAGAGCATGG	7.42	
zma-miR166a-5p	GGAATGTTGTCTGGCTCGGGG	3.39	HD-ZIP III
zma-miR166c-5p	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG	2.12	HD-ZIP III
zma-miR528a,b-5p	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	2.03	SOD y POD
zma-miR398a,b-3p	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCCG	1.52	CSD1 Y CSD2
zma-miR167e-j-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTG	1.02	ARF

LAC: Lacase; GRF: Growth regulating factor; SOD: Superoxide dismutase; POD: Peroxidase; CSD1, CSD2: Cu- dependant Superoxide dismutase 1 and 2; ARF: Auxin responsive factor. Ver referencias en el texto.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 1, la expresión de miRNAs en condiciones normales de crecimiento tiene puntos de diferencia entre maíz y teocintle. Por ejemplo, miR397 se expresa fuertemente en teocintle para controlar a sus genes blanco, que codifican lacasas (LAC) (Lu *et al.*, 2013) relacionadas con la producción de lignina. En cambio, en maíz se expresa diferencialmente miR398 para controlar la respuesta antioxidante. miR408 también participa en la respuesta a este tipo de estrés (Ma *et al.*, 2015).

Por otra parte, teocintle y maíz también mantienen control sobre procesos de desarrollo a través de los miRNAs. En el caso del teocintle, el control se observa

con miR396 sobre GRF (Debernardi *et al.*, 2012) y miR166 sobre HD-ZIPIII (Zhong y Ye, 2007), mientras que en maíz se expresa también con miR396 y además con miR167 sobre ARFs. Aunque la expresión constitutiva de procesos regulados por miRNAs en plantas control está balanceado, se apreciaron diferencias interesantes entre ambas especies. Por ejemplo, el caso de la familia miR166, cuyas secuencias están distribuidas de forma diferente entre maíz y teocintle. En la Fig. 21 se presenta la abundancia diferencial de las secuencias de miR166 que se expresaron en las bibliotecas, donde se observa que existe una mayor expresión de secuencias del extremo 3' del miRNA precursor en teocintle que en maíz, (terminación -3p, como en zma-miR166a-3p), y que las secuencias del extremo 5' se expresaron mayormente en maíz que en teocintle. En la Fig. 22 se esquematiza la distribución de las secuencias sobre el precursor para mayor claridad.

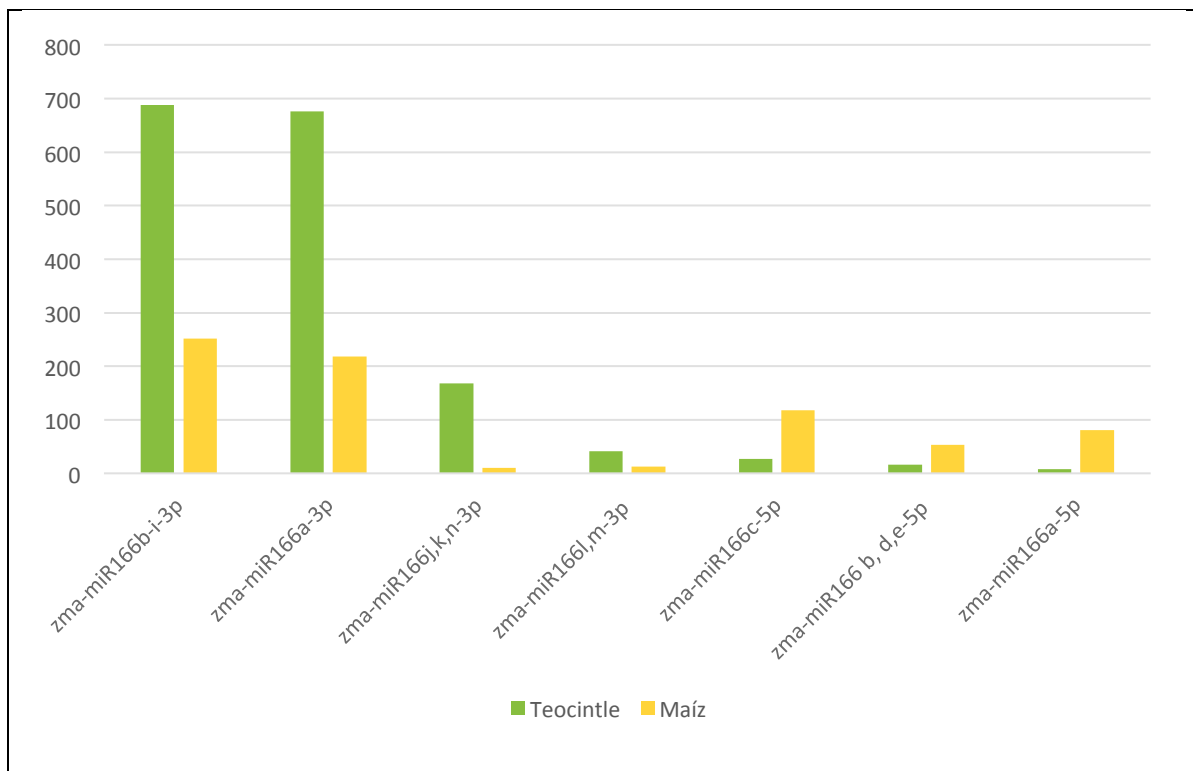


Figura 21. Expresión de secuencias miR166 en las bibliotecas de maíz y teocintle. La abundancia se expresa en TPM.

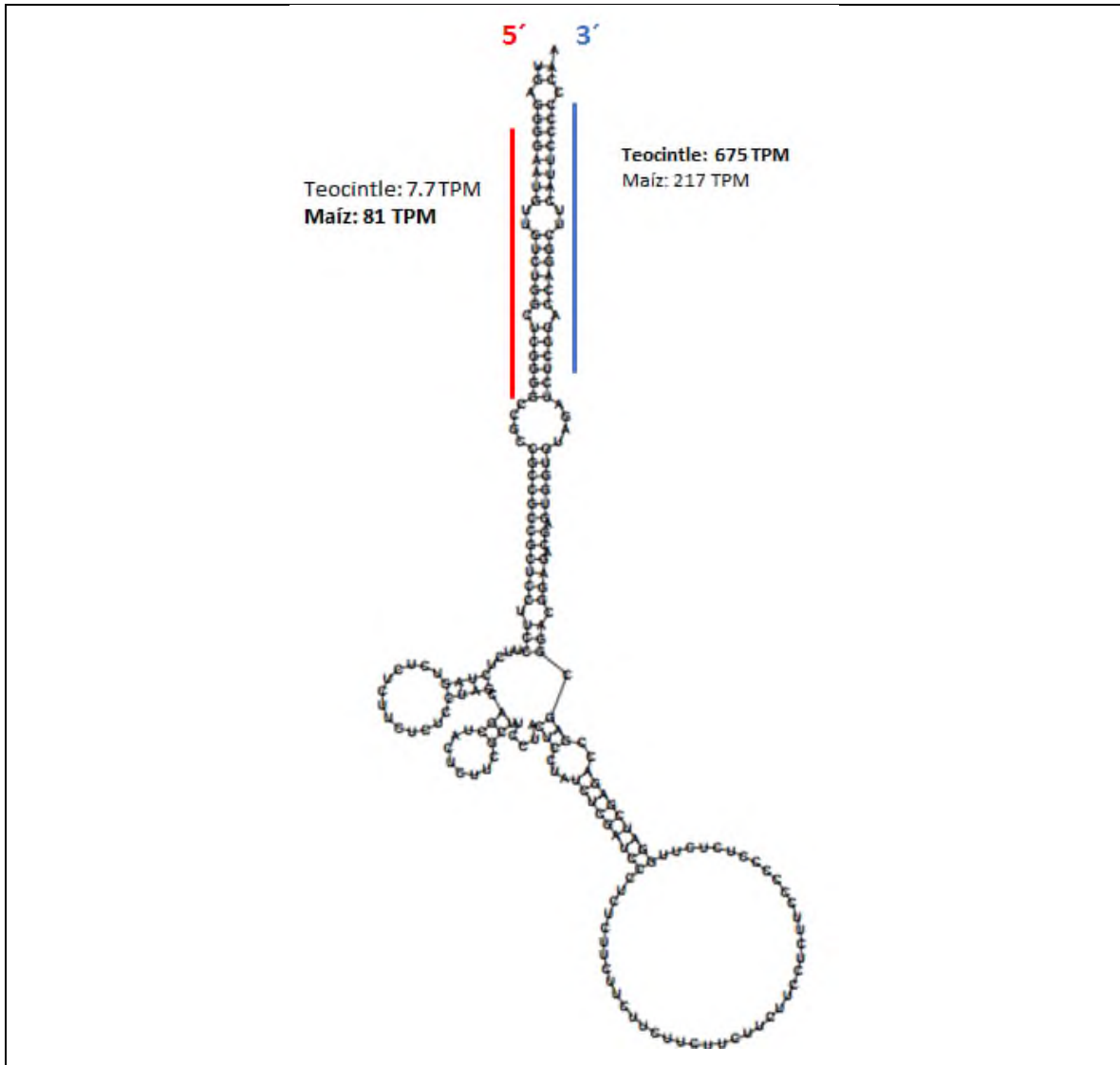


Figura 22. Horquilla precursora de zma-miR166a y abundancia de sus secuencias maduras en las bibliotecas control de maíz y teocintle. La secuencia madura del miRNA en el extremo 5' (zma-miR166a-5p) se señala con la línea roja, y la del extremo 3' (zma-miR166a-3p) se señala con la línea azul.

A partir de la Fig. 22 se hace evidente que la secuencia madura que está mayormente representada en maíz y teocintle es miR166a-3p, y que miR166a-5p, al estar presente en menor abundancia, es el miRNA*. Anteriormente se

consideraba que después del procesamiento del miRNA, el miRNA* se degradaba y no tenía efecto regulador posterior. Sin embargo, se ha demostrado que el miRNA* también puede ser funcional en algunos casos (Okamura *et al.*, 2008). El caso de zma-miR166a, es interesante porque el miRNA maduro y el miRNA* presentan patrones de acumulación diferencial contrarios en maíz y teocintle. Si se pudiera comprobar que el miRNA* en zma-miR166a es activo, se abriría la posibilidad de que un mismo precursor pudiera tener actividad dual regulando genes blanco en sentidos opuestos. Aunque aún no existe confirmación de que miR166a-5p sea funcional, es posible asignar genes blanco potenciales basados en la secuencia. Para miR166a-5p se predice una poliamina oxidasa. Las poliamina oxidasas están implicadas en la respuesta antioxidante durante el estrés salino en maíz y son responsables de mantener la elongación de las hojas bajo la condición de estrés (Rodríguez *et al.*, 2009).

6.5 Análisis de expresión en respuesta al estrés hídrico

6.5.1 Panorama general de la expresión de miRNAs

Las bibliotecas de RNAs pequeños fueron analizadas para identificar perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre tipos de estrés y entre especies. Como resultado del análisis, se observó que la tendencia de expresión en los dos tipos de estrés ocurre mayoritariamente hacia la represión (Fig. 23) y, en consecuencia, a la expresión potencial de un gran número de genes blanco en respuesta al estrés.

En total, teocintle expresa diferencialmente 154 miRNAs en los dos tipos de estrés. Maíz expresa diferencialmente 188 miRNAs. En cuanto al tipo de estrés, la inundación moviliza la expresión de 116 miRNAs, mientras que la sequía moviliza un total de 135 miRNAs en las dos especies (Fig. 23).

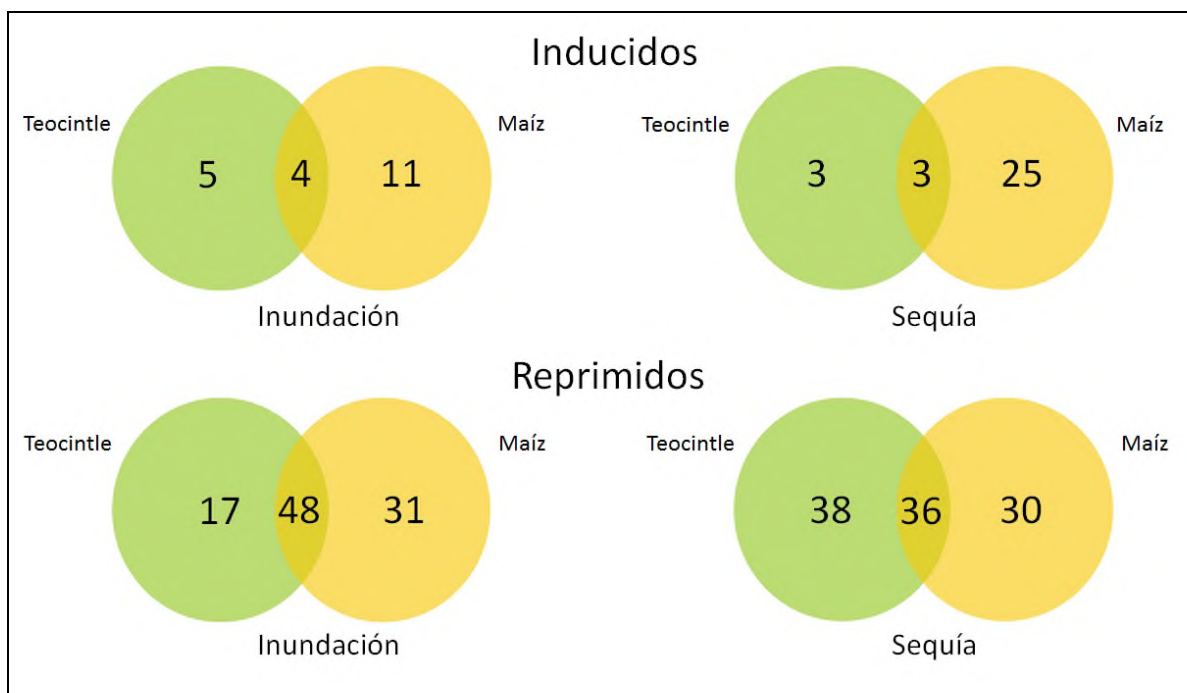


Figura 23. Panorama general de la expresión diferencial de miRNAs en respuesta a la sequía y la inundación en maíz y teocintle.

El diagrama de la Fig. 23 muestra el número y distribución global de las secuencias de miRNAs que presentaron expresión diferencial, con base en su abundancia entre especies y tratamientos. Con la finalidad de obtener información específica que permitiera realizar posteriormente un análisis más detallado de la implicación funcional probable de los miRNAs en la respuesta al estrés, se analizaron individualmente las secuencias en el contexto de la familia a la que pertenecen y al extremo del precursor del cual se desprenden.

Como ejemplo de este tipo de análisis se tiene el caso de miR159a,b. Este miRNA se ubica en la intersección de teocintle y maíz de los miRNAs inducidos en inundación, en el diagrama que se muestra en la Fig. 23. De ahí, se podría considerar que miR159a,b es un miRNA que se induce por inundación en las dos especies, y por tanto, esto sugiere que sus blancos, genes de la familia de factores de transcripción MYB, serán reprimidos en esas condiciones. Sin

embargo, al revisar la familia miR159, se observa que existen otras secuencias que difieren en solo una base, que presentan mayor abundancia, tienen como blanco a los mismos genes que miR159a,b, y además muestran un perfil de expresión opuesto (Fig. 24). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se asume que el perfil de expresión de miR159 es de represión.

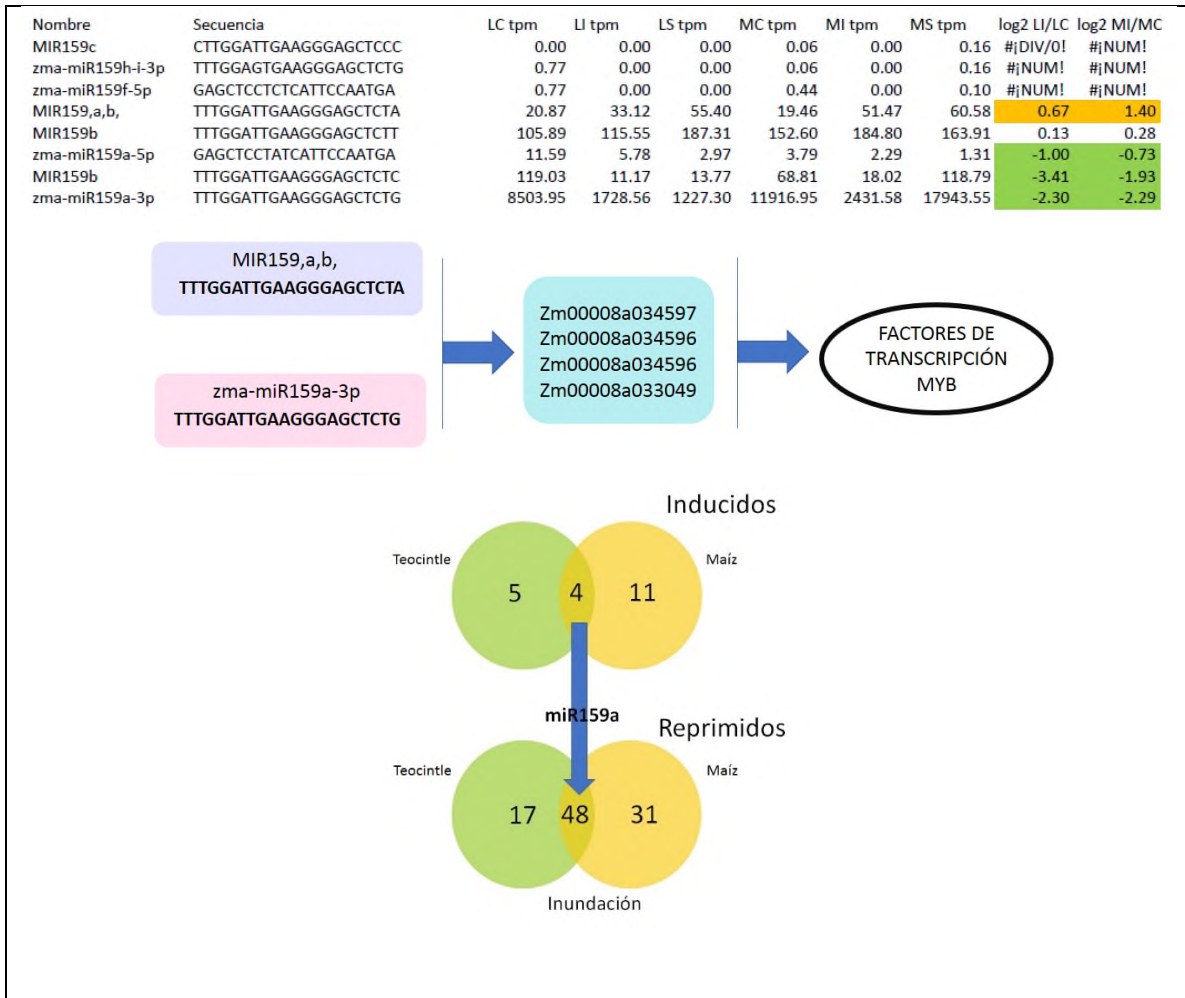


Figura 24. Análisis de expresión de secuencias de la familia miR159 y sus genes blanco.

Tal como se realizó con miR159, el resto de los microRNAs se analizaron con respecto a sus secuencias relacionadas, para concluir con la identificación de miRNAs relevantes en la respuesta a la inundación y la sequía.

6.5.2 Expresión diferencial de miRNAs en respuesta a la inundación

Inicialmente se detectaron 20 miRNAs inducidos por inundación en teocintle y maíz (Fig. 23). De éstos, varios resultaron con un número muy bajo de TPM, o existían otros miembros de su misma familia con un número considerablemente mayor de secuencias y/o con un patrón de expresión distinto, como el caso de miR159a,b, por lo que el número de secuencias inducidas por inundación se redujo.

MiR319, que originalmente se ubicó como uno de los cinco miRNAs inducidos por inundación en teocintle (Fig. 23), mostró consistencia en su patrón de expresión. MiR319 está representado en las bibliotecas por la expresión de dos secuencias: zma-miR319a-d-3p y Mir319b (Anexo 1). MiR319 se acumula alrededor de 10 veces más fuerte en teocintle que en maíz en condiciones control. Cuando se encuentra en condiciones de inundación, en teocintle aumenta cinco veces el nivel que tenía bajo condiciones control, mientras que en maíz tiende a reprimirse.

Debido a que posee un perfil de expresión interesante en inundación en teocintle, y teniendo en cuenta que teocintle mostró mayor capacidad para tolerar la inundación que maíz, miR319 es un miRNA que puede seguirse estudiando para dilucidar su papel en la red compleja de eventos que conducen a la tolerancia al estrés.

En lo que se refiere a miRNAs reprimidos por la inundación, inicialmente se identificaron 96 secuencias entre maíz y teocintle. Los miRNAs más relevantes (por número de secuencias y representación en el contexto de la familia de miRNAs), fueron zma-miR159a,b, zma-miR528a,b-5p, zma-miR398a,b-3p, zma-miR167e-j-5p, zma-miR408a,b, zma-miR166b-i-3p, todos reprimidos en ambas especies, y MIR397a,b, reprimido en teocintle.

La represión de los miRNAs mencionados implica que sus genes blanco se expresan en las condiciones de estrés, y por lo tanto se espera que codifiquen proteínas relevantes en la respuesta. Las implicaciones funcionales que estos miRNAs y sus blancos pueden tener en la respuesta se discuten más adelante.

6.5.3 Expresión diferencial de microRNAs en respuesta a la sequía

El análisis de las bibliotecas de sequía arrojó 31 secuencias inducidas por el estrés en maíz y teocintle. Sin embargo, la gran mayoría presentaba bajo número de secuencias o había representación abundante de secuencias pertenecientes a una misma familia con genes blanco idénticos, y/o los miembros mayoritarios de la familia mostraban un perfil de expresión opuesto, por lo que se consideró únicamente la que presentó la mayor abundancia.

Con respecto a la inducción, miR159 fue el único miRNA que mostró un perfil de expresión consistente en maíz. MiR159 estuvo representado por ocho secuencias (filas 14-21, Anexo 1), de las cuales zma-miR159a-3p y miR159b presentaron los niveles de abundancia más elevados. Sus secuencias difieren únicamente en la última base y comparten genes blanco (Fig. 24). La inducción de miR159 en respuesta a sequía solo ocurre en maíz, mientras que en teocintle se observó represión para ambas secuencias.

En cuanto a los miRNAs que se reprimen durante la sequía, el análisis arrojó un mayor número de secuencias. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente señaladas para seleccionar miRNAs relevantes, se identificaron secuencias que representan la tendencia global hacia la represión por sequía, de siete familias de miRNAs: miR396, miR408, miR528, miR156, miR167, miR166 y miR398. Los cinco primeros miRNAs se reprimieron en maíz y en teocintle, mientras que miR166 y miR398 únicamente se reprimieron en teocintle (Anexo 1).

6.5.4 Integración funcional de miRNAs en la respuesta al estrés

Tal como se observó en el análisis global de miRNAs, tanto para la inundación como para la sequía, la tendencia mayoritaria fue hacia la represión. Con respecto a la inducción, el análisis detallado de miRNAs por familias reveló la expresión diferencial de dos miRNAs. Por una parte, miR319, que se indujo en teocintle en respuesta a la inundación. MiR319 tiene como blanco a genes de la familia de Zm00008a026802, que codifican factores de transcripción TCP (TCP family transcription factors), los cuales son exclusivos de plantas y poseen el dominio TCP, que corresponde a una estructura básica hélice-loop-hélice (bHLH) característica de proteínas de unión a DNA (González-Grandío y Cubas, 2016). L

Los TCP controlan el desarrollo y morfogénesis de órganos florales y hojas en *Arabidopsis* (Nag *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2017). El hecho de que miR319 se induzca por el estrés implicaría la represión de sus genes blanco, y con esto se realizarían ajustes en el desarrollo de la planta, quizás dirigiendo hacia la supresión del desarrollo en respuesta al estrés. En un estudio previo, mediante el uso de microarreglos se encontró a miR319a,b inducido por inundación en raíces de maíz (Zhang *et al.*, 2008), sin embargo, en ese momento no se profundizó en su caracterización funcional. Posteriormente se observó que la expresión de miR319 afecta el desarrollo de las plantas y aumenta la tolerancia a sequía y salinidad (Zhou *et al.*, 2013)

Por su parte, los microRNAs reprimidos por sequía controlan genes blanco que participan en la regulación del desarrollo en la respuesta al estrés, como factores MYB, HD-ZIPIII y ARF (miR159, miR166 y miR167, respectivamente). Adicionalmente, miRNAs como miR528, miR398 y miR408, liberan de su represión postranscripcional a genes que participan directamente en la respuesta antioxidante consecuencia del estrés, y que codifican superóxido dismutasas,

peroxidasa, cupredoxina y plantacianina (Sunkar *et al.*, 2006; Balyan *et al.*, 2017; Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015).

En teocintle, se reprime además miR397, el cual controla a la lacasa (LAC). Las lacasas son enzimas implicadas en la síntesis de lignina (Lu *et al.*, 2013). Es probable que este proceso en teocintle logre regular el reajuste de la arquitectura celular y el desarrollo en respuesta al estrés.

En cuanto al estrés por sequía, se reveló que MiR159 se expresa positivamente en maíz, pero se reprime en teocintle. MiR159 tiene como blancos a factores MYB, los cuales se inducen en respuesta a ácido abscísico, también conocida como la hormona del estrés (Roy *et al.*, 2010). En maíz, la acumulación de miR159 daría por resultado la represión de MYBs y con esto la represión de otros genes río abajo que requieren MYBs para ser expresados. Esto desacoplaría la respuesta dependiente de ácido abscísico.

Dado que los MYB son factores de transcripción, tienen por función desencadenar cascadas de respuesta al estrés mediante la inducción de los genes que regulan a nivel transcripcional. Por esto, se esperaría que miR159 fuera reprimido y así, los distintos miembros de la familia liberarían de su control postranscripcional a los factores MYB para potenciar la respuesta al estrés, mediada por ácido abscísico. Esto no ocurre en maíz, pero si en teocintle, donde el miR159 se reprime, al contrario de maíz.

Otros miRNAs reprimidos en sequía participan en las mismas categorías funcionales que para el caso de la represión en sequía. La regulación del desarrollo queda cubierta por miR396, miR156, y miR167, los cuales controlan factores reguladores del crecimiento (GRF) (Debernardi *et al.*, 2012), HD-ZIPII (Zhong y Ye, 2007) y factores de respuesta a auxinas (ARF) (Liu *et al.*, 2008). La respuesta antioxidante está representada por miR408, miR528, cuyos genes blanco codifican plantacianina, lacasa, redoxina de cobre, superóxido dismutasa.

Por otra parte, miR166 y miR398 se expresaron diferencialmente solo en teocintle, no así en maíz, por lo tanto son miRNAs interesantes para su caracterización en las condiciones analizadas en este trabajo.

En la Fig. 25 se muestra un modelo que integra a los miRNAs identificados en este trabajo y los procesos biológicos asociados en la respuesta al estrés. En el diagrama se hace evidente que muchos de los miRNAs que se reprimen en uno de los tipos de estrés, también se reprimen en el otro. Específicamente, todos los miRNAs que se reprimen por inundación, se reprimen también por sequía. Esta represión en respuesta al estrés elevaría los niveles de expresión de sus genes blanco. Si las plantas pasan por un estrés por inundación, es probable que la expresión elevada de sus genes blanco perdure por algún tiempo, y así, al pasar por un estrés secundario de sequía, dicha expresión previa les proporcione a las plantas ventajas para tolerar de mejor forma el estrés.

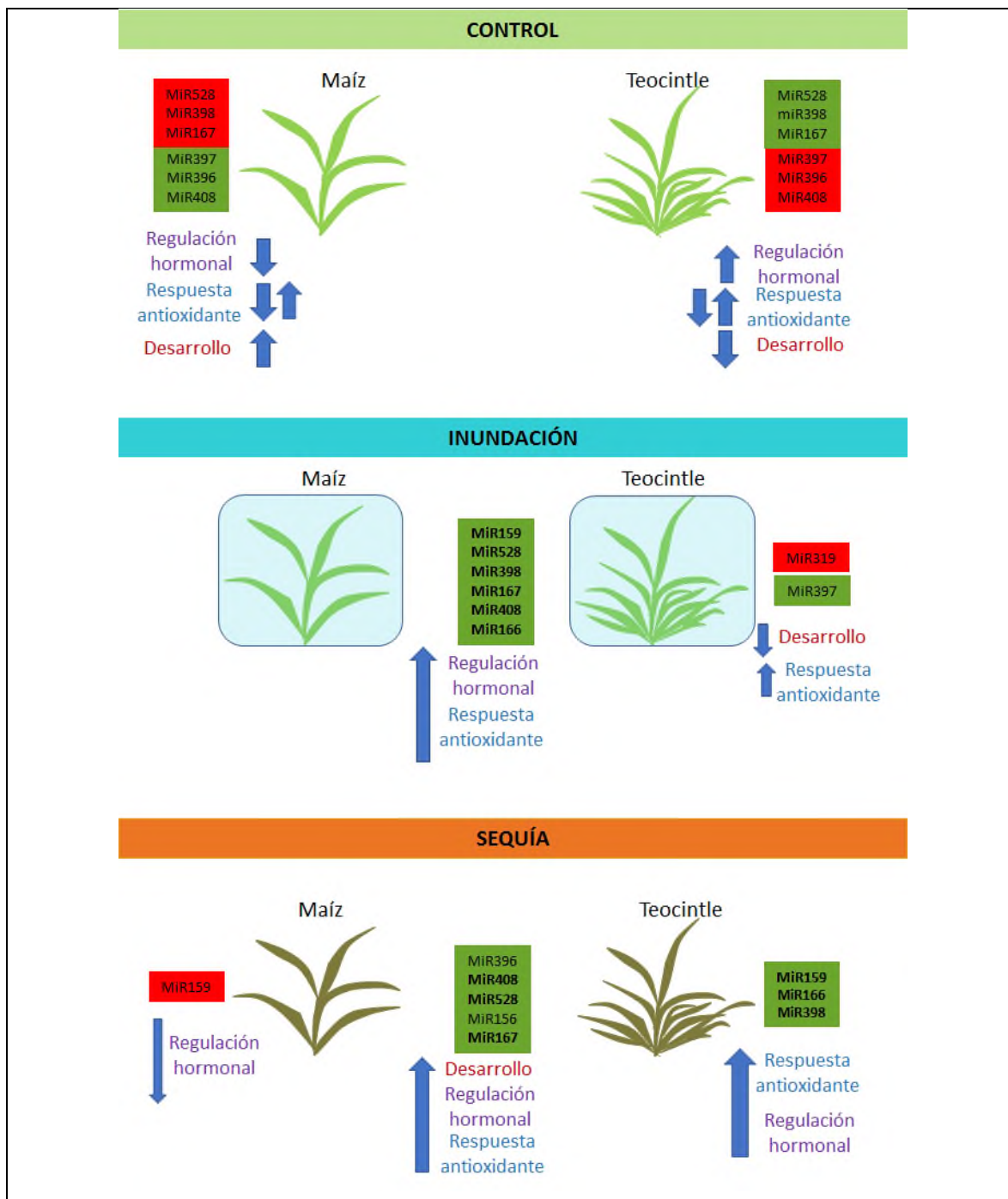


Figura 25. Modelo integrador de los miRNAs identificados y los procesos biológicos que se asocian a sus genes blanco. En recuadros verdes se muestran los miRNAs reprimidos. En rojo, los miRNAs inducidos. Al centro de maíz y teocintle se muestran los miRNAs con perfil de expresión igual en ambas especies. A los lados de maíz y teocintle se muestran los miRNAs con un perfil de expresión diferencial específico en la planta señalada.

7. Conclusiones

-El maíz y el teocintle tienen tolerancia similar a la sequía. En las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, no fue posible observar señales de tolerancia que permitieran diferenciar las capacidades de maíz y de teocintle en ese aspecto.

-Teocintle es más tolerante a la inundación que maíz. Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, el teocintle fue capaz de sobrevivir a un periodo más largo de tiempo bajo sumersión que maíz.

-La tolerancia a la sequía, medida como supervivencia, se incrementó cuando estuvo antecedida por un evento de inundación. El orden contrario, en cambio, no implicó tolerancia superior a la sequía en maíz. Por lo tanto, la hipótesis 1 se acepta parcialmente.

-Las plantas de maíz y de teocintle expuestas a estrés hídrico expresaron de forma diferencial un conjunto de miRNAs que tienden principalmente a la represión para liberar del control a sus genes blanco. Estos genes participan en la protección del estrés oxidativo, en el desarrollo, y las respuestas hormonales relacionadas a los procesos de desarrollo y de respuesta al estrés abiótico.

-Existe un entrecruzamiento en la respuesta a sequía y la respuesta a inundación. A pesar de ser dos tipos opuestos de estrés, la sequía y la inundación indujeron y reprimieron a un grupo común de miRNAs, por lo que se acepta la hipótesis 2.

8. Perspectivas

-Evaluar la tolerancia a eventos secuenciales de inundación-sequía y sequía-inundación en otras plantas para investigar si la tolerancia aumentada es exclusiva de maíz, o de monocotiledóneas, o si es un fenómeno conservado en todo el reino vegetal.

-Evaluar la tolerancia a eventos secuenciales de inundación-sequía y sequía-inundación en ecotipos que naturalmente contrastan en tolerancia, para observar si se puede mejorar la capacidad para sobrevivir a eventos de estrés en estas plantas por la exposición previa a algún tipo de estrés.

-Analizar de forma individual y detallada la expresión de miRNAs y genes blanco de interés que fueron identificados en este trabajo, y que se expresan similarmente en sequía y en inundación, para confirmar si puede atribuirse a su expresión los efectos positivos del estrés secuencial.

-Diseñar y aplicar estrategias de edición genética de los miRNAs identificados en este trabajo para mejorar la tolerancia simultánea a sequía e inundación en maíz.

9. Referencias

Abiko T, Kotula L, Shiono K, Malik AI, Colmer TD, Nakazono M (2012) Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays ssp. mays*). *Plant Cell and Environment* 35:1618-1630.

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.

Ahuja I, De Vos RC, Bones AM, Hall RD (2010) Plant molecular stress responses face climate change. *Trends Plant Sci.* 15, 664–674.

Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol Plants* 19:307-321.

Balyan S, Kumar M, Mutum RD, Raghuvanshi U, Agarwall P, Mathur S, Raghuvanshi S (2017) Identification of miRNA-mediated drought responsive multi-tiered regulatory network in drought tolerant rice, Nagina 22. *Scientific Reports* 7:15446.

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.

Barrs C, Weatheley PE (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15:413–428.

Bedoya CA, Chávez-Tovar VH (2010) Teocintle: El ancestro del maíz. *Revista Claridades Agropecuarias* 201: 32-42.

Campbell MT, Proctor CA, Dou Y, Schmitz AJ, Phansak P, Kruger GR, Zhang C, Walia H (2015) Genetic and molecular characterization of submergence response identifies Subtol6 as a major submergence tolerance locus in maize. *PLoS ONE* 10:3, e0120385.

CNN México (2012) <http://expansion.mx/nacional/2012/02/09/la-sequia-en-mexico-causa-perdidas-millonarias-en-el-campo-mexicano>

Chen J, Xu W, Velten J, Xin Z, Stout J (2012) Characterization of maize inbred lines for drought and heat tolerance. *Journal of soil and water conservation* 67:354-364.

Debernardi JM, Rodriguez RE, Mecchia MA, Palatnik JF (2012) Functional Specialization of the Plant miR396 Regulatory Network through Distinct MicroRNA–Target Interactions. *PLOS Genetics* 8:e1002419.

Du H, Wu N, Cui F, You L, Li X, Xiong L (2014) A homolog of ETHYLENE OVERPRODUCER, OsETOL1, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice. *The Plant Journal* 78:834-849.

El siglo de Durango (2014) <http://www.elsiglodedurango.com.mx/noticia/522095.mexico-solo-produce-58-de-alimentos-que-consume.html>

FAO (2012) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma 2002.

Flores-Herrerías A (2016) Análisis de expresión de microRNAs en *Brachypodium distachyon* bajo estrés hídrico mediante tres estrategias de PCR cuantitativa. Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan.

Fukao T, Xiong (2013) Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex? *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:196-204.

Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2011) The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *Plant Cell*, 23:412-427.

García JF, Fuentes MO (1999) Análisis de las sequías en México, Cuaderno de Investigación No. 46. Centro Nacional de Prevención de Desastres, México.

González-Grandío E, Cubas P (2016) TCP Transcription factors: Evolution, structure and biochemical Function. En: *Plant transcription factors*. Academic Press. Ed: Daniel H. González. New York.

Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026–1030.

INEGI (2011) El sector alimentario en México <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/primarias/agri/default.aspx?tema=E>.

INEGI (2012). Instituto Nacional de Estadística y Geografía <http://www.inegi.org.mx/>

Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta* 229:1009-1014.

Jeong DH, Green P (2013) The role of rice microRNAs in abiotic stress responses. *J. Plant Biol.* 56:187-197.

Jisha V, Dampanaboina L, Vadassery J, Mithofer A, Kappara S, Ramanan R (2015) Overexpression of an AP2/ERF type transcription factor OsEREBP1 confers biotic and abiotic stress tolerance in rice. *PLoS ONE* 10, e0127831.

Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M (2017) Roles of miR319 and TCP transcription factors in leaf development. *Plant Physiology*, 175:874-885.

Kumar R (2014) Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Appl. Biochem. Biotechnol* 174:93-115.

Landeros-Sánchez C, Palacios-Vélez E, Hernández Pérez JM (2014) El agua y la agricultura en México. En *Revista AZ. No. 82. Agua. Cultura y cuidado*. Ed. Educación y Cultura en México.

Lasbury M (2013) Corn color concepts. Blog: As many exceptions as rules. <http://biologicaexceptions.blogspot.mx/2013/11/corn-color-concepts.html>

Li JS, Fu FL, An M, Zhou SF, She YH, Li WC (2013) Differential expression of microRNAs in response to drought stress in maize. *Journal of Integrative Agriculture* 12: 1414-1422.

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.

Lu S, Lib Q, Weid H, Change MJ, Tunlaya-Anukitb S, Kimf H, Liub J, Songa J, Sung YH, Yuana L, Yehe TF, Peszlenh I, Ralph J, Sederoffb RR, Chiang VL (2013) Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *PNAS* 110:10848-10853.

Ma C, Burd S, Lers A (2015) miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 84:169-187.

Mano Y, Omori F (2013) Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segments from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays subsp. mays*). *Annals of Botany* 112:1125-1139.

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ, Buckler E, Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6080–6084.

Nag A, King S, Jack T (2009) MiR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *PNAS* 106: 22534-22539.

NOAA (2015). Servicio Climatológico Nacional. <http://www.srh.noaa.gov/mrx/hydro/flooddef.php>.

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duang H, Chou YT, Lai EC (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:354-363.

Ortíz-Yescas A (2016) 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 de Maestría. Universidad del Papaloapan.

Palacios-Vélez E (2011) Uso del agua en el sector agrícola y problemas relativos. <http://www3.diputados.gob.mx/camara/content/download/249987/730422/file/1dr%20enrique%20palacios%20velez.pdf>.

Poggio L, Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo CA (1998) Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, *Poaceae*). *Ann Bot.* 82:107–115.

Pulido-Barajas JF (2017) Identificación de microRNAs integradores de la respuesta a estrés por sequía e inundación en maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) y teocintle (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.

Qin J, Ma X, Tang Z, Meng Y (2015) Construction of regulatory networks mediated by small RNAs responsive to abiotic stress in rice (*Oryza sativa*). *Comput. Biol. Chem.* 27:69-80.

Qiu F, Zheng Y, Zhang Z, Xu S (2007) Mapping of QTL associated with waterlogging tolerance during the seedling stage in maize. *Ann. Bot.* 99:1067-1081.

Rahman RBANM, Zhang J (2017) Flood and drought tolerance in rice: opposite but may coexist. *Food and energy security* 5:76-88.

Rivera-Contreras IK, Zamora-Hernández T, Huerta-Heredia AA, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM (2016). Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Scientific Reports* 6:27686.

Rodríguez AA, Maiale SJ, Menendez AB, Ruiz OA (2009) Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *Journal of Experimental Botany* 60:4249-4262.

Ross-Ibarra J, Tenaillon MI, Gaut BS (2009) Historical divergence and gene flow in the genus *Zea*. *Genetics* 181:1399–1413.

Roy S (2016) Function of MYB domain transcription factors in abiotic stress and epigenetic control of stress response in plant genome. *Plant Signaling and Behavior* 11: 1, e1117723.

SAGARPA (2004) Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>.

SIAP (2012) Índice de maíz. Portal OEIDRUS

SIAP (2013). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentario. <http://www.siap.gob.mx/atlas2013/index.html>

Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006) Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* Is Mediated by Downregulation of miR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance. *Plant Cell* 18:2051-2065.

Tenaillon MI, Hufford MB, Gaut BS, Ross-Ibarra J (2011) Genome size and transposable element content as determined by high-throughput sequencing in maize and *Zea luxurians*. *Genome Biology and Evolution* 3:219-229.

Wang YG, An M, Zhou SF, She YH, Li WC, Fu FL (2014) Expression profile of maize microRNAs corresponding to their target genes under drought stress. *Biochem Genet* 52:474-493.

Xie Z, Qi X (2008) Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* 1779: 720–724.

Yu F, Han X, Geng C, Zhao Y, Zhang Z, Qiu F (2015) Comparative proteomic analysis revealing the complex network associated with waterlogging stress in maize (*Zea mays* L.) seedling root cells. *Proteomics* 15: 135-147.

Zhang Z, Wei L, Zou X, Tao Y, Liu Z, Zheng Y (2008) Submergence-responsive microRNAs are potentially involved in the regulation of morphological and metabolic adaptations in maize root cells. *Annals of Botany* 102: 509–519.

Zheng J, Fu J, Gou M, Juai J, Liu Y, Jian M, Huang Q, Guo X, Dong Z, Wang H, Wang Q (2010) Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant. Mol. Biol.* 72: 407-421.

Zhong R, Ye ZH (2007) Regulation of HD-ZIP III genes by microRNA 165. *Plant Signaling and Behavior*. 2:351-353.

Zhou M, Luo H (2013) MicroRNA-mediated gene regulation: potential applications for plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 38: 59-75.

10. Anexo

Expresión diferencial de miRNAs en teocintle y maíz.

LC: Teocintle, Control

LI: Teocintle, Inundación

LS: Teocintle, Sequía

MC: Maíz, Control

MI: Maíz, Inundación

MS: Maíz, Sequía

Nombre	Secuencia	LC tpm	LI tpm	LS tpm	MC tpm	MI tpm	MS tpm	Log LC/MC	Log MC/LC	log2 LI/LC	log2 LS/LC	log2 MI/MC	log2 MS/MC
1 >zma-miR156a-3p MIMAT00	GCTCACTTCTCTCTGTGTCAGT	27.05	5.01	2.03	0.56	0.00	0.00	5.60	-5.60	-2.43	-3.73	#iNUM!	#iNUM!
2 >zma-miR156a-i,l-5p MIMAT00	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	85.02	44.68	51.01	103.37	23.29	42.43	-0.28	0.28	-0.93	-0.74	-2.15	-1.28
3 >zma-miR156b-3p MIMAT00	GCTCACCTCTATCTGTGTCAGT	0.00	0.00	0.00	13.92	7.14	13.28	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-0.96	-0.07
4 >zma-miR156d-g-3p MIMAT00	GCTCACTTCTCTTTCTGTGTCAGC	79.61	19.64	27.70	66.38	5.15	8.45	0.26	-0.26	-2.02	-1.52	-3.69	-2.97
5 >zma-miR156e-3p MIMAT00	GCTCACTGCTCTCTGTGCATC	55.65	1.93	3.44	10.01	1.18	2.56	2.48	-2.48	-4.85	-4.01	-3.08	-1.97
6 >zma-miR156i-3p MIMAT00	GCTCACTGCTCTATCTGTGCATC	2.32	0.77	2.97	0.31	0.08	0.00	2.90	-2.90	-1.59	0.36	-2.02	#iNUM!
7 >zma-miR156k-3p MIMAT00	GCTCGCTTCTCTTTCTGTGTCAGC	23.19	1.93	1.10	9.32	1.45	2.27	1.31	-1.31	-3.59	-4.40	-2.68	-2.04
8 >zma-miR156k-5p MIMAT00	TGACAGAAGAGAGCGAGCAC	20.10	7.32	10.01	22.13	3.32	4.10	-0.14	0.14	-1.46	-1.00	-2.74	-2.43
9 >zma-miR156l-3p MIMAT00	GCTCACTGCTCTATCTGTCCACC	12.37	3.08	7.20	3.48	0.04	0.29	1.83	-1.83	-2.00	-0.78	-6.51	-3.60
10 MIR156	CTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	0.77	1.93	0.31	0.87	0.08	0.42	-0.17	0.17	1.32	-1.30	-3.51	-1.06
11 MIR156b	TGACAGAAGAGAGTGAGCATA	0.00	0.00	0.00	0.06	0.11	0.16	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0.88	1.36
12 MIR156k,n,o	TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC	34.78	12.71	14.24	43.57	9.89	19.65	-0.33	0.33	-1.45	-1.29	-2.14	-1.15
13 MIR156q,s	TGACAGAAGAGAGTGAGCACT	6.18	2.31	2.03	3.98	0.88	1.34	0.64	-0.64	-1.42	-1.60	-2.18	-1.57
14 >zma-miR159a,b,f,j,k-3p MIMAT00	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTG	8503.95	1728.56	1227.30	11916.95	2431.58	17943.55	-0.49	0.49	-2.30	-2.79	-2.29	0.59
15 >zma-miR159a-5p MIMAT00	GAGCTCCTATCATTCCAATGA	11.59	5.78	2.97	3.79	2.29	1.31	1.61	-1.61	-1.00	-1.96	-0.73	-1.53
16 >zma-miR159f-5p MIMAT00	GAGCTCCTCATTCCAATGA	0.77	0.00	0.00	0.44	0.00	0.10	0.83	-0.83	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	-2.18
17 >zma-miR159h-i-3p MIMAT00	TTTGGAGTGAAGGGAGCTCTG	0.77	0.00	0.00	0.06	0.00	0.16	3.64	-3.64	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	1.36
18 MIR159a,b	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	20.87	33.12	55.40	19.46	51.47	60.58	0.10	-0.10	0.67	1.41	1.40	1.64
19 MIR159b	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTC	119.03	11.17	13.77	68.81	18.02	118.79	0.79	-0.79	-3.41	-3.11	-1.93	0.79
20 MIR159b	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTT	105.89	115.55	187.31	152.60	184.80	163.91	-0.53	0.53	0.13	0.82	0.28	0.10
21 MIR159c	CTTGGATTGAAGGGAGCTCCC	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.16	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	1.36
22 >zma-miR160e,g MIMAT00	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	3.86	0.77	0.16	2.05	0.80	2.88	0.91	-0.91	-2.33	-4.63	-1.36	0.49
23 MIR160e	GCGTGCAGGTTGCCAAGCATG	6.96	0.00	0.00	6.59	0.31	0.06	0.08	-0.08	#iNUM!	#iNUM!	-4.43	-6.69
24 >zma-miR162-3p MIMAT00	TCGATAAACTCTGCATCCA	3.09	0.00	0.00	2.49	1.03	0.96	0.31	-0.31	#iNUM!	#iNUM!	-1.27	-1.37
25 MIR162a,b	TCGATAAACTCTGCATCCAG	2.32	0.00	1.25	2.30	0.92	0.80	0.01	-0.01	#iNUM!	-0.89	-1.33	-1.52
26 >zma-miR164a-d,g-5p MIMAT00	TGGAGAAGCAGGGCAGCTGCA	10.82	4.24	0.31	8.08	4.35	4.03	0.42	-0.42	-1.35	-5.11	-0.89	-1.00
27 MIR165a,b	TCGGACCAGGCTTCATCCCCC	6.18	0.39	0.16	3.54	0.76	2.82	0.80	-0.80	-4.00	-5.30	-2.21	-0.33
28 >zma-miR166 b, d,e-5p MIMAT00	GGAATGTTGTCTGGTTCAAGG	16.23	9.63	13.46	52.83	3.47	7.97	-1.70	1.70	-0.75	-0.27	-3.93	-2.73
29 >zma-miR166a-3p MIMAT00	TCGGACCAGGCTTCATCCCCC	675.56	171.01	66.82	217.62	114.70	307.88	1.63	-1.63	-1.98	-3.34	-0.92	0.50
30 >zma-miR166a-5p MIMAT00	GGAATGTTGTCTGGCTCGGGG	7.73	5.78	9.70	81.12	25.39	49.15	-3.39	3.39	-0.42	0.33	-1.68	-0.72
31 >zma-miR166b-i-3p MIMAT00	TCGGACCAGGCTTCATCCCC	687.92	175.24	69.48	251.18	158.26	367.85	1.45	-1.45	-1.97	-3.31	-0.67	0.55
32 >zma-miR166c-5p, e MIMAT00	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG	27.05	23.88	54.46	117.67	88.16	87.68	-2.12	2.12	-0.18	1.01	-0.42	-0.42
33 >zma-miR166g-5p MIMAT00	GGAATGTTGTCTGGTTGGAGA	0.77	0.77	0.94	11.31	1.76	5.44	-3.87	3.87	0.00	0.28	-2.69	-1.06
34 >zma-miR166h-5p MIMAT00	GGAATGACGTCGGTCCGAAC	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	#iNUM!
35 >zma-miR166i-5p MIMAT00	GGAATGTCGTCTGGCGGAGGA	0.00	0.00	0.00	0.75	0.04	0.06	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-4.29	-3.54
36 >zma-miR166j,k,n-3p MIMAT00	TCGGACCAGGCTTCAATCCCT	167.73	18.49	14.08	10.26	4.89	8.74	4.03	-4.03	-3.18	-3.57	-1.07	-0.23
37 >zma-miR166j-5p MIMAT00	GGTTTGTCTGGTTCAAGG	4.64	0.39	1.25	22.81	2.02	1.25	-2.30	2.30	-3.59	-1.89	-3.49	-4.19
38 >zma-miR166k-5p MIMAT00	GGATTGTTGTCTGGCTCGGGG	1.55	0.39	1.10	3.79	0.99	2.75	-1.29	1.29	-2.00	-0.50	-1.93	-0.46
39 >zma-miR166l,m-3p MIMAT00	TCGGACCAGGCTTCATCCCT	40.97	2.70	2.97	12.06	4.89	9.25	1.76	-1.76	-3.93	-3.78	-1.30	-0.38
40 >zma-miR166m-5p MIMAT00	GGAATGTTGGCTGGCTCGAGG	1.55	1.16	2.35	45.38	10.73	13.38	-4.88	4.88	-0.42	0.60	-2.08	-1.76
41 >zma-miR166n-5p MIMAT00	GGATTGTTGTCTGGCTCGGTG	0.77	0.00	0.00	4.79	0.19	0.51	-2.63	2.63	#iNUM!	#iNUM!	-4.65	-3.22
42 MIR166b	TCTCGACCAGGCTTCATTC	5.41	1.16	2.03	37.67	46.89	63.84	-2.80	2.80	-2.23	-1.41	0.32	0.76
43 MIR166m,d	TCGGACCAGGCTTCATCCCT	12.37	3.85	2.50	33.57	43.18	59.65	-1.44	1.44	-1.68	-2.30	0.36	0.83

44	MIR166q,f,j,c	TCGGACCAGGCTTCATTCCTT	0.77	0.00	0.47	3.29	2.18	2.43	-2.09	2.09	#iNUM!	-0.72	-0.60	-0.44
45	>zma-miR167a-d-5p MIMAT0	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA	27.05	11.94	5.48	9.51	3.67	4.64	1.51	-1.51	-1.18	-2.30	-1.38	-1.04
46	>zma-miR167b-3p MIMAT0	GATCATGCTGTGACAGTTTCACT	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	#iNUM!
47	>zma-miR167c-3p MIMAT0	GATCATGCTGTGGCAGCTCACT	1.55	0.00	0.00	0.12	0.00	0.06	3.64	-3.64	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	-0.96
48	>zma-miR167d-3p MIMAT0	GGTCATGCTGCTGCAGCTCACT	0.00	0.00	0.00	0.99	0.23	0.16	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-2.12	-2.64
49	>zma-miR167e-3p MIMAT0	GATCATGCTGTGACAGTTTCATC	0.77	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	2.64	-2.64	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!
50	>zma-miR167e-j-5p MIMAT0	TGAAGCTGCCAGCATGATCTG	1116.13	296.95	96.71	2271.26	269.83	394.60	-1.02	1.02	-1.91	-3.53	-3.07	-2.53
51	>zma-miR167g-3p MIMAT0	GGTCATGCTGTAGTTTCATC	37.10	17.72	12.52	3.17	2.02	0.67	3.55	-3.55	-1.07	-1.57	-0.65	-2.24
52	>zma-miR167h,i-3p MIMAT0	GATCATGTTGCAGCTTCAC	3.09	3.47	2.97	13.18	2.06	3.01	-2.09	2.09	0.16	-0.06	-2.68	-2.13
53	>zma-miR167j-3p MIMAT0	GATCATGTGGCAGTTTCATT	0.77	0.00	0.00	1.24	0.42	0.70	-0.69	0.69	#iNUM!	#iNUM!	-1.57	-0.82
54	MIR167,c,d	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGG	21.64	7.70	2.35	90.25	9.74	8.29	-2.06	2.06	-1.49	-3.20	-3.21	-3.44
55	MIR167c,d,f,e	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGA	1046.57	268.45	88.41	2166.46	251.73	367.91	-1.05	1.05	-1.96	-3.57	-3.11	-2.56
56	MIR167e,i	AGATCATGTTGCAGCTTCACT	3.09	2.70	2.97	13.12	2.06	2.98	-2.08	2.08	-0.20	-0.06	-2.67	-2.14
57	MIR167f	TGAAGCTGCCAGCATGATCTGC	42.51	18.87	3.91	7.65	5.38	16.74	2.48	-2.48	-1.17	-3.44	-0.51	1.13
58	MIR167h,i,j	TGAAGCTGCCAGCATGATCTTA	0.00	0.00	0.00	0.12	0.46	0.80	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	1.88	2.69
59	>zma-miR168a,b-5p MIMAT0	TCGCTTGGTGAGATCGGGAC	800.77	255.36	140.21	446.98	491.66	432.20	0.84	-0.84	-1.65	-2.51	0.14	-0.05
60	>zma-miR168a-3p MIMAT0	CCCGCCTTGACCAAGTGAA	8.50	3.85	1.10	3.05	2.71	6.11	1.48	-1.48	-1.14	-2.96	-0.17	1.00
61	>zma-miR168b-3p MIMAT0	CCCGCCTTGACCAAGTGAA	4.64	1.54	1.56	7.40	4.01	4.99	-0.67	0.67	-1.59	-1.57	-0.88	-0.57
62	MIR168	TCGCTTGGTGAGATCGGGAA	3.09	0.77	1.41	0.12	5.57	4.67	4.64	-4.64	-2.00	-1.13	5.49	5.23
63	MIR168	GATCCCGCTTGACCAAGTGAAT	3.09	0.00	0.78	2.36	2.56	4.48	0.39	-0.39	#iNUM!	-1.98	0.12	0.92
64	>zma-miR169a-5p MIMAT0	CAGCCAAGGATGACTTGCCGA	3.86	3.08	0.63	1.37	0.15	0.67	1.50	-1.50	-0.33	-2.63	-3.16	-1.02
65	>zma-miR169c,r-5p MIMAT0	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	83.48	25.03	12.68	8.33	0.84	3.36	3.33	-3.33	-1.74	-2.72	-3.31	-1.31
66	>zma-miR169i-k-3p MIMAT0	GGCAGTCTCCTTGCTAG	0.00	0.00	0.00	0.56	1.41	0.10	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	1.34	-2.54
67	>zma-miR169l-k-5p MIMAT0	TAGCCAAGGATGACTTGCCCTG	0.00	0.00	0.00	0.31	0.15	0.06	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-1.02	-2.28
68	>zma-miR169l-5p MIMAT0	TAGCCAGGATGATTGCCTG	0.77	0.00	0.00	0.06	0.08	0.03	3.64	-3.64	#iNUM!	#iNUM!	0.30	-0.96
69	>zma-miR169m-3p MIMAT0	GGCATCCATTCTGGCTAAG	0.00	0.00	0.00	0.12	0.04	0.03	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-1.70	-1.96
70	>zma-miR171b-3p MIMAT0	TTGAGCCGTGCCAATAC	1.55	0.77	0.31	0.06	0.04	0.00	4.64	-4.64	-1.00	-2.30	-0.70	#iNUM!
71	>zma-miR171b-5p MIMAT0	GATATTGGCGGTTCAATC	0.00	0.00	0.00	0.31	0.38	0.32	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0.30	0.04
72	>zma-miR171c-5p MIMAT0	TATTGGTGCGGTTCAATCAGA	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	#iNUM!
73	>zma-miR171d,e,j,i-3p MIMAT0	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	1.55	1.93	0.16	0.50	0.04	0.06	1.64	-1.64	0.32	-3.30	-3.70	-2.96
74	>zma-miR171d,e-5p MIMAT0	TGTTGGCTCGGCTCACTCAGA	3.09	1.16	0.47	1.43	0.42	0.86	1.11	-1.11	-1.42	-2.72	-1.77	-0.73
75	>zma-miR171k,h-5p MIMAT0	TGGTATTGTTCCGGCTCATGT	0.00	0.00	0.00	0.44	0.23	0.22	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-0.93	-0.96
76	MIR171	TTGAGCCCGTCAATATCTCC	58.74	14.64	8.61	1.49	0.73	0.38	5.30	-5.30	-2.00	-2.77	-1.04	-1.96
77	>zma-miR172a-d MIMAT0	AGAATCTTGATGATGCTGCA	1.55	0.00	0.00	0.31	0.04	0.13	2.31	-2.31	#iNUM!	#iNUM!	-3.02	-1.28
78	>zma-miR172c-5p MIMAT0	CAGCACCAACCAAGATTCACA	4.64	1.16	0.16	2.92	0.65	2.14	0.67	-0.67	-2.00	-4.89	-2.17	-0.45
79	>zma-miR319a-d-3p MIMAT0	TTGGACTGAAGGGTGCTCCC	101.26	536.90	10.64	11.81	4.77	15.14	3.10	-3.10	2.41	-3.25	-1.31	0.36
80	MIR319b	TTGGACTGAAGGGTGCTCCCT	94.30	496.46	9.86	11.37	4.43	13.86	3.05	-3.05	2.40	-3.26	-1.36	0.28
81	>zma-miR390a,b-5p MIMAT0	AAGCTCAGGAGGATAGCGCC	10.05	1.16	0.78	6.96	2.06	4.22	0.53	-0.53	-3.12	-3.68	-1.76	-0.72
82	>zma-miR390a-3p MIMAT0	CGTATCTATCCTGAGCTCCA	0.00	0.39	0.00	0.19	0.00	0.00	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	#iNUM!
83	>zma-miR390b-3p MIMAT0	CGTATCTATCCTGAGCTCCA	0.77	0.39	0.00	0.19	0.00	0.00	2.05	-2.05	-1.00	#iNUM!	#iNUM!	#iNUM!
84	MIR390	ACACATGTGGATTGAGATGAATAC	10.05	1.16	0.78	0.06	0.04	0.03	7.34	-7.34	-3.12	-3.68	-0.70	-0.96
85	>zma-miR393a,c-5p MIMAT0	TCCAAAGGGATCGCATTGATCT	4.64	4.62	1.10	0.99	0.38	0.64	2.22	-2.22	0.00	-2.08	-1.38	-0.64
86	>zma-miR393a-3p MIMAT0	ATCAGTGCAATCCCTTGGAAAT	0.77	0.00	0.00	2.55	2.75	2.46	-1.72	1.72	#iNUM!	#iNUM!	0.11	-0.05
87	>zma-miR393b-5p MIMAT0	TCCAAAGGGATCGCATTGATCC	5.41	1.93	0.16	0.19	0.15	0.29	4.86	-4.86	-1.49	-5.11	-0.29	0.63

88	>zma-miR393c-3p MIMAT00	GTCAGTGC AATCCCTTTGGAAT	0.00	0.00	0.00	0.31	0.42	0.19	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	0.43	-0.69
89	MIR393b	TCAGTGC AATCCCTTTGGAAT	10.82	5.39	1.10	4.10	3.36	3.07	1.40	-1.40	-1.00	-3.30	-0.29	-0.42
90	>zma-miR394a,b-5p MIMAT00	TTGGCATTCTGTCACCTCC	2.32	0.00	0.00	0.06	0.11	0.06	5.22	-5.22	#iNUM!	#iNUM!	0.88	0.04
91	>zma-miR394a,b-3p MIMAT00	AGGTGGGCATACTGCCAATG	0.00	0.00	0.00	0.37	0.00	0.03	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	-3.54
92	>zma-miR395b,d-3p MIMAT00	GTGAAGTGT TGGGGGAACTC	2.32	0.00	0.00	0.44	0.34	0.26	2.41	-2.41	#iNUM!	#iNUM!	-0.34	-0.77
93	>zma-miR395c-3p MIMAT00	GTGAAGTGT TGGAGGAACTC	0.00	1.16	0.00	0.06	0.00	0.06	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	0.04
94	>zma-miR395l,m-3p MIMAT00	GTGAAGTGT TGGAGGAACTC	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.06	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	0.04
95	>zma-miR396a,b-3p MIMAT00	GTTC AATAAAGCTGTGGGAAA	6.96	4.62	3.76	3.79	0.57	1.22	0.88	-0.88	-0.59	-0.89	-2.73	-1.64
96	>zma-miR396a,b-5p MIMAT00	TTCCACAGCTTCTTGAAGCTG	2.32	3.47	0.31	1.31	1.11	1.41	0.83	-0.83	0.58	-2.89	-0.24	0.11
97	>zma-miR396e,f-5p,c MIMAT00	TTCCACAGCTTCTTGAAGCTT	36.33	27.35	11.27	9.45	10.58	17.44	1.94	-1.94	-0.41	-1.69	0.16	0.88
98	>zma-miR396f-3p MIMAT00	GGTCAAGAAAGCTGTGGGAAAG	221.06	152.52	305.46	80.99	73.31	41.60	1.45	-1.45	-0.54	0.47	-0.14	-0.96
99	MIR396a	GTTC AATAAAGCTGTGGGAAAG	0.77	1.54	1.56	0.12	6.45	5.15	2.64	-2.64	1.00	1.02	5.70	5.37
100	MIR396a//MIR396d//MIR396e	TCCACAGGCTTCTTGAAGCTG	629.18	729.86	112.20	89.63	35.59	57.31	2.81	-2.81	0.21	-2.49	-1.33	-0.65
101	MIR396e	ATGGTTCAAGAAAGCCCATGGAAA	8.50	1.54	2.03	6.90	4.47	4.35	0.30	-0.30	-2.46	-2.06	-0.63	-0.66
102	MIR396f	TCTCCACAGGCTTCTTGAAGCT	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.06	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iNUM!	-1.54
103	MIR397a,b	ATTGAGTGCAGCGTTGATGAA	695.65	149.44	31.77	23.93	18.71	33.76	4.86	-4.86	-2.22	-4.45	-0.36	0.50
104	>zma-miR397a,b-5p MIMAT00	TCATTGAGCGCAGCGTTGATG	5.41	0.39	0.16	4.72	0.23	0.45	0.20	-0.20	-3.81	-5.11	-4.37	-3.40
105	>zma-miR397b-3p MIMAT00	CCAGCGCTGCACTCAATTACG	2.32	0.00	0.00	0.06	0.04	0.00	5.22	-5.22	#iNUM!	#iNUM!	-0.70	#iNUM!
106	>zma-miR398a,b-3p MIMAT00	TGTGTTCTCAGTGC GCCCCCG	1611.59	119.40	166.03	4624.69	2976.13	3219.39	-1.52	1.52	-3.75	-3.28	-0.64	-0.52
107	>zma-miR398a-5p MIMAT00	GGGGCGAACTGAGAACACATG	122.13	10.01	22.22	18.03	1.64	1.57	2.76	-2.76	-3.61	-2.46	-3.46	-3.52
108	>zma-miR398b-5p MIMAT00	GGGGCGGACTGGGAACACATG	33.24	13.48	25.19	456.12	57.88	230.85	-3.78	3.78	-1.30	-0.40	-2.98	
109	MIR398a	TGTGTTCTCAGTGC GCCCCTG	1.55	3.47	1.10	4.97	9.97	12.19	-1.69	1.69	1.16	-0.50	1.00	1.29
110	>zma-miR399e,i,j-3p MIMAT00	TGCCAAAGGAGAGTTGCCCTG	0.00	0.00	0.00	0.12	0.11	0.10	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-0.12	-0.37
111	>zma-miR399e-5p MIMAT00	GGGCTTCTCTTCTTGGCAGG	0.00	0.00	0.00	0.75	0.19	0.13	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-1.97	-2.54
112	>zma-miR399f-5p MIMAT00	GGGCAACTTCTCTTGGCAGA	0.00	0.00	0.00	1.49	0.15	0.16	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-3.29	-3.22
113	>zma-miR408a,b MIMAT00	CTGCACTGCCTCTCCCTGGC	129.08	11.55	6.42	46.12	11.38	26.94	1.48	-1.48	-3.48	-4.33	-2.02	-0.78
114	>zma-miR408b-5p MIMAT00	CAGGGACGAGGCAGAGCATGG	6.96	1.93	9.55	1190.27	201.45	538.44	-7.42	7.42	-1.85	0.46	-2.56	-1.14
115	MIR408	CAGGGATGAGGCAGAGCATGG	0.77	0.39	0.47	1684.55	502.24	1057.81	-11.09	11.09	-1.00	-0.72	-1.75	-0.67
116	MIR408,b	TGCACTGCCTCTCCCTGGCT	22.42	8.09	16.90	24.80	3.55	6.11	-0.15	0.15	-1.47	-0.41	-2.80	-2.02
117	MIR408d	TGCACTGCCTCTCCCTGGC	163.09	20.03	26.29	61.41	14.97	37.98	1.41	-1.41	-3.03	-2.63	-2.04	-0.69
118	>zma-miR444a,b MIMAT00	TGCAGTTGTTGTCTCAAGCTT	0.00	1.54	0.00	0.19	0.15	0.64	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-0.29	1.78
119	MIR444b,c	TGTTGTCTCAAGCTTGTCTGCC	2.32	0.39	0.16	0.50	0.50	0.80	2.22	-2.22	-2.59	-3.89	0.00	0.69
120	>zma-miR528a,b-5p MIMAT00	TGGAAGGGGCATGCAGAGGAG	2015.84	184.87	275.72	8248.63	3099.91	2462.61	-2.03	2.03	-3.45	-2.87	-1.41	-1.74
121	>zma-miR529-5p MIMAT00	AGAAGAGAGAGAGTACAGCCT	0.77	3.08	0.31	0.06	0.08	0.13	3.64	-3.64	2.00	-1.30	0.30	1.04
122	>zma-miR827-3p MIMAT00	TTAGATGACCATCAGCAAACA	0.77	0.39	0.31	0.81	0.11	0.22	-0.06	0.06	-1.00	-1.30	-2.82	-1.85
123	>zma-miR827-5p MIMAT00	TTTGTGGTGGTCATTAACC	1.55	0.39	0.94	2.24	3.74	1.54	-0.53	0.53	-2.00	-0.72	0.74	-0.54
124	>zma-miR2118b MIMAT00	TTCCCGATGCCTCCCATCCTA	0.00	0.00	0.00	0.19	0.04	0.13	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-2.29	-0.54
125	MIR5054	TCCCCACGGTCGGCGCCA	3.09	0.77	0.16	0.06	0.11	0.10	5.64	-5.64	-2.00	-4.30	0.88	0.63
126	MIR5163a	TTAGGTATTTCAAGTTAGGTG	4.64	3.08	0.63	0.06	0.46	2.08	6.22	-6.22	-0.59	-2.89	2.88	5.06
127	MIR5163b	TAGATATTTCAAGTTGTGGGA	6.18	1.54	0.47	0.06	0.15	0.51	6.64	-6.64	-2.00	-3.72	1.30	3.04
128	MIR6224a,b,c	CTTATATACTAGGACGGAGGG	0.00	0.00	0.00	1.62	0.38	1.70	#iNUM!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	#iDIV/0!	-2.08	0.07
129	MIR6233	TGTTGAGGCTGGAGCAAACCTCGG	0.77	0.77	1.72	0.37	0.61	0.77	1.05	-1.05	0.00	1.16	0.71	1.04
130	MIR7731	AGGTTTGCTCTGGACTTTGGAATC	12.37	2.31	0.31	0.12	0.46	1.73	6.64	-6.64	-2.42	-5.30	1.88	3.80
131	MIR7738	GTGCTTGACAGCAGCTCTGG	2.32	6.16	0.16	0.06	0.19	0.64	5.22	-5.22	1.41	-3.89	1.62	3.36

132 MIR7741	TTTTAATTGTGGAAGCTCTTG	10.82	13.48	0.31	0.25	0.08	1.12	5.44	-5.44	0.32	-5.11	-1.70	2.17
133 MIR9773	TTTGTTTTATGTTATTTTGTGAA	85.80	60.47	7.04	1.37	1.91	5.15	5.97	-5.97	-0.50	-3.61	0.48	1.91