

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Tuxtepec

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)

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

PRESENTA:

Ing. José Francisco Pulido Barajas

Directora de Tesis:

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Co-Director de Tesis:

Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García

Noviembre 2017



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/027
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 21 de Agosto de 2017

C. JOSÉ FRANCISCO PULIDO BARAJAS
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

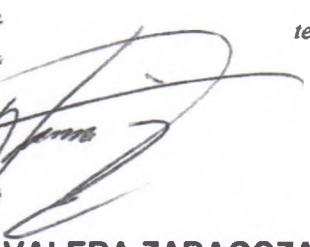
Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	Presidente
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Vocal
Dr. Edgar García López	Cátedra CONACYT-UNPA	Secretario
Dra. Ariana A. Huerta Heredia	Cátedra CONACYT-UNPA	1er Suplente
Dr. Miguel Angel Peña Rico	UNPA	2º Suplente

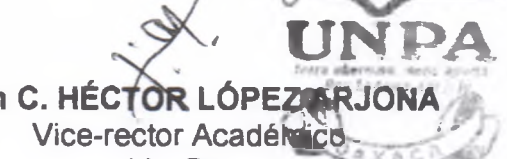
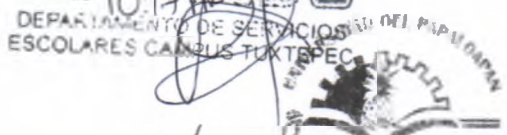
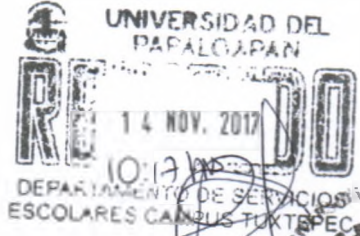
Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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



MARIO VALERA ZARAGOZA
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

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2017/MB/103
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 10 de Noviembre de 2017

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

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. José Francisco Pulido Barajas**, matricula 13140013, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Identificación de microRNAs Integradoras de la respuesta a estrés por sequía e inundación en maíz (*Zea mays ssp. mays*) y teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*)**" 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, chi ji jú



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. José Francisco Pulido Barajas
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

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.

Partes 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.

José Francisco Pulido-Barajas, Lissette Gallegos-Suárez, 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 (*Zea mays ssp. parviglumis*)

Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. Introducción	3
1.1 Importancia del agua en la agricultura	3
1.2 La sequía y la inundación.....	3
1.3 Respuesta de las plantas a la sequía y la inundación	4
1.3.1 Respuesta y efectos de la sequía en plantas	5
1.3.2 Respuesta y efectos de la inundación en plantas.....	8
1.4 Bases moleculares de la respuesta al estrés por sequía e inundación	9
1.5 MicroRNAs	10
1.5.1 Biogénesis de los miRNAs	11
1.5.2 Mecanismos de acción de los miRNAs.....	12
1.5.3 miRNAs en la respuesta al estrés hídrico en plantas	13
1.6 Métodos de identificación de miRNAs	16
1.7 El maíz y el teocintle como modelos de estudio de microRNAs	21
1.7.1 Maíz.....	21
1.8 Teocintle	24
1.9 Similitudes entre el maíz y teocintle <i>Parviglumis</i>	25
1.10 miRNAs de respuesta a sequía e inundación en maíz y teocintle	26
1.11 Relación entre sequía e inundación	28
2. Justificación	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivo general	30
4.1 Objetivos específicos	30
5. Materiales y métodos	31
5.1 Material vegetal	31
5.2 Escarificación de las semillas de teocintle	32
5.3 Establecimiento de condiciones experimentales y tratamientos de estrés	32
5.4 Sincronización de los tratamientos.....	35
5.5 Parámetros fisiológicos de estrés	36
5.5.1 Contenido relativo de agua	37
5.5.2 Coeficiente de tolerancia de anegamiento (CTA).....	37
5.6 Colecta del tejido vegetativo	38
5.7 Extracción de RNA total	38
5.8 Construcción de bibliotecas	39
5.8.1 Fraccionamiento y purificación de RNAs pequeños	39
5.8.2 Precipitación de RNAs pequeños.....	40
5.8.3 Ligación del adaptador 3'	40
5.8.4 Purificación de productos de la primera ligación.....	42
5.8.5 Ligación del adaptador 5'	42
5.8.7 Amplificación de productos por PCR.....	45
5.8.8 Recuperación de los productos de PCR	46
5.9 Verificación de la construcción de las bibliotecas	47
5.9.1 Preparación de los productos de la biblioteca para clonación.....	47
5.9.2 Purificación de DNA mediante AMPure.	48
5.9.3 Ligación al vector pGEM- T Easy.....	49
5.9.4 Transformación de células competentes	49
5.9.5 Cultivo de las colonias blancas	50
5.9.6 Extracción de plásmidos por lisis alcalina.....	50
5.9.7 Purificación de plásmidos y secuenciación	50
5.9.8 Análisis por digestión con EcoRI.....	51
5.10 Secuenciación masiva de las bibliotecas de RNAs pequeños	51

5.11	Análisis bioinformático.....	52
5.11.1	Análisis de la calidad de las bibliotecas	52
5.11.2	Eliminación del adaptador	53
5.11.3	Mapeo.....	55
5.11.4	Identificación de pequeños RNA en la base de datos miRBase.....	56
5.11.5	Agrupación de los tratamientos de las bibliotecas	58
5.11.6	Normalización de las lecturas	59
5.12	Identificación de microRNAs de expresión diferencial usando prueba estadística	61
5.13	Cálculo de la expresión de miRNAs.....	61
6.	Resultados y discusión.....	62
6.1	Crecimiento de maíz y teocintle	62
6.2	Efectos del estrés hídrico en la supervivencia de plantas de maíz y <i>Parviglumis</i>	63
6.3	Comparación de los efectos del estrés sobre el crecimiento y el contenido de agua en maíz y teocintle	65
6.4	Dinámica del estado hídrico en el curso de los tratamientos.....	69
6.5	Calidad del RNA para la construcción de bibliotecas	70
6.6	Generación de bibliotecas de pequeños RNAs y análisis de su calidad	71
6.6.1	Productos de construcción	71
6.6.2	Análisis preliminar de las bibliotecas.	75
6.6.3	Análisis de calidad, tamaño y concentración de las bibliotecas.	80
6.7	Análisis bioinformático.....	82
6.7.1	Análisis de calidad de las secuencias obtenidas	84
6.7.2	Depuración de las bibliotecas	87
6.7.3	Análisis de miRNAs específicos de grupo	105
6.7.4	miRNAs compartidos entre especie.....	105
6.7.5	Normalización de las bibliotecas	106
6.7.6	miRNAs expresados en forma específica al tratamiento	107
6.7.7	Número de miRNAs en respuesta a los tratamientos	109
6.7.8	Número de miRNAs de respuesta a tratamientos individuales en maíz.....	110
6.7.9	Número de miRNAs de respuesta a tratamientos individuales en teocintle	111
6.7.10	Número de miRNAs de respuesta a tratamientos secuenciales en teocintle	112
6.7.11	Análisis de expresión comparativa de miRNAs entre tratamientos.	114
6.7.12	Análisis comparativo de expresión de miRNAs entre especies.....	119
6.7.13	Análisis comparativo de expresión de miRNAs en tratamientos de estrés secuenciales en <i>Parviglumis</i>	121
6.8	Selección del método de normalización.....	125
6.9	Esquema de regulación de los miRNAs en inundación y sequía en <i>Parviglumis</i> y maíz de la normalización por cuantiles	126
7.	Conclusiones	131
8.	Perspectivas	132
9.	Referencias	133
10.	Anexos y apéndices	139
10.1	Anexo 1: preparación de geles, amortiguadores o buffers, medios de cultivo, y otras soluciones.....	139
10.2	Anexo 2: oligonucleótidos y adaptadores.	143
10.3	Anexo 3: plásmido pGEM-T Easy.....	144
10.7	Apéndice A: porcentaje de lecturas mapeadas en el genoma nuclear de maíz.	144
10.4	Apéndice B: Distribución de tamaños y lecturas anotadas en maíz y plantas de la miRBase.	145
10.5	Apéndice C: gráficos de depuración de las bibliotecas.	146
10.6	Apéndice D: expresión relativa en Heatmaps.	156
10.7	Apéndice E: Análisis de restricción con EcoRI de las bibliotecas de <i>Parviglumis</i> control, sequía, sequía-inundación y maíz control e inundación.	168
10.8	Apéndice F: Comparación de gráficos de dispersión para identificar el tratamiento dominante en los seriados.	170

Índice de figuras

Figura 1. Biogénesis de miRNAs en plantas.....	12
Figura 2. Esquema de secuenciación por ligación de SOLiD.....	17
Figura 3. Esquema de secuenciación por síntesis de Ion Torrent.....	18
Figura 4. Esquema de secuenciación por síntesis de 454.....	18
Figura 5. Esquema de secuenciación por síntesis de Illumina.....	19
Figura 6. Esquema de secuenciación de una sola molécula de PacBio.....	19
Figura 7. Esquema de secuenciación de una sola molécula de MinION.....	20
Figura 8. Producción cosechada de los principales cereales en México en el 2015.....	22
Figura 9. Fenología del maíz desde la siembra hasta la maduración del fruto.....	22
Figura 10. Clasificación del género <i>Zea</i> (Vollbrecht y Sigmon, 2005).....	24
Figura 11. Características morfológicas compartidas entre el maíz y teocintle.....	25
Figura 12. Germinación de las semillas de teocintle en caja de Petri.....	31
Figura 13. Escarificación mecánica de la semilla de teocintle.....	32
Figura 14. Contenedor usado para la simulación de la inundación.....	35
Figura 15. Línea de tiempo de los tratamientos aplicados a las plantas.....	36
Figura 16. Adaptador LINKER1 con las modificaciones de los extremos 5' preadenilado y 3' dideoxicitina.....	41
Figura 17. Ligación 3' del pequeño RNA con LINKER1.....	41
Figura 18. Reacción de ligación 5' del producto de la primera ligación con ILLUMINA5.....	43
Figura 19. Esquema de síntesis de cDNA a partir de la ligación de adaptadores a pequeños RNAs.....	44
Figura 20. Esquema de amplificación de cDNA.....	45
Figura 21. Diagrama de flujo del análisis de las bibliotecas.....	52
Figura 22. Configuración para crear el adaptador LINKER1 en CLC.....	53
Figura 23. Parámetros para filtrar secuencias por calidad en CLC.....	54
Figura 24. Parámetro de filtro de longitud para las secuencias de la biblioteca después de eliminar el adaptador.....	54
Figura 25. Archivos generados del mapeo de lecturas en el genoma nuclear de maíz.....	56
Figura 26. Selección de especies en la miRBase para la identificación de miRNAs con la lista de pequeños RNAs.....	57
Figura 27. Parámetros de isoformas y ajustes de cambios de base en el alineamiento para la identificación de miRNAs en maíz de la lista de pequeños RNAs agrupados con frecuencia de una biblioteca.....	57
Figura 28. Archivos generados de la herramienta de <i>Annotate and Merge Counts</i> de CLC.....	58
Figura 29. Herramienta de agrupación de análisis por tratamiento en CLC.....	59
Figura 30. Espiga de la planta de Parviglumis con 80 dds.....	62
Figura 31. Plántulas de maíz con 14 dds todas en etapa V2 dentro del cuarto de crecimiento.....	63
Figura 32. Efecto de los días de sumersión sobre el crecimiento de las plántulas en maíz.....	64
Figura 33. Necrosis de la hoja de maíz, resultado de cuatro días bajo el agua.....	64
Figura 34. Efecto de la privación y recuperación hídrica en plantas de maíz.....	65
Figura 35. Coeficiente de tolerancia al anegamiento (CTA) en maíz y Parviglumis.....	66
Figura 36. Reducción del crecimiento de raíces en plantas de Parviglumis por efecto de la inundación.....	66
Figura 37. Contenido relativo de agua en maíz y Parviglumis.....	67
Figura 38. Mediciones de peso de las macetas de los 5 tratamientos de Parviglumis.....	69
Figura 39. Verificación de integridad del RNA total de maíz y Parviglumis y sus tratamientos.....	70
Figura 40. Fracción de RNAs pequeños entre 20-30 nt en gel de acrilamida 15% desnaturizante.....	72

Figura 41. Gel de acrilamida 15% desnaturalizante para separar los productos de la primera ligación de pequeños RNAs y el adaptador LINKER1.	72
Figura 42. Gel de acrilamida de los productos de amplificación de tres bibliotecas.	73
Figura 43. Gel de acrilamida de los productos de amplificación de cinco bibliotecas.	74
Figura 44. Gel de acrilamida 6% nativo mostrando la reamplificación de los productos recuperados para clonación.	74
Figura 45. Subproductos de la construcción de bibliotecas de pequeños RNAs.	75
Figura 46. Posibles productos de la digestión con EcoRI de las secuencias de la biblioteca ligados al plásmido.	76
Figura 47. Productos de digestión con EcoRI en geles de acrilamida 6% nativo.	76
Figura 48. Alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas.	77
Figura 49. Alineamiento de secuencias de bibliotecas de <i>Brachypodium distachyon</i>	78
Figura 50. Purificación de los productos de las bibliotecas Parviglumis y maíz a partir de gel de acrilamida 6%.	79
Figura 51. Confirmación de un producto después de la purificación de las bibliotecas de Parviglumis y maíz con un tamaño entre 150 y 175 bases.	80
Figura 52. Productos de digestión de la biblioteca PC (Parviglumis Control) usando EcoRI.	80
Figura 53. Gel digital de las bibliotecas, en el que se confirma la presencia de un producto entre 150 y 175 nt.	81
Figura 54. Electroferograma de las bibliotecas de Parviglumis y maíz mostrando un producto cercano a 150 nt.	81
Figura 55. Esquema de construcción de bibliotecas.	83
Figura 56. Gráfico de calidad de las bibliotecas con promedio Q>30.	84
Figura 57. Gráfico de contribución de nucleótidos de las bibliotecas realizado con el programa CLC.	85
Figura 58. Comparación de la construcción con insertos y vacío con gráficos de contribución.	86
Figura 59. Secuencia removida de las bibliotecas.	87
Figura 60. Distribución promedio de las longitudes excluidas después de la remoción del adaptador y filtro de longitud.	88
Figura 61. Cobertura de las lecturas de 18 a 35 nt mapeadas en el genoma de la mitocondria. ...	89
Figura 62. Distribución promedio de las lecturas mapeadas en el genoma de la mitocondria.	89
Figura 63. Cobertura de las lecturas de 18 a 35 nt mapeadas en el genoma del cloroplasto.	90
Figura 64. Distribución de las secuencias mapeadas en el genoma de cloroplasto.	90
Figura 65. Gráfico de cobertura de las lecturas mapeadas en el genoma nuclear.	92
Figura 66. Distribución promedio de longitud de las secuencias mapeadas en el genoma nuclear de maíz.	93
Figura 67. Distribución de las lecturas mapeadas en la base de datos de RNAs ribosomales.	94
Figura 68. Distribución de las secuencias mapeadas en la base de datos de tRNA.	94
Figura 69. Distribución de las lecturas mapeadas en la base de datos de lncRNA.	95
Figura 70. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de snRNA. La longitud de 24 nt fue la más abundante.	95
Figura 71. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de snoRNA.	96
Figura 72. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de RNA repeats.	97
Figura 73. Categoría de las secuencias de las bibliotecas.	97
Figura 74. Categoría de las secuencias de las bibliotecas malas.	98
Figura 75. Distribución de longitud de las lecturas filtradas en número de lecturas globales y únicas.	99
Figura 76. Mapeo de las lecturas por frecuencia sobre el precursor miR398 de maíz. En el encabezado de la figura se encuentra el precursor. Las secuencias maduras 5' y 3' se encuentran sombreadas al principio y final respectivamente. Los valores entre paréntesis son las frecuencias de las secuencias únicas.	100

Figura 77. Regiones mapeadas de las lecturas anotadas en el precursor para cada bibliotecas. Se observa que la región madura 3' es la de mayor proporción.	101
Figura 78. Distribución de longitud de las lecturas anotadas en el precursor.	101
Figura 79. Distribución de longitud de las lecturas no anotadas en el precursor.	102
Figura 80. Porcentaje de lecturas crudas y anotadas en la miRBase de maíz.	104
Figura 81. Comparación de lecturas anotadas en maíz y plantas de la miRBase	104
Figura 82. Diagrama de Venn para maíz y Parviglumis de miRNAs anotados en todas las plantas.	105
Figura 83. Diagrama de Venn de miRNAs de maíz y teocintle anotados de todas las plantas y anotados de maíz.	106
Figura 84. Gráfico de distribución de lecturas crudas y normalizadas.	107
Figura 85. Diagrama de Venn de los tratamientos en las bibliotecas de maíz normalizadas por TPM y cuantiles.	108
Figura 86. Diagrama de Venn para los tratamientos de Parviglumis con las lecturas normalizadas por TPM y cuantiles.	108
Figura 87. Diagrama de Venn de los miRNAs en los tratamientos de control e inundación en Parviglumis incluyendo las malas.	109
Figura 88. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a inundación en maíz por TMP y cuantiles.	110
Figura 89. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a sequía en maíz por TMP y cuantiles.	111
Figura 90. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a inundación en Parviglumis por TMP y cuantiles.	111
Figura 91. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a sequía en Parviglumis por TMP y cuantiles.	112
Figura 92. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta al tratamiento secuencial inundación-sequía en Parviglumis por TMP y cuantiles.	112
Figura 93. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta (inducida o reprimida) al tratamiento secuencial sequía-inundación en Parviglumis.	113
Figura 94. Diagrama de Venn del número de miRNAs regulados por inundación en en Parviglumis por TMP y cuantiles.	113
Figura 95. Representación e interpretación de los valores de expresión.	115
Figura 96. Resumen de heatmap del análisis de las bibliotecas después de aplicar los filtros y empleando normalización por TPM y por cuantiles.	117
Figura 97. Heatmap maíz y Parviglumis para inundación y sequía.	120
Figura 98. Heatmap de los valores de expresión de miRNAs en tratamientos secuenciales de Parviglumis.	121
Figura 99. Comparación mediante gráficos de dispersión de los tratamientos individuales con los seriados normalizados por TPM.	123
Figura 100. Comparación mediante gráficos de dispersión de los tratamientos individuales con los seriados normalizados por Cuantiles.	124
Figura 101. Comparación de los resultados de los miR167 por qPCR con lecturas, crudas, normalizadas por TPM y por cuantiles.	125
Figura 102. Esquema de regulación de los miRNAs por cuantiles en maíz y teocintle en los tratamientos de inundación y sequía.	127
Figura 103. Plásmido pGEM-T Easy señalando los sitios de restricción por EcoRI.	144
Figura 104. Distribución de tamaños de secuencias de maíz en la base de datos de la miRBase.	145
Figura 105. Distribución de tamaños de secuencias de plantas en la base de datos de la miRBase.	145
Figura 106. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz control.	146

Figura 107. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz inundación.	147
Figura 108. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz sequía.	148
Figura 109. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis control.	149
Figura 110. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis inundación.	150
Figura 111. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis sequía.	151
Figura 112. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis inundación-sequía.	152
Figura 113. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis sequía-inundación.	153
Figura 114. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis control-previo.	154
Figura 115. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis inundación-previo.	155
Figura 116. Heatmap de los valores de expresión de maíz en inundación (MI/MC) y sequía (MS/MC), y efecto de la aplicación de filtros a datos normalizados por TPM.	156
Figura 117. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en maíz normalizados por cuantiles.	157
Figura 118. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis normalizados por TPM.	158
Figura 119. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis normalizados por cuantiles.	159
Figura 120. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis malas normalizados por TPM.	160
Figura 121. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis malas normalizados por cuantiles.	161
Figura 122. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis PC/PI y PC(1)/PI(1) normalizados por TPM.	162
Figura 123. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis PC/PI y PC(1)/PI(1) normalizados por cuantiles.	163
Figura 124. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis y maíz normalizados por TPM.	164
Figura 125. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis y maíz normalizados por cuantiles.	165
Figura 126. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis bajo estreses únicos y secuenciales a partir de datos normalizados por TPM.	166
Figura 127. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis bajo estreses únicos y secuenciales a partir de datos normalizados por cuantiles.	167
Figura 128. Productos de digestión de las bibliotecas de Parviglumis control (PC) y Parviglumis Sequía (PS) usando EcoRI.	168
Figura 129. Productos de digestión de las bibliotecas Parviglumis Sequía (PS) y Parviglumis Sequía-Inundación (PSI) usando EcoRI.	168
Figura 130. Productos de digestión de las bibliotecas Parviglumis Sequía-Inundación (PSI) y maíz control (MC) usando EcoRI.	168
Figura 131. Productos de digestión de las bibliotecas Maíz control (MC) y Maíz Inundación (MI) usando EcoRI.	169

Índice de tablas

Tabla 1. Algunos microRNAs de respuesta a estrés hídrico identificados en plantas y sus genes blanco.	14
Tabla 2. Etapas fenológicas del maíz y sus características.	23
Tabla 3. miRNAs con expresión diferencial en experimentos de estrés hídrico en maíz.	27
Tabla 4. Información general del material vegetal empleado en este trabajo	31
Tabla 5. Condiciones experimentales de tratamiento.....	34
Tabla 6. Preparación de reacciones de ligación 3'	42
Tabla 7. Preparación de reacciones de ligación 3'	42
Tabla 8. Preparación de reacciones de ligación 5'	43
Tabla 9. Preparación de reacciones de ligación 5' (continuación).	43
Tabla 10. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA	44
Tabla 11. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA (continuación).	45
Tabla 12. Preparación de reacciones de amplificación por PCR.	46
Tabla 13. Condiciones de ciclaje para síntesis de cDNA.	46
Tabla 14. Preparación de reacciones de PCR con Dream Taq PCR.....	48
Tabla 15. Condiciones de ciclaje para la reacción con Dream Taq PCR.....	48
Tabla 16. Preparación de reacciones de ligación en el vector pGEM-T Easy	49
Tabla 17. Preparación de reacciones de restricción con EcoRI.	51
Tabla 18. Ejemplo de normalización de las bibliotecas con TPM.	60
Tabla 19. Porcentaje de supervivencia por inundación.	63
Tabla 20. Cuantificación del RNA total en el Nanodrop.	71
Tabla 21. Resultados de secuenciación Sanger en base al tamaño de las bandas purificadas.	78
Tabla 22. Identificación de las secuencias de bibliotecas de maíz.	78
Tabla 23. Identificación de las secuencias de bibliotecas de <i>Brachypodium distachyon</i>	79
Tabla 24. Concentraciones finales de las bibliotecas.....	82
Tabla 25. Resumen de lecturas recuperadas del análisis de depuración de las bibliotecas.	103
Tabla 26. Filtro de valores de expresión relativa	110
Tabla 27. Número de miRNAs de respuesta similar u opuesta en los tratamientos aplicados. El número antes de la barra diagonal es de TPM, y el posterior es de cuantiles.	118
Tabla 28. Identificación de miRNAs de respuesta similar u opuesta a los tratamientos aplicados, de acuerdo a datos normalizados por cuantiles.....	118
Tabla 29. Número de miRNAs de regulación conservada en las especies y por tratamientos. El número antes de la barra diagonal es de TPM y después cuantiles.	120
Tabla 30. Resumen de la identificación de la expresión de miRNAs en los tratamientos. El número antes de la barra diagonal es de TPM y después cuantiles.	122
Tabla 31. Valores de las variables de la comparación de PIS/PI*X de la gráfica de log ₂	123
Tabla 32. Valores de las variables de la comparación de PIS/PI*X de la gráfica de doblez.	123
Tabla 33. Valores de las variables de la comparación de PSI/PS*X de la gráfica de log ₂	124
Tabla 34. Valores de las variables de la comparación de PSI/PS*X de la gráfica de doblez.	124
Tabla 35. Coeficiente de correlación y determinación del miR166 para las comparaciones con qPCR.	126
Tabla 36. Porcentaje de lecturas mapeadas en el genoma nuclear de maíz para maíz control, Parviglumis control y Parviglumis control –previo (1).	144

Lista de abreviaturas

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
lncRNA	Ácido ribonucleico largo no codificante
snRNA	Ácido ribonucleico mensajero
snoRNA	Ácido ribonucleico mensajero
repeatsRNA	Ácido ribonucleico repetitivo
miRNA	MicroRNA
TPM	Partes por millón
T	Temperatura
V	Volt
°C	Grados centígrados
g	Gramos
h	Horas
m	Metros
cm	Centímetros
L	Litros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molaridad
nM	Nanomolar
N	Normalidad
dds	Días después de la siembra
Ct	Número de ciclos para alcanzar el umbral
Q	Calidad de la secuenciación
nt	Bases nucleotídicas
Pt	Peso turgente
Ps	Peso seco
Pf	Peso fresco
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
s	Segundos

RESUMEN

El ciclo hidrológico ha sufrido alteraciones a causa de las actividades humanas, ocasionando sequías e inundaciones a nivel global. La agricultura es una de las actividades económicas más afectadas por dichos factores adversos, por lo que es importante el estudio de los mecanismos naturales que permiten a las plantas tolerar el estrés a diversos agentes ambientales. Se sabe que las plantas realizan una serie de reajustes morfológicos, bioquímicos y fisiológicos para tolerar el estrés, que están mediados al nivel molecular mediante la inducción y represión de genes. Estos cambios son complejos, pueden ser específicos o inter cruzados en la respuesta a múltiples tipos de estrés, y están controlados por diferentes moléculas reguladoras, entre éstas, pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs (miRNAs). El presente trabajo se realizó con el objetivo de identificar miRNAs que alteran su expresión en respuesta al estrés hídrico por ausencia de agua (sequía) o por exceso (inundación) en maíz y en su ancestro, el teocintle, para investigar puntos de entrecruzamiento y conservación de la respuesta a ambos tipos de estrés. La identificación de miRNAs de respuesta al estrés se llevó a cabo con la construcción, secuenciación de alto alcance y análisis bioinformático de bibliotecas de RNAs pequeños, obtenidas a partir de plantas de maíz y teocintle sometidas a estreses únicos (sequía o inundación) o secuenciales (inundación-sequía; sequía-inundación). Mediante la aplicación de dos métodos de normalización de los datos de secuenciación, se estableció que uno de los métodos, el de cuantiles, es el más adecuado para interpretar la expresión de los miRNAs. Adicionalmente, fue posible identificar nuevos miRNAs en teocintle que no están reportados en maíz y se observó que en la aplicación de estreses secuenciales predomina el efecto del estrés primario. Se identificaron a miRNAs pertenecientes a la familia miR166, miR398, miR397 y miR396, como elementos integradores de las respuestas a ambos estreses y/o entre maíz y teocintle. Con base en los procesos en los que estos miRNAs están implicados, los resultados indican que el desarrollo, el reajuste de la arquitectura celular, y la respuesta al estrés oxidativo, son los aspectos más importantes que se encuentran bajo la regulación de miRNAs respuesta a estrés por sequía o inundación, y que éstos podrían ser elementos clave para explicar la conservación y la divergencia de la tolerancia al estrés hídrico en maíz y teocintle.

ABSTRACT

The hydrologic cycle has suffered alterations caused by human activities, which have led to droughts and floods at the global level. Agriculture is one of the most affected economic activities by such factors, and for this reason, it is important the study of natural mechanisms that allow plants to tolerate stress to diverse environmental factors. It is known that plants make a series of morphological, biochemical and physiological adjustments to cope with stress, which are controlled at molecular level by up- and down-regulation of genes. These changes are complex and can be specific or common in the response to multiple kinds of stress, and are mediated by different regulator molecules, among them, small RNAs called microRNAs (miRNAs). This work aimed to identify miRNAs that change their expression profiles in response to water stress caused by absence (drought) or excess (submergence) of water, in maize and its ancestor, teosinte, in order to investigate crosstalk points and conservation of the response to both kinds of stress. The identification of stress responsive miRNAs was performed through construction, high throughput sequencing and analysis of small RNA libraries obtained from maize and teosinte plantlets under unique treatments of drought or submergence, or sequential stress (drought-submergence or submergence-drought). Through the application of two methods for normalization of sequencing data, it was established that one of them, the quantil method, was the most accurate for interpreting miRNA expression. In addition, it was possible to identify novel teosinte mRNAs that have not been reported in maize. Also, it was observed that in sequential stress treatments, the primary stress is dominant over the second stress. MiRNA members of miR166, miR398, miR397 and miR396 families, were identified as common points in the response to both kinds of stress, or in maize and teosinte. On the basis of processes that these miRNAs are involved on, the results indicate that development, cell architecture adjustment, and oxidative stress response, are the most important aspects that are under miRNA control during the response to drought and/or submergence. Thus, these miRNAs could be key elements for explaining the conservation and divergence of tolerance to water stress in maize and teosinte.

1. Introducción

1.1 Importancia del agua en la agricultura

La agricultura es una de las actividades económicas más importantes para el desarrollo de las naciones, especialmente en las poblaciones rurales, ya que representa el mayor porcentaje del ingreso familiar (SAGARPA, 2017). En México, más del 50% del territorio total consta de tierras cultivables, aunque solo se dedica el 10.5 % a la agricultura de diversas especies vegetales, entre las que se encuentran, por ejemplo, el maíz, el frijol y el arroz (SIAP, 2004).

Desde sus inicios, la agricultura ha dependido directamente de la disponibilidad de fuentes de agua para su desarrollo, ya que este recurso determina el éxito productivo de los cultivos en el campo. A nivel mundial, el 21% de los cultivos se llevan a cabo bajo sistemas de irrigación superficial, los cuales aportan el 40% de los productos agrícolas totales (FAO, 2014). En México el porcentaje con irrigación es menor al promedio mundial, ya que solo 20% de los cultivos son irrigados mientras la gran mayoría, el 80% restante, se mantienen en régimen de temporal, es decir, dependen del agua de precipitación (INEGI, 2014).

Aunque la productividad de los cultivos se incrementa con la irrigación, también existen costos adicionales para la adquisición de la infraestructura de riego y el transporte del agua. Es de esperar que la dependencia del agua de lluvia en los cultivos de temporal produce pérdidas dramáticas debido a la falta o exceso de agua además de que no existe un requerimiento de inversión en infraestructura o servicios de riego. Por lo tanto, la disponibilidad de agua de precipitación sigue siendo un recurso fundamental para el desarrollo de la agricultura sustentable en los países en desarrollo, no obstante, está expuesta a las alteraciones del ciclo hidrológico (SAGARPA, 2012).

1.2 La sequía y la inundación

Como consecuencia directa del cambio climático, en las últimas décadas han ocurrido cambios en la periodicidad, temporalidad e intensidad de las lluvias. Las alteraciones en el

ciclo hidrológico pueden provocar escasez de lluvias por algún periodo de tiempo. Si la escasez de lluvias se prolonga en el tiempo, puede presentarse una sequía y traer consecuencias negativas para la agricultura y la ganadería. La sequía agrícola se define como la deshidratación excesiva del suelo por la falta de agua durante periodos prolongados.

En México, la sequía es la principal causa de pérdidas en cultivos. Entre 2004 y 2011 se registraron 1,054 fenómenos climatológicos en todo el país de los cuales 34% fueron catalogados como sequía, el resto con exceso de agua y heladas. Estos fenómenos causaron anomalías en las precipitaciones, causando sequía principalmente en la región norte y centro del país (SAGARPA, 2012). Tan solo en el año agrícola 2011 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, a causa de la sequía. Se estima que 70 mil 902 cabezas de ganado bovino murieron o fueron sacrificadas por la misma causa (SAGARPA, 2011).

El ciclo hidrológico puede alterarse también hacia el exceso de lluvias, lo cual es típico cuando se presentan eventos meteorológicos extremos como los huracanes. El exceso de lluvias provoca inundaciones en el campo a niveles variables, ocasionando desde anegamiento hasta total sumersión de las plantas en el campo.

La inundación se define como el exceso de agua suministrada sobre un área. El estancamiento del agua se produce cuando el suelo ha sido saturado con agua y ésta entra en el suelo más rápido de lo que puede drenarse por gravedad. La inundación puede ser descrita de dos formas: anegamiento y sumersión. El anegamiento corresponde a la inundación de las raíces (Christianson *et al*, 2010). La sumersión describe la situación cuando la planta completa se encuentra bajo el agua (Bailey-Serres *et al*, 2012). En México, la inundación es la segunda causa de pérdidas económicas debidas a factores ambientales adversos (Agroasemex, 2006).

1.3 Respuesta de las plantas a la sequía y la inundación

El agua es un recurso importante para las plantas ya que de su disponibilidad dependen funciones vitales como la fotosíntesis y el transporte de nutrientes. Tanto la sequía como la

inundación son dos formas de alteración del equilibrio hídrico, hacia la deficiencia como hacia el exceso, respectivamente, que afectan directamente el desarrollo de las plantas y su productividad.

1.3.1 Respuesta y efectos de la sequía en plantas

La deshidratación excesiva del suelo causa un estrés fisiológico importante sobre las plantas porque influye en su crecimiento y rendimiento, y en un sentido más amplio, determina su abundancia y distribución en el planeta (Gurevitch *et al*, 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

Las investigaciones realizadas al respecto de la respuesta al estrés por sequía se han centrado en el estudio de la tolerancia y los mecanismos de señalización de déficit hídrico. Los resultados muestran que las vías de señalización forman una red compleja e interconectada en muchos niveles (Knight y Knight, 2001). Esto explica la resistencia cruzada de las plantas para responder a un estrés particular pudiendo ser elicitado a través de más de una vía (Bohnert y Sheveleva, 1998).

El estrés puede estudiarse desde muchos ángulos empezando por la intensidad, la duración y la etapa en que se aplica, así como la respuesta de la planta durante y después de éste. En el caso de una deshidratación rápida, las plantas reaccionan al minimizar la pérdida de agua o al exhibir protección metabólica contra el estrés osmótico y el oxidativo. Una sequía severa o leve puede tener resultados totalmente diferentes en cuanto a la respuesta fisiológica o de adaptación (McDonald y Davies, 1996), pero la importancia del tiempo de respuesta de la planta puede cambiar drásticamente en función del genotipo y el medio ambiente. Las plantas responden también dependiendo de su etapa de desarrollo, por ejemplo, en etapas tempranas de desarrollo se ven afectada de forma severa la germinación de las semillas y el establecimiento de plántulas (Kaya *et al*, 2006), mientras que, en etapas avanzadas, la floración y la producción de semillas son los procesos más sensibles al estrés. Adicionalmente se puede incluir la interacción con otros factores ambientales. La respuesta a la sequía en las plantas es, por lo tanto, compleja ya que se expresa en la escala espacio-temporal, y en su integración en los diferentes niveles de organización de la planta (Blum, 1996).

En general, se reconocen tres estrategias de respuesta de las plantas al estrés por sequía: la evasión, la tolerancia y el escape (Levitt, 1972; Turner, 1986). Estas estrategias pueden ocurrir de manera simultánea durante el estrés (Ludlow, 1989). La evasión consiste en la capacidad de las plantas para soportar la sequía evitando la deshidratación de tejidos, ya sea limitando la pérdida de agua y/o manteniendo el potencial hídrico del tejido lo más alto posible. Esto se logra mediante la reducción en la pérdida de agua y la máxima absorción de agua. La pérdida de agua se minimiza con el cierre de los estomas y la exposición de la superficie, a través epinastia (Ehleringer y Cooper, 1992), cambios en su ángulo de inclinación, o bien, disminuyendo el área foliar mediante la limitación del crecimiento y la caída de las hojas de mayor edad. La absorción de agua se maximiza mediante el aumento en la profundidad en las raíces (Jackson *et al*, 2000).

La tolerancia, en cambio, implica el ajuste osmótico a través del aumento en la concentración de solutos compatibles en las células y el control de la rigidez (Morgan, 1984) y la elasticidad de sus paredes celulares para mantener la turgencia. La tolerancia se relaciona además con la capacidad de las plantas para realizar un uso eficiente del agua (WUE) en condiciones en que ésta se encuentra limitada (Franks, 2011).

El escape a sequía es la capacidad de la planta para completar su ciclo de vida, es decir, completar el crecimiento vegetativo y reproductivo antes del inicio de la temporada de sequía. Este tipo de respuesta es también conocida como plasticidad (Verslues y Juenger, 2011), y su característica principal es la floración adelantada. Esta característica es importante ya que en ambientes naturales, el inicio de la respuesta de escape es un rasgo de adaptación clave para desencadenar la transición floral y el éxito reproductivo (Franks, 2011).

Las estrategias de repuesta de las plantas ante el estrés por sequía están mediadas por cambios a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y molecular (Xu *et al*, 2010). Algunos de estos cambios son propiamente efectos del estrés, mientras que otros son en sí mismos parte de la estrategia de respuesta que la planta activa para sobrellevar el estrés y sus efectos. Dentro de los efectos de la falta de agua, a nivel fisiológico en la planta se encuentra el encogimiento de las células que conduce a la pérdida de la turgencia y cambios en el potencial de membrana, ocasionando estrés osmótico. Bajo una pérdida severa de agua se suprime el metabolismo y se desintegra la membrana (Mahajan y Tuteja, 2006). El crecimiento celular es uno de los procesos fisiológicos más sensibles a la sequía, debido a

la reducción en la presión de turgencia (Taiz y Zeiger, 2006). Los daños en la mitosis, elongación y expansión celular causan reducción de la altura de planta y del área foliar (Nonami, 1998; Hussain *et al*, 2008) y estrés osmótico (Randy 1995; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Otro efecto importante de la sequía es la reducción de la fotosíntesis, que ocurre por una disminución de la expansión de las hojas y senescencia prematura de las mismas (Wahid y Rasul, 2005). El déficit hídrico ocasiona la pérdida del balance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la defensa antioxidante (Fu y Huang, 2001; Reddy *et al*, 2004) debido al exceso de energía y por falta de disipación térmica. Esto ocasiona estrés oxidativo, que es un estado de daño celular causado por ROS, entre los que se incluyen peróxidos (H_2O_2), superóxidos (O_2^-) y grupos hidroxilo (OH^-) (Foyer y Noctor, 2005; Bian y Jiang, 2009). Las especies reactivas de oxígeno inducen daño oxidativo en las proteínas, los lípidos de membrana y otros componentes celulares como puede ser el aparato fotosintético, afectando con esto el metabolismo (Foyer y Mullineaux 1994; Niyogi, 1999). Las respuestas de las plantas a la sequía van, por lo tanto, encaminadas a controlar los efectos del estrés y a la protección general de las estructuras celulares vitales. Esto incluye la defensa contra tipos de estrés secundarios, como nutricional, osmótico y oxidativo.

Desde una perspectiva de aplicación en biotecnología, se han analizado diferentes plantas de interés agronómico para investigar el efecto de la sequía en parámetros que afectan directamente la productividad. Por ejemplo, en arroz durante la etapa vegetativa, se ha estudiado la reducción del crecimiento y desarrollo a causa de la sequía (Tripathy *et al*, 2000; Manikavelu *et al*, 2006). En la cebada se reduce la producción del grano al disminuir el número de macollos, espigas y semillas por planta (Samarah, 2005). En el maíz, el estrés hídrico afecta el número de granos por planta (Cattivelli *et al*, 2008). En trigo, la sequía provoca baja tasa de llenado del grano (Wardlaw y Willenbrink, 2000). En la soya, se reduce el rendimiento total de semilla (Frederick *et al*, 2001).

Los efectos de la sequía también actúan como agentes de selección y causan cambios evolutivos de base genética para sus descendientes (Fox, 1990; Ludwig *et al*, 2004), lo cual tiene implicaciones para la agronomía. Uno de los parámetros más importantes es el tiempo de floración, es decir, el tiempo que le lleva a la planta iniciar el proceso de floración, y que es fundamental para garantizar la productividad de semillas durante el estrés hídrico. La

plasticidad en el tiempo a floración se ha reportado en varias especies como *Arabidopsis*, arroz, avena, *Brassica rapa*, *Mimulus guttatus* y *M. nasutus* (Xu *et al*, 2005; Lafitte *et al*, 2006; Sherrard y Maherali, 2006; Franks *et al*, 2007; Ivey y Carr, 2012).

1.3.2 Respuesta y efectos de la inundación en plantas

La respiración es el proceso fisiológico de la planta más sensible a las inundaciones. La inundación reduce el intercambio de aire entre el suelo y la atmósfera (Wesseling, 1974) disminuyendo la concentración de oxígeno en el suelo (hipoxia) (Bailey-Serres y Voeselek, 2008). La baja concentración de oxígeno alrededor de las raíces produce inhibición de la respiración y la síntesis de ATP en las mitocondrias, así como la afectación del metabolismo en la glucólisis (Mielke y Schaffer, 2010).

Los efectos de las inundaciones incluyen desarrollo limitado de las raíces y brotes (Onuegbu, 1997), reducción de la fotosíntesis (Liu *et al*, 2010), disminución de la altura de la planta (Scott *et al*, 1990) retraso de la floración (Peña-Castro *et al*, 2011), bajos rendimientos (Uzo, 1997), y bajo porcentaje de germinación (Hamada y Nonoyama, 1990). Incluso si la inundación no produce la muerte de las plantas, puede tener un impacto negativo a largo plazo en el rendimiento de los cultivos.

Las plantas exhiben respuestas metabólicas, morfológicas y fisiológicas a la inundación en las raíces o la planta completa para asegurar la supervivencia. Una respuesta metabólica es el cambio de la respiración aeróbica a fermentación anaeróbica para la obtención de energía (Kennedy *et al*, 1992). Mediante hormonas de la homeostasis se controla el pH que se altera por acumulación de metabolitos como etanol, lactatos, CO₂ y especies reactivas de oxígeno y toxinas (Chandel *et al*, 1998; Lopez-Barneo *et al*, 2001; Shabala, 2011).

Los cambios morfológicos de respuesta durante la inundación incluyen elongación de la parte aérea, cierre de estomas, y formación de aerénquimas y raíces adventicias (Vartapetian y Jackson 1997; Liao y Lin, 2001; Yordanova y Popava, 2007).

En general, los mecanismos de supervivencia que existen en plantas para responder a la inundación son dos: la quiescencia y el escape. En lo que se refiere a la quiescencia, este mecanismo de respuesta se caracteriza por una restricción general en el metabolismo

celular y el crecimiento, mostrada por las especies que perduran regularmente inundaciones profundas de duración corta. Este mecanismo ha sido caracterizado en arroz y se conocen los genes responsables de la limitación foliar. El locus SUBMERGENCE1 (SUB1) controla la tolerancia en la sumersión completa (Xu *et al*, 2006).

Por otra parte, el escape es un mecanismo que se distingue por el alargamiento rápido de los tallos y hojas bajo el agua para permitir al tejido fotosintético a superar las inundaciones poco profundas. Los genes responsables de la estrategia son SNK1 y SNK2 y provienen del locus SNORKEL en las plantas de arroz, que promueven la elongación bajo el agua en esta especie (Hattori *et al*, 2009).

1.4 Bases moleculares de la respuesta al estrés por sequía e inundación

La investigación de las bases moleculares de la respuesta al estrés por sequía en plantas ha permitido clasificar a los genes que participan en tres grupos: a) aquellos que participan en cascadas de señalización y de control de la transcripción como factores MYC, MAP quinasas y SOS quinasa (Zhu *et al*, 2002; Munnik *et al*, 1999), y fosfolipasas (Chapman, 1998; Frank *et al*, 2000); b) aquéllos que están involucrados en la protección de las membranas y proteínas, como las proteínas de choque térmico (HSP) y chaperonas, deshidrinas, proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA) (Bray *et al*, 2000; Ingram y Bartels, 1996; Vierling, 1991) y enzimas antioxidantes (Smirnoff, 1998; Dat *et al*, 2000); y c) los que tienen funciones para la absorción de agua e iones, como las acuaporinas (Blumwald, 2000).

En plantas bajo estrés por inundación se induce la expresión de genes de respuesta a hipoxia. En los promotores de estos genes se han encontrado secuencias comunes llamadas elementos de respuesta aeróbica (ARE). Los ARE contienen secuencias de unión a factores de transcripción (FT) de la familia Myb que juegan papeles en la respuesta a estrés (Dolferus *et al*, 1994). Entre las proteínas sintetizadas a partir de genes con secuencias ARE se encuentran péptidos anaeróbicos que funcionan como FT y chaperonas (Liu *et al*, 2005). Las enzimas involucradas en la glicólisis y fermentación anaeróbica como la alcohol deshidrogenasa, la aldolasa, la enolasa, la glucosa fosfato isomerasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la piruvato descarboxilasa y la sacarosa sintasa

(Sachs *et al*, 1996; Chang *et al*, 2000) se encuentran inducidas por el estrés de inundación. También se han encontrado enzimas antioxidantes como las peroxidasas que se encargan de eliminar especies reactivas como el peróxido y grupos hidroxilo (Lin *et al*, 1984, 1998; Zhou *et al*, 1995; Yan *et al*, 1999).

Recientemente, un estudio del transcriptoma de plantas de *Brachypodium distachyon* realizado por nuestro grupo reveló que la respuesta molecular a la inundación posee un componente fuerte de defensa ante el estrés oxidativo (Rivera-Contreras *et al*, 2016). En dicho trabajo se compararon dos ecotipos de *Brachypodium* con tolerancia a la inundación contrastante, y se obtuvieron resultados que sugieren que el ecotipo tolerante controla de forma coordinada el estrés oxidativo a través de la captura de NO (óxido nítrico), vía la HB1 (HEMOGLOBINA1), entre otros mecanismos.

No todos los genes de respuesta al estrés participan directamente en procesos de adaptación celular; algunos de ellos solo están involucrados en respuesta al deterioro de corto plazo. La respuesta de las plantas al estrés es compleja (Cushman y Bohnert, 2000; Bray, 2002) y aún queda por identificar la función de muchos genes de respuesta.

1.5 MicroRNAs

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificante involucradas en la expresión de genes cuyo tamaño varía de 20 a 30 nucleótidos. Estos RNAs, también llamados RNAs pequeños (small RNAs, siRNAs), se clasifican en microRNAs (miRNAs), trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) y antisentido natural siRNAs (nat-siRNAs), principalmente (Vaucheret, 2006). En general, su función es la regulación de expresión sobre transcritos mensajeros (Novina, 2004). Adicionalmente, existe una nueva categoría dentro de los RNAs pequeños no codificantes con tamaño de 30 a 40 nucleótidos y se les conoce como siRNA largos (lsiRNA) (Katiyar-Agarwal *et al*, 2007).

1.5.1 Biogénesis de los miRNAs

Los miRNAs de plantas se transcriben de regiones intergénicas. De forma similar a los genes que codifican proteínas, proceden de transcritos sintetizados por la RNA polimerasa II (Pol II) y son modificados post-transcripcionalmente con la adición de la estructura CAP en el extremo 5' y poliadenilación en el extremo 3'. Estos transcritos se conocen como transcritos primario o pri-miRNA (Bartel, 2004).

Enseguida, la primera modificación es realizada por la DICER-LIKE1 (DCL1) una ribonucleasa tipo III trabajando en un complejo de corte apoyada por HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1), SERRATE (SE), y complejo nuclear de unión a CAP (CBC,) donde el pri-microRNA es transformado en una estructura de horquilla llamado miRNA precursor (pre-miRNA) (Dong *et al*, 2008; Laubinger *et al*, 2008). El pre-miRNA se vuelve a cortar por la DCL1, con la ayuda de SE y Dawdle (DDL), separando la horquilla, y después el dúplex de miRNA que continúa es metilado en su extremo 3' por Hua Enhancer (HEN1), una metiltransferasa.

El dúplex de miRNA maduro se transporta al citoplasma a través de HASTY5 (HST5) y ahí, las dos cadenas se separan, y generalmente una de ellas, llamada miRNA maduro, es reclutada por Argonauta1 (AGO1), que forma parte del complejo de silenciamiento de RNA (RISCs) (Park *et al*, 2005). Los pasos de la biogénesis de miRNAs se esquematizan en la Figura 1.

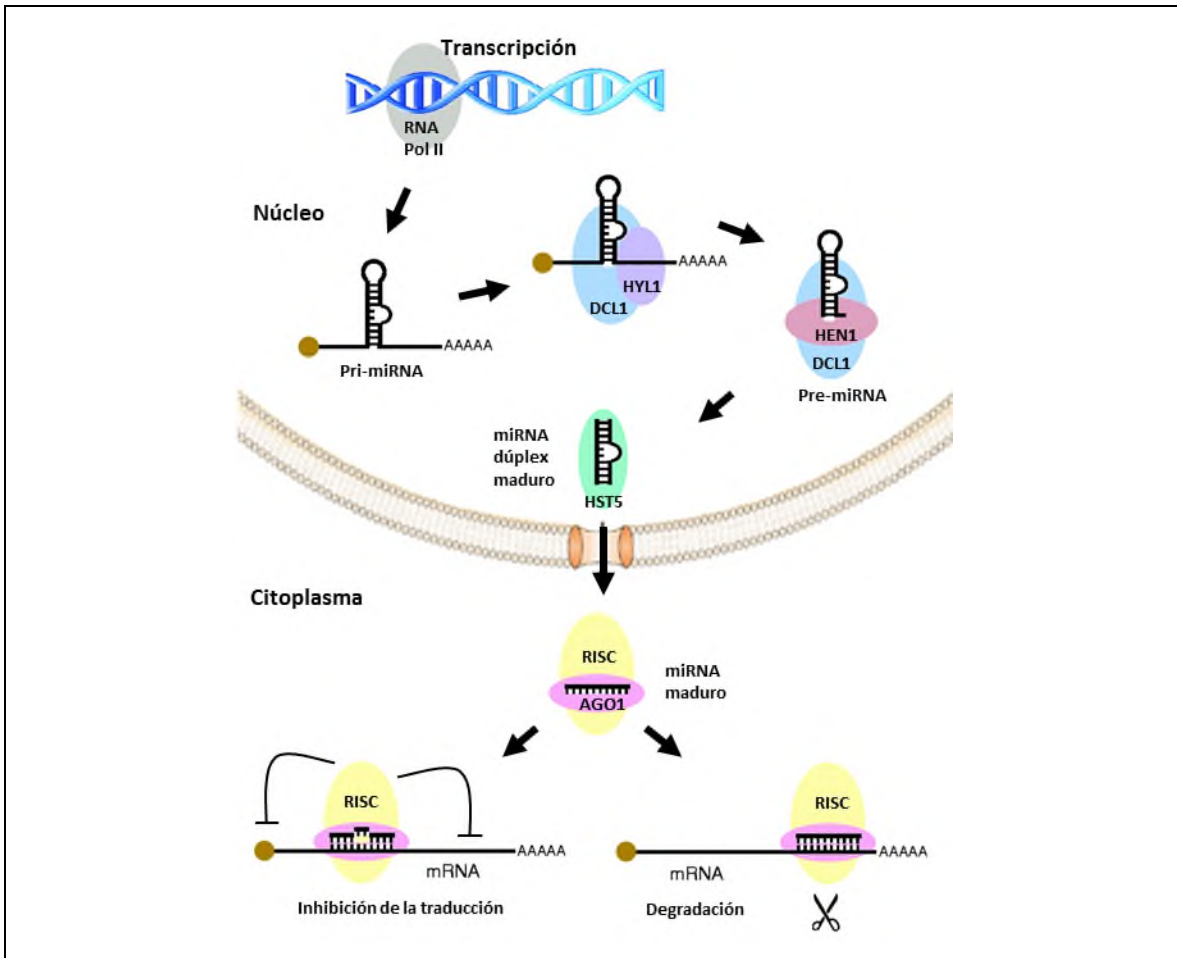


Figura 1. Biogénesis de miRNAs en plantas. Las principales enzimas son DCL1, AGO1 y el complejo RISC (modificado de Yi y Fuchs, 2011).

1.5.2 Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs funcionan en la regulación de transcritos o RNAs mensajeros en dos mecanismos posibles: degradación del RNA mensajero (Llave *et al*, 2002; Reinhart *et al*, 2002), o inhibición de la traducción (Chen, 2004; Brodersen *et al*, 2008).

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

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

De esta forma, 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.

1.5.3 miRNAs en la respuesta al estrés hídrico en plantas

Un gran número de reportes científicos han descrito miRNAs como participantes activos en la regulación de la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, entre los cuales se encuentra la sequía y la inundación (Zhao *et al*, 2007; Liu *et al*, 2008; Arenas-Huertero *et al*, 2009; Barrera-Figueroa *et al*, 2011). En la Tabla 1 se enlistan miRNAs cuya expresión se induce o se reprime en respuesta al estrés por sequía, así como sus genes blanco de regulación.

Tabla 1. Algunos microRNAs de respuesta a estrés hídrico identificados en plantas y sus genes blanco.

microRNA	Organismo	Tratamiento	Gen blanco	Referencia
	<i>Inducidos</i>			
miR157	<i>A. thaliana</i>	Sequía	SBP-LIKE	Liu <i>et al</i> , 2008
miR167	<i>A. thaliana</i>	Sequía	ARF	Liu <i>et al</i> , 2008
miR168	<i>A. thaliana</i>	Sequía	AGO	Liu <i>et al</i> , 2008
miR169	<i>O. sativa/Nelumbo nucifera</i>	Sequía/ Sumersión	MtHAP2-1	Zhao <i>et al</i> , 2007; Jin <i>et al</i> , 2017
miR171	<i>A. thaliana</i>	Sequía	SCL	Liu <i>et al</i> , 2008
miR319/159	<i>A. thaliana/N. nucifera</i>	Sequía/ Sumersión	TCP/MYB	Sunkar <i>et al</i> , 2004; Liu <i>et al</i> , 2008; Jin <i>et al</i> , 2017
miR393	<i>A. thaliana, O. sativa, M. truncatula, P. vulgaris</i>	Sequía	TIR1/AFB	Sunkar <i>et al</i> , 2004; Zhao <i>et al</i> , 2007; Liu <i>et al</i> , 2008; Arenas-Huertero <i>et al</i> , 2009.
miR396	<i>A. thaliana</i>	Sequía	GRF	Liu <i>et al</i> , 2008
miR397	<i>A. thaliana, Saccharum spp.</i>	Sequía	Laccase	Sunkar <i>et al</i> , 2004; Fereira <i>et al</i> , 2012
miR398	<i>M. truncatula</i>	Sequía	CSD	Trindade <i>et al</i> , 2010
miR408	<i>A. thaliana, M. truncatula</i>	Sequía	Plastocyanin	Trindade <i>et al</i> , 2010
miR2118	<i>P. vulgaris</i>	Sequía	U170K-related	Arenas-Huertero <i>et al</i> , 2009
miR159.2	<i>P. vulgaris</i>	Sequía	Chlatriin heavy chain	Arenas-Huertero <i>et al</i> , 2009
MiR3627	<i>N. nucifera</i>	Sumersión	No determinado	Jin <i>et al</i> , 2017

Reprimidos				
miR169	<i>A. thaliana, G. hirsutum</i>	Sequía	NFY	Li <i>et al</i> , 2008; Wang <i>et al</i> , 2013
miR156	<i>O. sativa</i>	Sequía	SBP-LIKE	Zhou <i>et al</i> , 2010
miR168	<i>O. sativa</i>	Sequía	AGO	Zhou <i>et al</i> , 2010
miR172	<i>O. sativa</i>	Sequía	AP2-LIKE	Zhou <i>et al</i> , 2010
miR319	<i>O. sativa</i>	Sequía	TCP	Zhou <i>et al</i> , 2010
miR396	<i>O. sativa, P. persica</i>	Sequía	GRF	Zhou <i>et al</i> , 2010; Eldem <i>et al</i> , 2012
miR397	<i>O. sativa/ N. nucifera</i>	Sequía/ Sumersión	Laccase	Zhou <i>et al</i> , 2010; Jin <i>et al</i> , 2017
miR408	<i>O. sativa/N. nucifera</i>	Sequía/Sumersión	Plastocyanin	Zhou <i>et al</i> , 2010; Jin <i>et al</i> , 2017
miR1446 a-e	<i>P. trichocarpa</i>	Sequía	GRML	Lu <i>et al</i> , 2008
miR1447	<i>P. trichocarpa</i>	Sequía	Ankyrin repeat	Lu <i>et al</i> , 2008
miR1450	<i>P. trichocarpa</i>	Sequía	L-RTMK	Lu <i>et al.</i> , 2008
miR167b-3p	<i>N. nucifera</i>	Sumersión	LOC104585971- Callose synthase	Jin <i>et al</i> , 2017
miR171a-5p	<i>N. nucifera</i>	Sumersión	LOC104598545 -No determinado	Jin <i>et al</i> , 2017

Tabla 1: Continuación. Algunos microRNAs de respuesta a estrés hídrico identificados en plantas y sus genes blanco.

1.6 Métodos de identificación de miRNAs

Los miRNAs son reguladores post-transcripcionales clave en la respuesta a diversos tipos de estrés, y por lo tanto, se reconoce que éstos son candidatos potenciales para la manipulación genética conducente a mejorar las características de tolerancia al estrés abiótico en plantas de cultivo (Shriram *et al*, 2016). Para esto, es necesario identificar miRNAs que alteren sus niveles de acumulación o expresión en respuesta al estrés, así como predecir y validar a sus genes blanco. Desde hace más de 20 años que se describieron los miRNAs se han desarrollado métodos para identificarlos entre los cuales se encuentran métodos bioinformáticos y moleculares (Meyer *et al*, 2010).

El método bioinformático como primera aproximación es útil para identificar miRNAs y también sus blancos. El análisis *in silico* se enfoca en predicción de genes y requiere de información biológica de los miRNAs como sus propiedades de hibridarse con su mRNA blanco (Yoon y De Micheli, 2006). Sin embargo, si la predicción está basada únicamente en la información de secuencia del genoma, será posible predecir regiones genéticas que pudieran generar miRNAs, sin que esto proporcione información acerca de su acumulación en condiciones de estrés. Si la predicción está basada en secuencias diferencialmente expresadas entre las plantas bajo estrés y las tratadas de forma regular, entonces es posible obtener conclusiones sobre la identidad de los miRNAs y su acumulación en respuesta al estrés (Barrera-Figueroa *et al*, 2013).

Los chips de DNA son herramientas de biología molecular para analizar la expresión diferencial de genes y comparar genomas mediante la hibridación de DNA sobre una placa sólida (Trevino *et al*, 2006; Pritchard *et al*, 2012). Diversos estudios han empleado microarreglos para analizar la expresión de miRNAs, logrando la identificación de miRNAs de respuesta a estrés (Lang *et al*, 2011; Barciszewska-Pacak *et al*, 2015)

La secuenciación masiva es un conjunto de técnicas de biología molecular y computacional para determinar el orden de las bases nucleotídicas (dNTPs) en el DNA con la que se pueden obtener millones de secuencias (Goodwin *et al*, 2016). Estos métodos de secuenciación son de alto alcance ya que permiten la identificación rápida de miRNAs, inclusive el descubrimiento de nuevos miRNAs, y el análisis diferencial de expresión basada en la comparación de abundancia de cada miRNA específico en la muestra tratada por estrés contra la muestra control (Ha y Kim, 2014).

Existen varios métodos de secuenciación como la secuenciación SOLiD, Ion Torrent, 454, Illumina, PacBio y MinION. A continuación, se presenta el fundamento de cada uno de los métodos.

- Secuenciación por ligación, SOLiD: usa oligos parcialmente degenerados y etiquetados con una molécula que emite fluorescencia. Cuando la ligasa encuentra el sitio de ligación cataliza la unión del oligo (Voelkerding *et al*, 2009) (Figura 2).

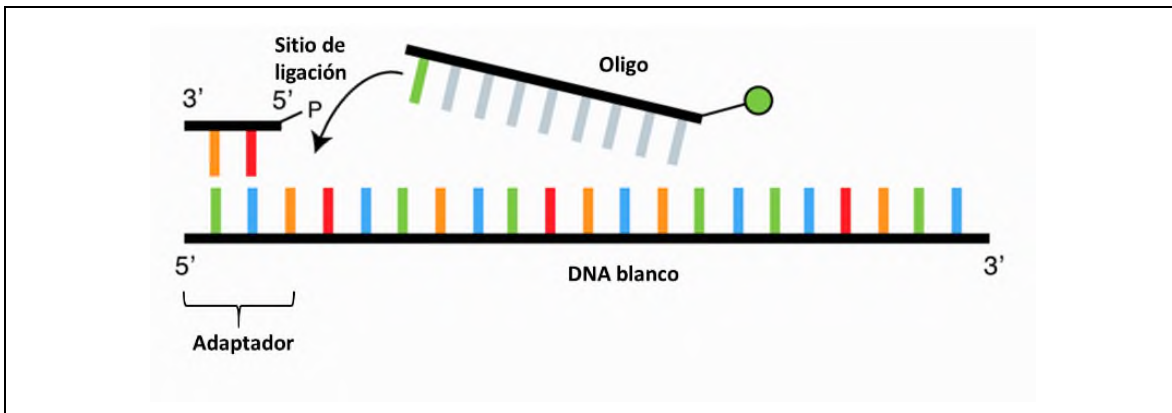


Figura 2. Esquema de secuenciación por ligación de SOLiD.

La secuencia se conoce gracias a oligos octámeros o nonámeros degenerados (modificado de Voelkerding *et al*, 2009)

- Secuenciación por síntesis, Ion Torrent: se fundamenta en la incorporación de bases nucleotídicas en cada ciclo de amplificación. Esta plataforma mide los iones H⁺ con cada dNTP incorporado resultando cambios de pH que son detectados por un sensor (Hui, 2012) (Figura 3).

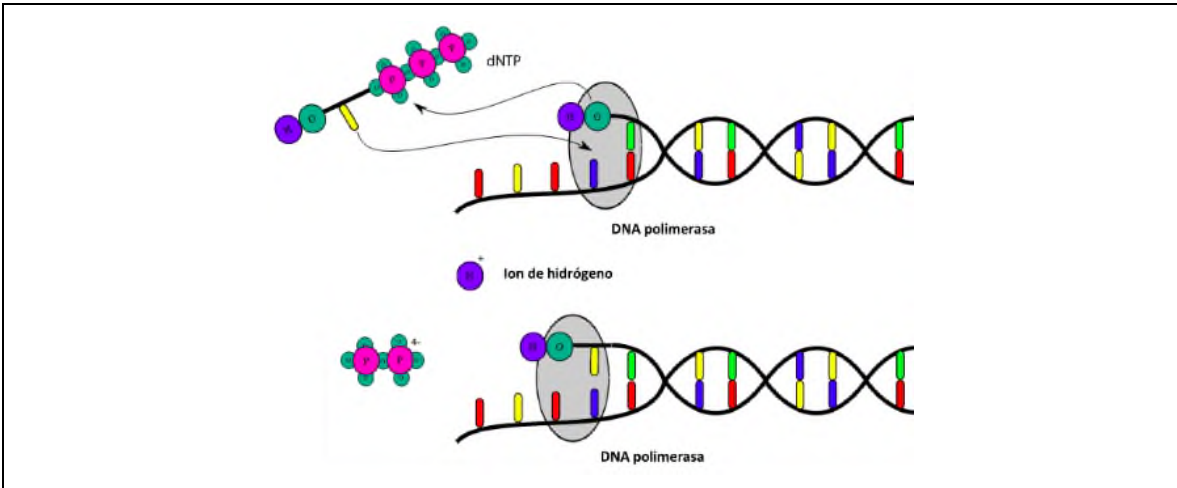


Figura 3. Esquema de secuenciación por síntesis de Ion Torrent. El orden de las bases se realiza mediante la detección de iones hidrógeno (wikipedia.org/wiki/Secuenciación_Ion_Torrent).

- Secuenciación por síntesis, 454: se basa en la incorporación de bases nucleotídicas (dNTPs) en cada ciclo de amplificación. En cada adición de dNTPs se libera una molécula de pirofosfato que se convierte en ATP. El ATP es detectado a través de la luciferasa (Metzker, 2009) (Figura 4).

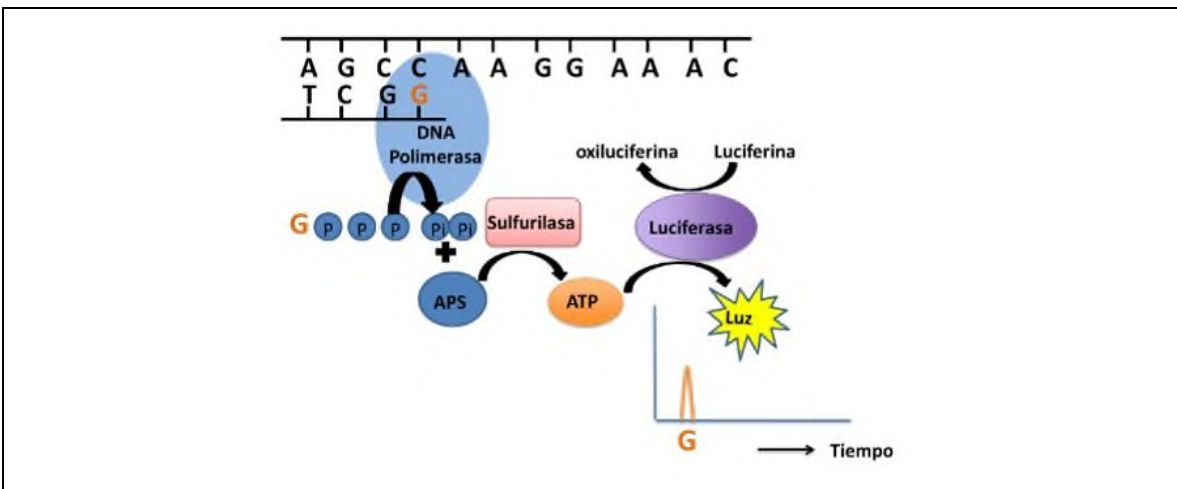


Figura 4. Esquema de secuenciación por síntesis de 454. Las bases se determinan a través del pirofosfato (modificado de genoseq.ucla.edu/action/view/Pyrosequencing).

- Secuenciación por síntesis (Illumina): se basa en la incorporación de bases nucleotídicas (dNTPs) en cada ciclo de amplificación. En cada adición de dNTPs se detecta la base incorporada ya que cada una está etiquetada con una molécula que emite fluorescencia (Metzker, 2009) (Figura 5).

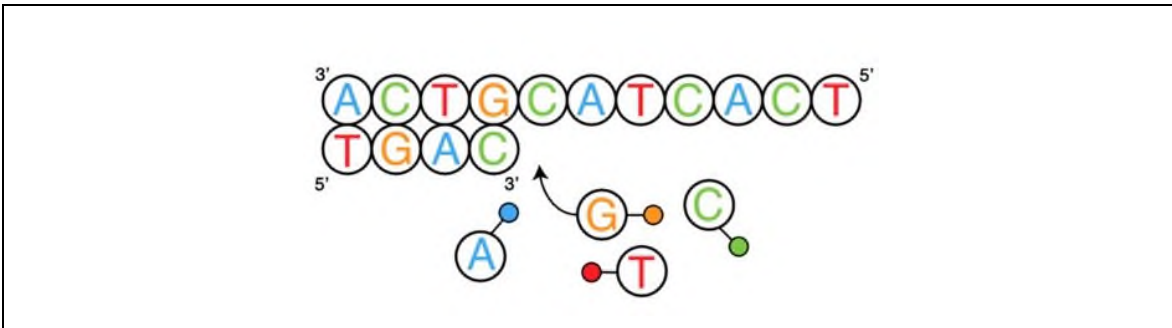


Figura 5. Esquema de secuenciación por síntesis de Illumina. El orden de las bases se realiza mediante la detección de fluorescencia de las bases nucleotídicas (modificado de binf.snipcademy.com/lessons/ngs-techniques/illumina-solexa).

- Secuenciación de una sola molécula (PacBio): ofrece la secuenciación de una molécula en tiempo real de longitud 14 kb hasta 40 kb. Una polimerasa fijada al fondo de un pozo permite la incorporación de dNTPs en una sola molécula de DNA. Los dNTPs están etiquetados con una molécula que emite fluorescencia (Metzker, 2009) (Figura 6).

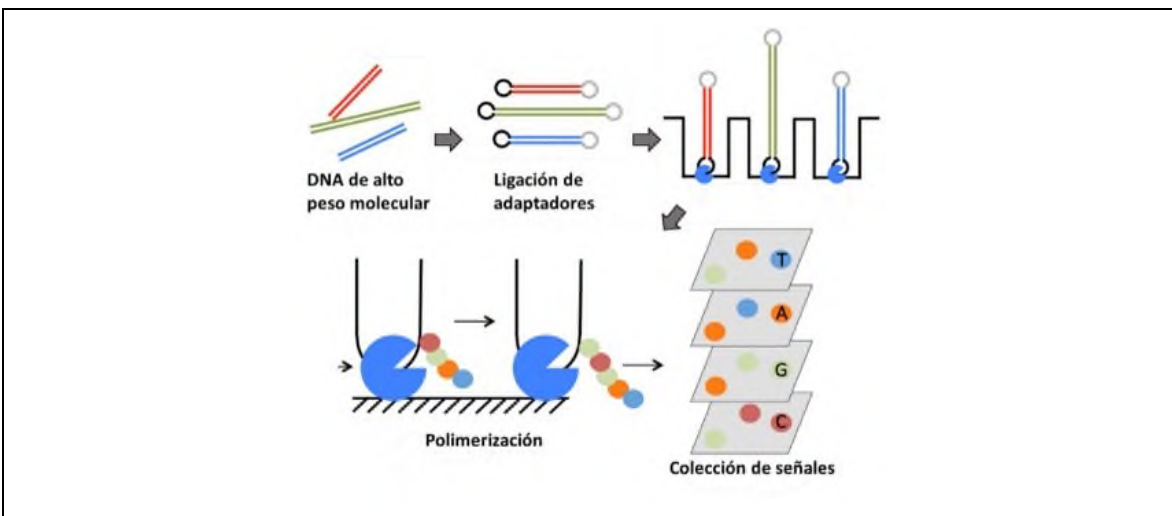


Figura 6. Esquema de secuenciación de una sola molécula de PacBio. La secuencia se conoce mediante la detección de fluorescencia de las bases nucleotídicas con una polimerasa inmobilizada (3402bioinformaticsgroup.com/service/).

- Secuenciación de una sola molécula (MinION): la secuenciación con MinION promete secuenciar DNA >100 kb a través de mediciones de corriente se poros. La preparación del DNA incluye ligar un adaptador con una proteína motor que tiene afinidad por el poro. Las mediciones se comparan con los valores de corriente de las bases nucleotídicas para obtener la secuencia (Bleidorn, 2016) (Figura 7).

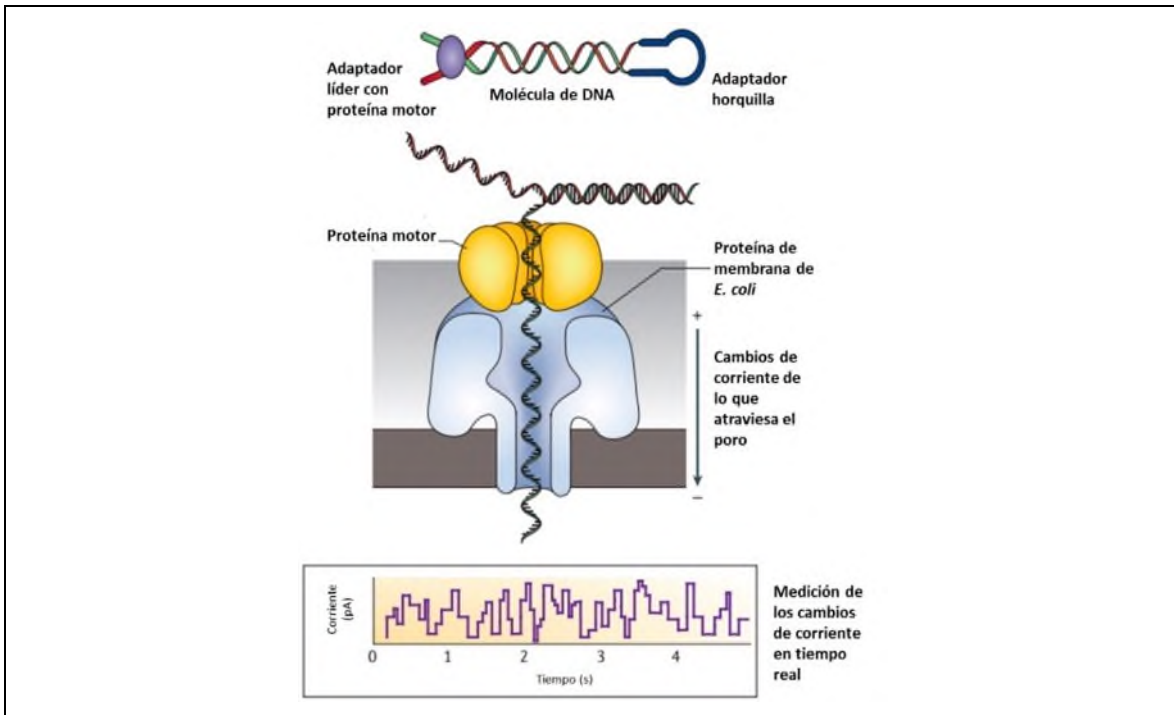


Figura 7. Esquema de secuenciación de una sola molécula de MinION. El orden de las bases se realiza mediante la detección de cambios de corriente en los poros (technologyreview.com/news/427677/nanopore-sequencing/).

No todas las estrategias de secuenciación son adecuadas para el estudio de RNAs pequeños. La de mayor uso en los últimos años es la secuenciación por síntesis de Illumina, ya que logra secuenciar la totalidad de las bases que componen al miRNA maduro y además ofrece alta profundidad de secuenciación, que se refleja en la cantidad de secuencias que se obtienen (Eminaga, 2013). Independientemente del método de secuenciación, o incluso, con el uso de microarreglos, durante la identificación de miRNAs y el análisis de su abundancia, hay muchas fuentes de variación sistemática las cuales afectan los datos introduciendo sesgos (Hwa Yang *et al*, 2002). Para minimizar el efecto de las variaciones no biológicas se hace normalización de los datos. Esto lleva a conseguir cambios biológicos verdaderos o significativos. Sin embargo, una inapropiada

normalización puede llevar a conclusiones incorrectas y por otro lado una normalización rigurosa puede llevar a la pérdida de datos biológicos significativos (Meyer *et al*, 2010). Otra finalidad de la normalización es llevar todos los valores a una misma escala lo cual confiere la misma importancia a cada uno de los valores, y esto permite comparar resultados a partir de diferentes muestras.

1.7 El maíz y el teocintle como modelos de estudio de microRNAs

1.7.1 Maíz

El maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) es una planta de la familia botánica Poaceae o Gramineae. Esta planta se originó mediante el proceso de domesticación y selección artificial que llevaron a cabo los antiguos habitantes de Mesoamérica a partir de los “teocintles”, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica (Kato, 1984; Matsuoka *et al*, 2002).

El tamaño del genoma de maíz es de 2.3 Gb y codifica más de 23,000 genes; para una comparación, el genoma humano tiene un tamaño de 3 Gb y codifica 30000 genes (Schnable *et al*, 2009). El genoma del maíz tiene una dotación cromosómica diploide presentada en 10 cromosomas ($2n= 20$) (Albert *et al*, 2010).

1.7.1.1 Importancia del maíz

El maíz es la planta monocotiledónea de cultivo más importante de México desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social en relación con los demás cereales que se producen. México es el séptimo mayor productor de maíz en el mundo y es el cultivo de mayor presencia en el país (Figura 8) (SIAP, 2013). A partir del maíz se obtiene una gran variedad de productos. Por ejemplo, tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, entre otros (HLPE, 2013).

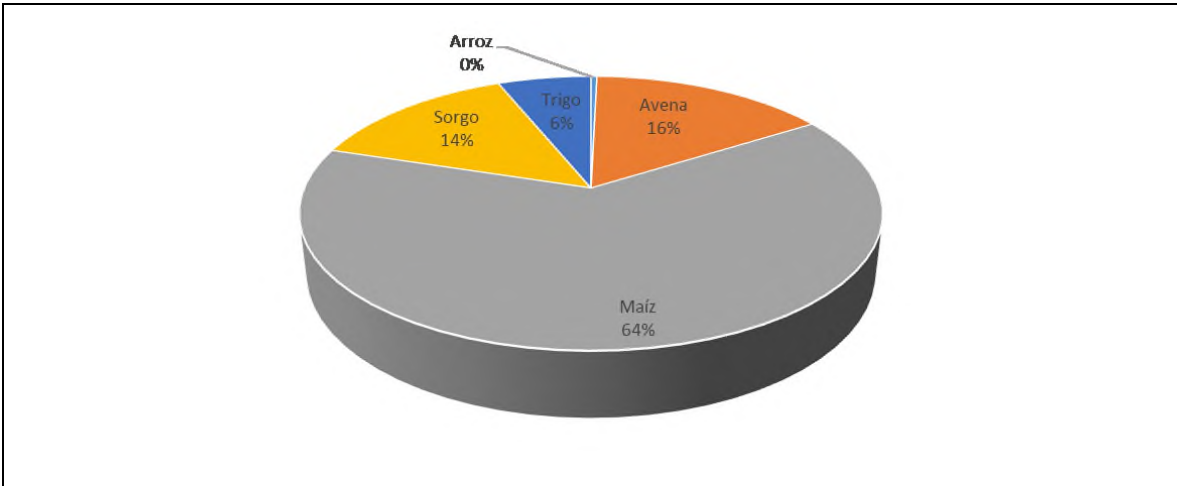


Figura 8. Producción cosechada de los principales cereales en México en el 2015. (SAGARPA, 2016).

1.7.1.2 Fenología del maíz

El maíz tiene dos etapas de desarrollo principales: la vegetativa y la reproductiva. La fase vegetativa comprende desde la emergencia del cotiledón hasta antes de emerger los estigmas. La fase reproductiva empieza con el primer estigma y termina en la madurez fisiológica cuando en la planta se observa materia seca (Figura 9).

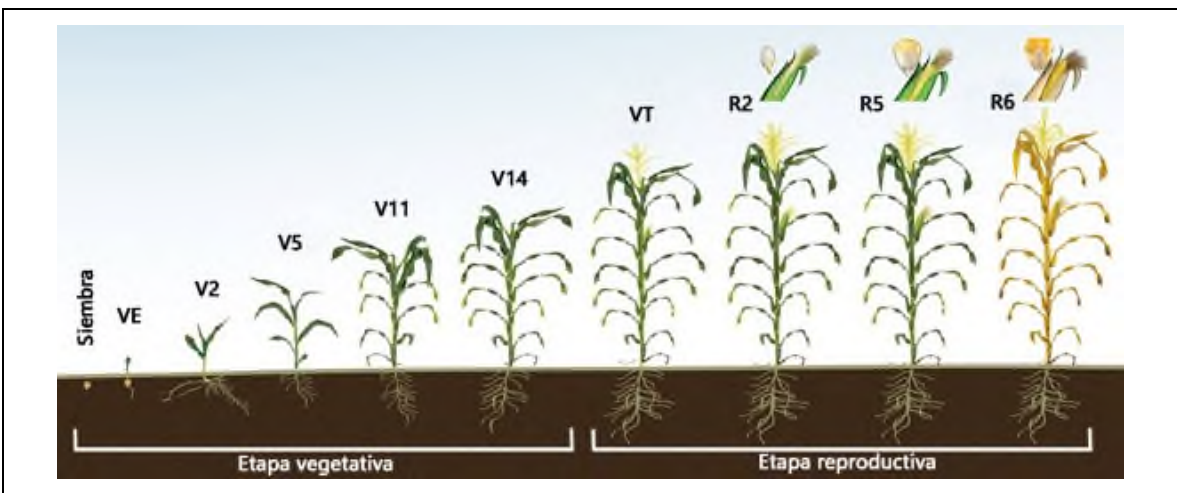


Figura 9. Fenología del maíz desde la siembra hasta la maduración del fruto. (modificado de pioneer.com/home/site/us/agronomy/library/n-uptake-corn/#).

Las etapas fenológicas del maíz se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Etapas fenológicas del maíz y sus características.

Etapa	Identificación	Características
VEGETATIVA	VE (4 días)	Etapa de emergencia, incluye la emergencia de la radícula y el brote del coleóptilo del suelo.
	V1 (7 días)	Se observa el cuello de la primera hoja. Esta hoja es redondeada de la punta las posteriores son puntiagudas.
	V2 (14 días)	Se observan dos hojas con cuello visible.
	V(n)	<i>n</i> número de hojas con cuello visible. El número de hojas antes del estigma es de 17 a 22.
	VT (65 días)	Se observa la ramificación de la espiga sin observarse estigmas.
REPRODUCTIVA	R1 (69 días)	El estigma es visible.
	R2 (82 días)	Etapa de ampolla. Los granos se llenan con un líquido claro y se puede ver el embrión.
	R3 (91 días)	Etapa lechosa. Los granos se llenan con un líquido lechoso blanco.
	R4 (100 días)	Etapa masosa. Los granos se llenan con una pasta blanca. El embrión tiene aproximadamente la mitad del ancho del grano.
	R5 (113 días)	Etapa dentada. La parte superior de los granos se llena con almidón sólido y, cuando el genotipo es dentado, los granos adquieren la forma dentada. En los tipos tanto cristalinos como dentados es visible una "línea de leche" cuando se observa el grano desde el costado.
	R6 (128 días)	Madurez fisiológica. Una capa negra es visible en la base del grano.

1.8 Teocintle

Se conoce como teocintle o teocintles a un grupo de plantas relacionadas con el maíz (*Zea spp.*). Son monocotiledóneas de la familia de Poaceae. Son plantas rústicas y silvestres, que se encuentran distribuidas desde el sur de Chihuahua, en México, hasta el suroeste de Nicaragua, pero presentan su mayor diversidad en México (Sánchez y Ruíz, 1996; Wilkes, 2004). Estas plantas son consideradas como malezas, y constituyen una fuente alterna de alimento para el ganado cuando escasea el forraje.

Los teocintles se clasifican en dos secciones junto al género *Zea*: Por una parte, los Luxuriantes, que son especies de Centroamérica (*Zea luxurians* y *Zea nicaraguensis*) y los teocintles perennes de México (*Z. perennis* y *Z. diploperennis*) (Sánchez et al, 1998; Doebley, 2004; Fukunaga et al, 2005).

Por otro lado, se tiene la sección de *Zea mays*, que está constituida por una subespecie anual de Guatemala *Z. mays ssp. huehuetenanguensis*, las subespecies de teocintles anuales de México *Z. mays ssp. mexicana*, *Z. mays ssp. parviglumis* (Figura 10) (Doebley, 1990).

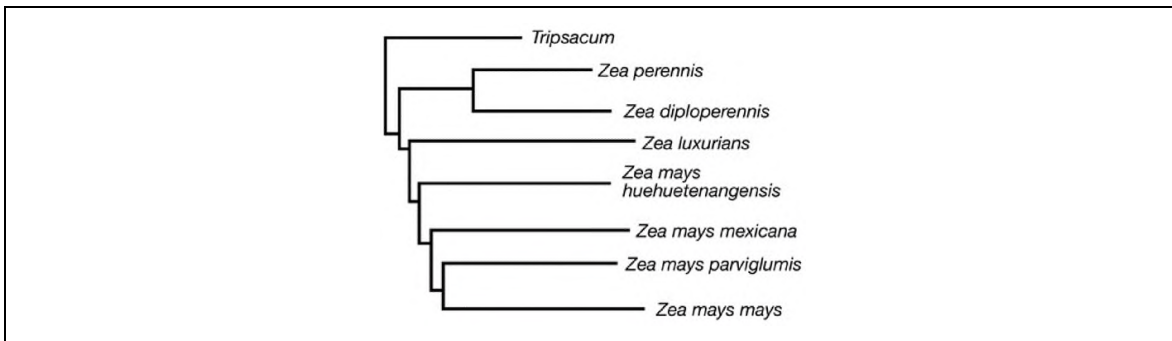


Figura 10. Clasificación del género *Zea* (Vollbrecht y Sigmon, 2005).

La relación filogenética más cercana al maíz domesticado *Zea mays mays* se establece con la subespecie *Parviglumis*, que es considerado como el ancestro más probable del maíz. En este trabajo, se seleccionamos *Z. mays ssp. parviglumis* para comparación con el maíz.

Existen evidencias que apuntan la participación del teocintle en la domesticación y dispersión temprana del maíz mediante estudios con marcadores moleculares indica que surgió de *Zea mays ssp. parviglumis*, (Dorweiler et al, 1993; Wang et al, 1999). Otros

estudios sugieren que el maíz fue domesticado de *Z. mays* ssp. *mexicana* en incluso de *Tripsacum* (Kato, 1984).

El genoma de *Z. mays* ssp. *parviglumis* no se encuentra secuenciado y se desconoce su tamaño y el número de genes. La dotación cromosómica de teocintle *Z. mays* ssp. *parviglumis* es diploide, representado en 10 cromosomas ($2n= 20$) (Albert *et al*, 2010).

1.9 Similitudes entre el maíz y teocintle *Parviglumis*

Si bien no conoce el tamaño del genoma de *Parviglumis*, se puede hacer una extrapolación para conocer su tamaño, ya que comparte con el maíz la misma dotación cromosómica. A diferencia de otras gramíneas, el maíz y teocintle tienen las inflorescencias masculinas y femeninas en lugares separados. En la etapa reproductiva la inflorescencia masculina es la espiga o panoja y se ubica en parte apical de la planta mientras la inflorescencia femenina es el jilote o mazorca y se ubica sobre el tallo de la planta (Figura 11). Las plantas de teocintle pueden presentar mayor biomasa que otras gramíneas, y su crecimiento es similar al del maíz, pero con diversas ramificaciones en las que pueden presentar ambas inflorescencias, a diferencia del maíz que solo puede presentar una sola por planta (Hernández, 1987).

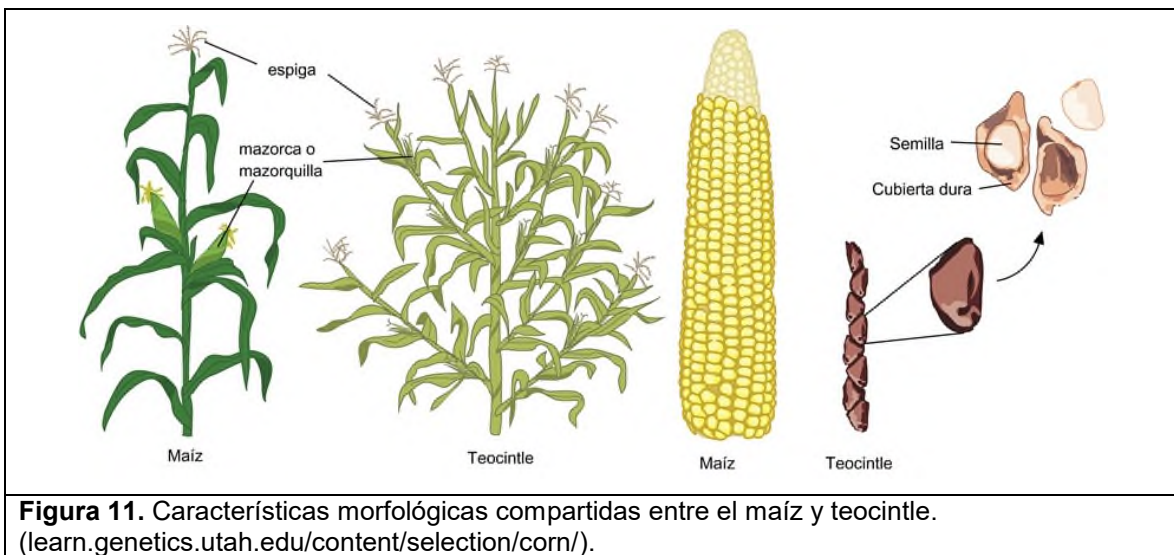


Figura 11. Características morfológicas compartidas entre el maíz y teocintle. (learn.genetics.utah.edu/content/selection/corn/).

Los teocintles de la sección de *Zea* son muy parecidos al maíz en la etapa vegetativa, lo cual dificulta distinguir las especies (Wilkes, 1967). Los teocintles se pueden cruzar con el maíz y producir descendencia fértil (Flores-Maya *et al*, 2005).

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

Por su importancia como planta de cultivo, el maíz ha sido objeto de estudio molecular en diversos trabajos para la identificación de mecanismos de respuesta al estrés. En general, se han aplicado tratamientos de estrés hídrico con duración de horas, e incluso días, en variedades estables de maíz, teocintles e híbridos. En el caso de la sequía, se han usado compuestos para simular el estrés como el polietilenglicol (Michel y Kaufmann, 1973), exposición de las raíces al ambiente (Yamaguchi-Shinozaki y Kazuo Shinozaki, 1994) y la privación de agua (Chen *et al*, 2012). En los estudios de exceso de agua se encuentran el anegamiento (Zhai *et al*, 2012) y la sumersión total o parcial de la planta (Zhang *et al*, 2008). Varios de estos estudios han permitido la identificación de miRNAs, como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. miRNAs con expresión diferencial en experimentos de estrés hídrico en maíz.

microRNA	Tratamiento	Regulación	Blanco	Función	Referencia
miR171	Déficit	-	SCL1	Desarrollo de hojas y brotes	Kong <i>et al</i> , 2010
miR393	Exceso	-	TIR1	Receptor de auxinas y formación de raíces	Li <i>et al</i> , 2013; Zhai <i>et al</i> , 2013
miR164	Exceso	-	NAC1	Señalización de auxinas	Li <i>et al</i> , 2013
miR164	Déficit	+	NAC1	Señalización de auxinas	Kong <i>et al</i> , 2010
miR167	Exceso	-	ARF	Respuesta auxinas y formación de raíces	Li <i>et al</i> , 2013; Zhang <i>et al</i> , 2008; Zhai <i>et al</i> , 2013; Liu <i>et al</i> , 2012
miR156	Exceso	-	SLP/miR172	Desarrollo de tejidos y transición de etapas	Li <i>et al</i> , 2013
miR156	Déficit	+/-	SLP	Desarrollo de tejidos y transición de etapas	Jing-sheng <i>et al</i> , 2013
miR156	Déficit	+	SLP	Desarrollo de tejidos y transición de etapas	Kong <i>et al</i> , 2010
miR172	Exceso	-	AP2/ERF	Desarrollo de tejidos y transición de etapas	Zhai <i>et al</i> , 2013
miR172	Exceso	+/-	AP2/ERF	Desarrollo de tejidos y transición de etapas	Liu <i>et al</i> , 2012
miR166	Déficit	+	PHABULOSA/ HD ZIP III	Morfogénesis y desarrollo de hojas, desarrollo vascular y formación de órganos	Kong <i>et al</i> , 2010
miR166	Exceso	-	HD-ZIP III	Morfogénesis y desarrollo de hojas, desarrollo vascular y formación de órganos	Li <i>et al</i> , 2013
miR168	Exceso	-	AGO1	Silenciamiento de genes	Li <i>et al</i> , 2013
miR528	Exceso	+	Cupredoxinas	Respuesta de oxidación y prevención de daño celular	Li <i>et al</i> , 2013; Liu <i>et al</i> , 2012
miR159	Exceso	-/+	AGAMOUS	Desarrollo floral	Zhang <i>et al</i> , 2008
miR408	Exceso	+	Cupredoxinas	Respuesta de oxidación y prevención de daño celular	Liu <i>et al</i> , 2012
miR319	Déficit	+/-	TCP	Proliferación celular	Jing-sheng <i>et al</i> , 2013

1.11 Relación entre sequía e inundación

Adicionalmente a la complejidad de la respuesta al estrés, se ha observado que varios elementos moleculares de respuesta se inducen de forma común ante el estrés hídrico, ya sea por déficit o por exceso de agua. Por ejemplo, en estudios realizados en plantas de arroz bajo inundación se observó la inducción de genes que eran típicamente reconocidos por participar en la respuesta a la deshidratación. En dicho estudio, se reportó que SUBMERGENCE 1A (SUB1A), un factor de transcripción de la familia APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF, por sus siglas en inglés) actúa tanto en la sumersión como en la sequía (Fukao, *et al*, 2011). Por otra parte, en plantas de girasol se demostró que HaWRKY76, un factor de transcripción divergente confiere tolerancia a la sequía moderada y la inundación (Raineri *et al*, 2015).

Esto sugiere la posibilidad de que existan más elementos moleculares con funciones comunes, independientemente del tipo de estrés de que se trate y que, a pesar de parecer estreses opuestos, la sequía y la inundación podrían compartir mecanismos moleculares de respuesta similares. De acuerdo a los trabajos en arroz y en girasol, los elementos que conectan las dos respuestas son factores de transcripción. Al ser factores de transcripción los blancos más comunes de los miRNAs, es probable que el punto de entrecruzamiento de ambas respuestas se encuentre al nivel de los miRNAs.

2. Justificación

Siendo el maíz uno de los granos de mayor importancia para la alimentación humana es necesario aportar conocimientos de regulación en la respuesta al estrés por sequía e inundación mediante el estudio molecular dentro de su género incluyendo a sus antecesores comunes como es el teocintle. A pesar de ser plantas relacionadas y de tener gran similitud, el maíz y el teocintle poseen diferencias en su capacidad para tolerar el estrés abiótico. Para comprender estas diferencias y explorar el potencial de usar al teocintle para el mejoramiento del maíz, es necesario investigar mecanismos de tolerancia al estrés que pudieran haberse perdido durante el proceso de domesticación del maíz e identificar a los elementos moleculares implicados. La ventaja de comparar la respuesta molecular entre el maíz y el teocintle es que existe un gran potencial de identificar expresión común y/o expresión específica que permitan a la planta responder al estrés por déficit o exceso de agua.

Por otra parte, debido a la función central que desempeñan los miRNAs en la regulación de la expresión génica, es importante explorar su participación como conectores de las rutas de respuesta al estrés, tanto por déficit como por exceso de agua. Lograr la identificación de miRNAs integradores será el primer paso para proponer estrategias de mejoramiento simultáneo de la tolerancia a la sequía y a la inundación, que encuentren aplicación en un futuro.

3. Hipótesis

Existen miRNAs que actúan como integradores comunes en la respuesta a la sequía y la inundación en teocintle y en maíz.

4. Objetivo general

Identificar miRNAs que actúan como integradores comunes en la respuesta a la sequía e inundación en teocintle y maíz.

4.1 Objetivos específicos

1. Identificar miRNAs nuevos y conservados en teocintle y maíz.
2. Analizar la población de miRNAs expresados en teocintle y maíz bajo el estrés hídrico para identificar nodos regulatorios comunes en la respuesta a sequía e inundación.
3. Comparar la expresión de miRNAs en respuesta a la sequía e inundación teocintle y maíz.

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

Las especies vegetales estudiadas en este trabajo fueron teocintle y maíz. Las semillas fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el caso del teocintle, y por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en el caso del maíz. Sus características generales se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Información general del material vegetal empleado en este trabajo

Nombre común	Nombre científico	Variedad	Institución de origen
Teocintle	<i>Z. mays ssp. parviglumis</i>	<i>Parviglumis</i>	Dr. Flavio Aragón (INIFAP-Valles Centrales, Oaxaca)
Maíz	<i>Z. mays ssp. mays</i>	CML 496	Dr. Axel Tiessen Favier (CINVESTAV-Irapuato)

Inicialmente, las semillas obtenidas se germinaron y se sembraron para generar más semillas. La germinación se llevó a cabo dentro de una caja Petri, de la siguiente manera: se extendió en la base la caja de Petri un poco de algodón y se agregó agua destilada hasta empapararlo. Se colocaron 35 semillas de teocintle sobre el algodón, orientando el endospermo para que estuviera en contacto con el algodón. Se colocó la tapa de la caja Petri y las semillas fueron expuestas a condiciones de fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Después de 3 días emergió el cotiledón y a los 5 días fueron sembradas en tierra dentro de un área con malla sombra para propagación de semillas (Figura 12).

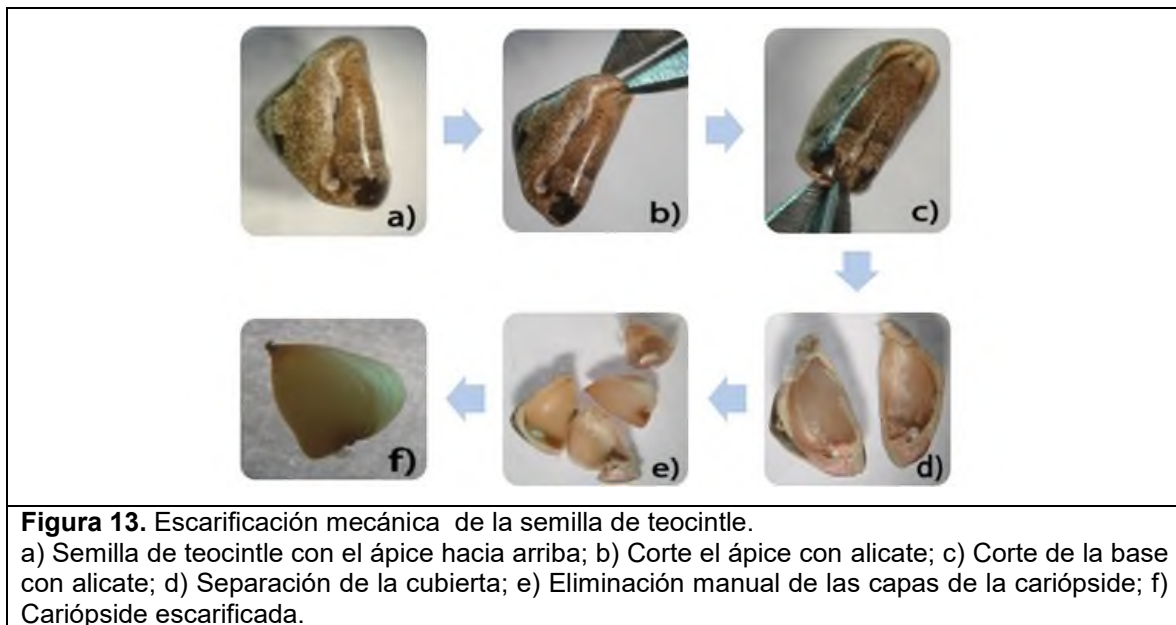


Figura 12. Germinación de las semillas de teocintle en caja de Petri.

Para la siembra en malla sombra se aflojó la tierra y se hicieron surcos, se agregó fertilizante (Triple 17 plus XTreme 100 g/m²) y se mantuvo la irrigación diaria por las mañanas durante el crecimiento de las plantas. En la etapa de floración (80 días desde la siembra) las plantas sincronizaron la panoja y mazorca. Se hizo una polinización manual por cruzamiento lo cual implica recolectar el polen de una planta y agregarlo al jilote de otra planta.

5.2 Escarificación de las semillas de teocintle

Las semillas de teocintle poseen una testa que dificulta la germinación, por lo que es necesario separarla mecánicamente. La separación de la cubierta se realiza con ayuda de un alicate o pinzas de corte. En la Figura 13 se describe paso a paso la escarificación de la semilla de teocintle.



5.3 Establecimiento de condiciones experimentales y tratamientos de estrés.

Los experimentos de sequía e inundación en teocintle y maíz se realizaron en un cuarto de crecimiento de condiciones ambientales controladas (temperatura 23 °C, fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad). Para el crecimiento se empleó como sustrato la mezcla Sunshine #3 adicionado con perlita mineral en relación 3:1. La mezcla se esterilizó a 121 °C durante 1 h. Después de esperar a que el sustrato alcanzara la temperatura ambiente se agregó fertilizante 15N-5P-20K (Nitrofoska Perfect). La cantidad de fertilizante fue 2% en peso de sustrato, e.g. a 100 g de sustrato se le agregaron 2 g de fertilizante.

El siguiente paso fue mezclar e hidratar el sustrato con agua. Para la mezcla preparada aproximadamente 300 g de sustrato se hidrató con 600 mL de agua, suficiente para que no hubiera drenado y no quedara seco el sustrato.

En todos los experimentos se realizó un registro de peso en los tratamientos de estrés hídrico pesando las macetas con el sustrato. El sustrato tiene una densidad menor que el agua lo que ocasiona que las macetas del tratamiento de inundación floten. Para evitar esto se añadió peso a todas las macetas incluyendo el tratamiento de sequía. Se usaron macetas de 12 cm de diámetro y 11 cm de altura con un peso aproximado de 50 g se agregaron 50 g de piedras al fondo y posteriormente se taró. Se agregó el sustrato hasta 200 g de peso. Posteriormente se sembraron 5 semillas de maíz por maceta con una profundidad de 3-5 cm.

Se realizaron pruebas de resistencia que permitieran conocer los tiempos de tratamiento adecuados para alcanzar el estrés fisiológico en las plantas sin dañarlas irreversiblemente. Para este ensayo se emplearon plántulas en la etapa V2 o 12 a 14 días después de la siembra (dds) y se tomaron en cuenta las siguientes condiciones para seleccionar niveles de estrés adecuados:

- Sobrevivencia de la planta después del tratamiento.
- No perder o dañar órganos.

En inundación se hicieron pruebas de resistencia sumergiendo las plántulas en agua aplicando diferentes tiempos de estrés. Al finalizar el tiempo de estrés, se les permitió a las macetas llegar al peso del control, lo que requirió no aplicar agua durante cinco días, y entonces se continuó el riego para su adaptación mientras se evaluaba el porcentaje de sobrevivencia. Para el caso de la sequía, a las plántulas se les suspendió el suministro de agua por diferentes tiempos, al término de los cuales se agregó agua nuevamente para recuperar su estado fisiológico normal. En ambos casos, se registró el porcentaje de supervivencia al término de los experimentos.

Una vez que se determinaron los tiempos de estrés adecuados, se estableció el sistema experimental de estrés de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones experimentales de tratamiento.

Especie	Tratamiento	Identificación de la muestra	Descripción del tratamiento
Teocintle	Control	PC	Hidratación diaria de las macetas
	Sequía	PS	Restricción de agua para la macetas
	Inundación	PI	Sumersión de la macetas en agua
	Sequía-inundación	PSI	Restricción de agua seguido de sumersión de las macetas
	Inundación-sequía	PIS	Sumersión seguido de restricción de agua de las macetas
Maíz	Control	MC	Hidratación diaria de las macetas
	Sequía	MS	Restricción de agua para la macetas
	Inundación	MI	Sumersión de la macetas en agua

Las macetas fueron etiquetadas para cada uno de los tratamientos después de la etapa vegetativa V1. Se retiraron las macetas en las cuales no emergieron 3 plántulas y aquellas en las que emergieron más de 3. Cada tratamiento quedó con 3 plántulas por maceta y por triplicado (de igual forma se realizaron las pruebas de resistencia preliminares). Las macetas se enumeraron y se usaron números al azar para agrupar las macetas por tratamientos para cada variedad. Después de aleatorizar los números usando la función rand() de PERL, se tomaron en grupo de 3 para ir asignándolos a los tratamientos en el mismo orden de la Tabla 5.

Las macetas fueron irrigadas hasta el peso inicial mientras alcanzaban la etapa V2. Los tratamientos se realizaron una vez que se determinó el tiempo y grado para inducir niveles de estrés. El tratamiento de sequía consistió en dejar de agregar agua a las macetas para conocer el tiempo de vida de las plantas sin agua. El experimento de inundación se realizó en un contenedor de agua de 110 L con un área aproximada de 0.4 m² (Figura 14). Las

macetas con las plántulas fueron puestas dentro de la tina y se manejó el llenado agregando 6 cm de agua potable (aprox. 21 L) cada 2 h hasta cubrir las plántulas. Se manejaron 3 tiempos de sumersión. Las macetas se retiraron del contenedor al cumplir el tratamiento para evaluar su recuperación en condiciones normales de crecimiento omitiendo el riego de agua, con el fin de saber el tiempo que tardan en llegar al peso de las macetas de control.



En el tratamiento de inundación-sequía, las plantas se mantuvieron durante dos días en inundación dentro del contenedor, se retiraron para drenar el agua hasta que las macetas llegaron al peso medio de 100 g.

Las plántulas del tratamiento seriado sequía-inundación no se irrigaron hasta que tuvieron el peso medio de las macetas de control y se mantuvieron por 6 días agregando pequeñas cantidades de agua. Después ese tiempo en sequía las plantas fueron tratadas en inundación por dos días.

5.4 Sincronización de los tratamientos

Con la finalidad de establecer un tiempo único de muestreo al final del experimento, que permitiera la comparación entre los tratamientos individuales y secuenciales, se diseñó la línea de tiempo que se muestra en la Figura 15. Las macetas de control se mantuvieron en el peso inicial de 200 g mediante el riego constante. En las macetas del tratamiento de sequía se suspendió el riego hasta que alcanzaron la mitad del peso inicial entonces se reanudó el riego en pequeñas cantidades para que se mantuvieran en ese peso hasta que

finalizó el experimento. Las plantas del tratamiento de inundación se mantuvieron en irrigación y se inició el estrés por inundación justo dos días antes de finalizar el experimento.

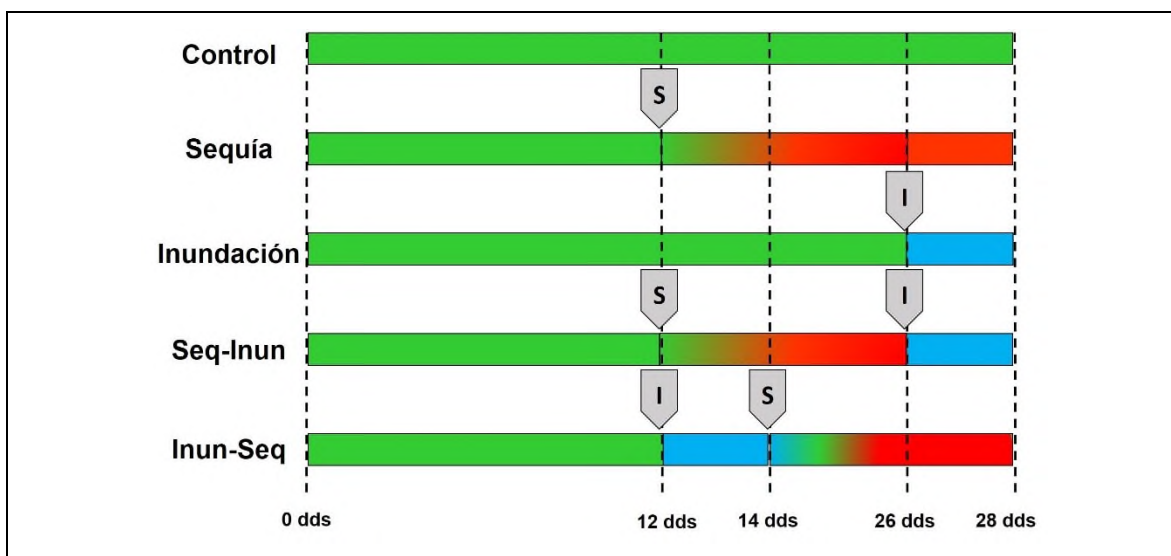


Figura 15. Línea de tiempo de los tratamientos aplicados a las plantas. Los colores indican peso total de las macetas. La letra "S" dentro del pentágono gris indica el inicio del estrés por sequía y la letra "I" indica el inicio del estrés por inundación.

En el tratamiento seriado sequía-inundación, las plantas llevaron un estrés por sequía y después un estrés por inundación, por lo tanto, las plantas antecedidas por el tratamiento de sequía fueron sumergidas en agua dos días antes de terminar el experimento.

Cuando las plantas del tratamiento de inundación-sequía alcanzaron la etapa V2 se inició el estrés por inundación sumergiendo las plantas durante dos días. Al finalizar el estrés por inundación se comenzó con el estrés por sequía, donde las plantas fueron excluidas del riego hasta que alcanzaron el peso de 100 g (26 dds) y se mantuvo en ese peso hasta finalizar el experimento. Cuando se alcanzó el peso de 100 g se inició el estrés por inundación en los tratamientos de inundación y sequía-inundación con dos días de sumersión (28 dds).

5.5 Parámetros fisiológicos de estrés

Para determinar el efecto y nivel del estrés en las plantas, se realizaron mediciones de parámetros fisiológicos. Para esto se destinó un grupo reservado de plantas que fueron tratadas simultáneamente, pero no se emplearon para los análisis moleculares.

5.5.1 Contenido relativo de agua

Se midió el contenido relativo de agua tomando una muestra de la segunda hoja de planta y se pesó para conocer su peso fresco (Pf). La muestra fue enseguida sumergida en agua desionizada en un tubo de 15 mL durante 24 h y se mantuvo en movimiento para permitir la hidratación total del tejido. Al término se sacó del agua, se secó suavemente con un papel absorbente para eliminar la humedad superficial y se pesó, obteniendo el peso turgente (Pt). Posteriormente, la muestra se secó en un horno a 70 °C por 48 h. Finalizado el tiempo se registró el peso seco de las muestras (Ps). Con las tres mediciones de peso, se calculó el contenido relativo de agua empleando la Ecuación 1 (Barrs y Weatheley, 1968):

$$\text{CRA} = [(Pf-Ps) / (Pt-Ps)] \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

donde Pf es peso fresco, Pt es peso turgente y Ps es peso seco.

Además del registro al momento de finalizar el estrés, la medición del CRA se llevó a cabo en las plantas después de 24 h de haber sido rehidratadas.

5.5.2 Coeficiente de tolerancia de anegamiento (CTA)

La tolerancia a la inundación se calculó con el coeficiente de tolerancia de anegamiento. El CTA es reportado para el anegamiento, sin embargo, en este trabajo se ajustó para medir la tolerancia a la inundación total de las especies de teocintle y maíz. El CTA de las plantas se calculó usando la Ecuación 2 (Qiu *et al*, 2007):

$$\text{CTA} = V_p \text{ de las plantas en tratamiento} / V_p \text{ de las plantas en control} \quad \text{Ec. 2}$$

donde Vp de las plantas es el valor promedio de la sumatoria de la altura del tallo, longitud de la raíz, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz.

La altura de la planta se midió desde la base de la planta al nivel del sustrato hasta la punta de la penúltima hoja. La raíz a la planta se midió después de haber sacado la planta de la maceta y haber retirado el sustrato con abundante agua. La planta se colocó en una superficie para hacer la medición desde el inicio de la raíz en el tallo hasta la punta de la

raíz más larga. La raíz y la parte aérea se separaron, se pusieron a secar durante 24 h a 72 °C y se pesaron al finalizar el secado.

5.6 Colecta del tejido vegetativo

Las plantas destinadas al análisis molecular se colectaron al finalizar el experimento de estrés hídrico. Cada maceta contenía 3 plantas, a las cuales les cortó la parte aérea 1 cm por encima del sustrato en el tallo, inmediatamente se envolvió en aluminio previamente etiquetado con la información de la muestra y se colocó en nitrógeno líquido. Al finalizar, todas las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el siguiente paso de extracción de RNA.

5.7 Extracción de RNA total

Previo a la extracción de RNA, las muestras se pulverizaron en mortero con el uso de nitrógeno líquido en condiciones de baja temperatura. El polvo se mantuvo congelado y se colocó en porciones de aproximadamente 100 mg en tubos de 1.5 mL. Las muestras se emplearon inmediatamente para la extracción de RNA o se almacenaron a -80 °C.

La extracción de RNA se realizó con el reactivo trizol (Invitrogen, 15596018), siguiendo las indicaciones de uso. Brevemente, se partió de 100 mg de muestra vegetal triturada en un tubo de 1.5 mL a -80 °C. Se agregó 1 mL de trizol y se homogenizó en el vortex. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó manualmente por 15 s. Se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo de 1.5 mL. A la fase acuosa se agregó 1 mL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Enseguida se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar por 1 min. Se agregó 1 mL de etanol 75% y se agitó en el vortex. Se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante, dejando secar la pastilla por 5 min. La pastilla se resuspendió en agua con DEPC y se almacenó a -80 °C.

Las réplicas (3 macetas por tratamiento, con 3 plantas cada una) se manejaron como unidades experimentales individuales. Se cuantificó la extracción de RNA total con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se verificó la integridad del RNA total mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1% (Anexo 1). Se colocó 1 µL de RNA total más 3 µL de agua DEPC en un tubo de 0.2 mL y se mezclaron con 1 µL de

amortiguador de carga 5X para RNA (Anexo 1). Enseguida se incubaron a 65 °C en un termobloque durante 5 min. Al término, los tubos se transfirieron rápidamente del termobloque al hielo. Después de 2 min en hielo, las muestras se centrifugaron para coleccionar cualquier líquido de condensación en las paredes del tubo. Las muestras se cargaron en carriles del gel de agarosa 1% y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal a 60 V por 1 h, empleando buffer MOPS 1X (Anexo 1) como solución de corrida. La imagen del gel se adquirió en el fotodocumentador (Ingenius LHR Syngene) mediante el programa GeneSnap.

5.8 Construcción de bibliotecas

5.8.1 Fraccionamiento y purificación de RNAs pequeños

La separación de la fracción de RNAs pequeños de 20-30 nt se realizó en un gel de acrilamida al 15%, en condiciones desnaturizantes (Anexo 1), de 18 x 16 cm. Para cada tratamiento se hizo una mezcla que contenía 4 µg de RNA total de cada triplicado, para dar un total de 12 µg por muestra. Los 12 µg de RNA total de los triplicados fueron resuspendidos en 12 µL de agua DEPC para lograr una concentración de 1 µg/µL. A esa dilución se le agregó 12 µL de amortiguador GLB II (Ambion, 8546G), se mezcló y se incubaron a 65 °C durante 5 min. Al finalizar la desnaturización los tubos, se transfirieron al hielo. Después de 2 min en hielo, las muestras se centrifugaron para coleccionar cualquier líquido de condensación en las paredes del tubo. El peso molecular que se usó como referencia para la fracción entre 20 y 30 nt fue una mezcla con cantidades iguales de los adaptadores de RNA los cuales fueron LINKER1 22 nt y ADAPTER RA5 26 nt. Una vez solidificado, el gel se colocó en una cámara de electroforesis vertical (Hoefer, SE600XCROMA) y se agregó TBE 1X (Anexo 1) como amortiguador de corrimiento. Con 15 pozos disponibles en el gel para cargar las muestras, se permitió cargar el peso molecular en el primer pozo para dejar enseguida un pozo vacío entre las muestras de RNA total de los tratamientos. Antes de cargar las muestras, los pozos fueron lavados con una jeringa nueva llenado el émbolo con amortiguador TBE 1X e inyectando la solución en el pozo. Esta acción se repitió cuantas veces fue necesario para eliminar la mayor cantidad de sales en los pozos. La corrida se llevó a cabo a 220 V durante 5 h. El gel fue teñido durante 5 min en una solución de bromuro de etidio con agua DEPC, y después se colocó

sobre una película de plástico y se llevó al fotodocumentador. Con ayuda del peso molecular y el barrido del RNA total, se trazó una línea para cortar la fracción de RNA entre 20 y 30 nt de cada muestra por separado. Los fragmentos del gel se cortaron y se colocaron en tubos de 0.5 mL que previamente se perforaron con la aguja de la jeringa de lavado, estos se insertaron en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 10,000 g por 3 minutos. Eso permitió triturar el gel para continuar con la precipitación de RNAs pequeños.

5.8.2 Precipitación de RNAs pequeños

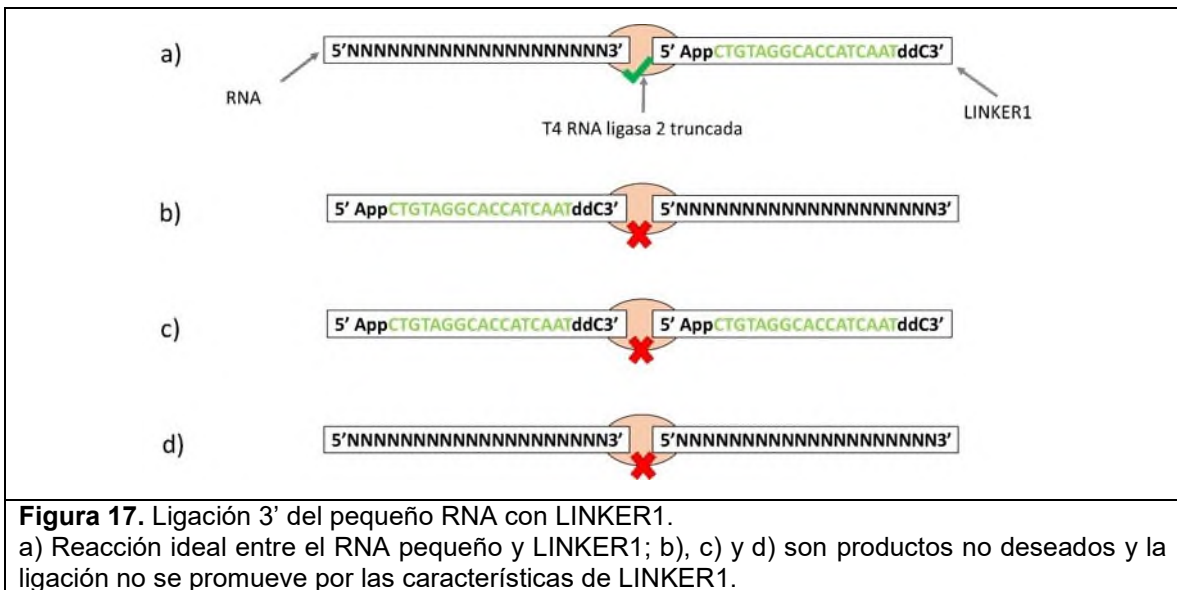
Al gel triturado se agregó dos volúmenes de NaCl 0.4 M y se llevó al vortex por 10 min. Se mantuvo a 8 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 g por 1 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL evitando arrastrar gel. Al sobrenadante se agregó acetato de sodio 3 M en una décima parte del volumen del sobrenadante, 3 µL de glicógeno (Ambion, AM9510) y 1 mL de etanol absoluto. Se mezcló por inversión y se llevó a -80 °C por 2 h. Al término se centrifugó a 12 000 g por 20 min a 4 °C, y se drenó el líquido para separarlo de la pastilla. A la pastilla se agregó 1 mL de etanol al 80 % en agua DEPC para lavar. Enseguida se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4 °C y se descartó el líquido por decantación. La pastilla se dejó secar por 5 minutos y se agregó 7 µL de agua con DEPC para resuspenderla. Al término se procedió a la ligación del adaptador en el extremo 3' de los RNAs purificados.

5.8.3 Ligación del adaptador 3'.

La fracción de pequeños RNAs recuperados fue ligada al adaptador LINKER1 (Integrated DNA Technologies, linker 1) (Anexo 2) Este adaptador tiene el extremo 5' preadenilado y el extremo 3' bloqueado por dideoxicitidina. La presencia del extremo preadenilado en el adaptador, y la presencia de extremos 3'OH libres en los RNAs pequeños los convierte en sustratos de la T4 RNA ligasa 2 truncada (NEB, M0242L). Esta ligasa no requiere ATP libre y se garantiza la ligación favorecida del extremo 5' del adaptador a un extremo 3' de RNA y no la ligación entre moléculas de RNA (Figura 16).



Esto permitió tener un control de productos indeseados entre el mismo adaptador o la ligación del extremo 3' del adaptador con el extremo 5' del RNA (Figura 17).



Las reacciones de ligación del adaptador 3' se prepararon como se describe en las Tablas 6 y 7, empleando tubos de 0.2 mL.

Tabla 6. Preparación de reacciones de ligación 3'.

Componentes	Cantidad (µL)
Pequeños RNA purificados	5
LINKER1 (1 µM)	1
Total	6

Las reacciones se incubaron a 70 °C por 2 min en el termociclador, luego se colocaron en hielo y se agregaron los componentes de la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de reacciones de ligación 3'.

Componentes	Cantidad (µL)
Buffer 10X T4 RNA ligasa 2 truncada	1
DMSO	1
Inhibidor de RNA nucleasa	1
T4 RNA ligasa 2 truncada	1
Total	4

Las reacciones se incubaron a 28 °C por 1 h en termociclador.

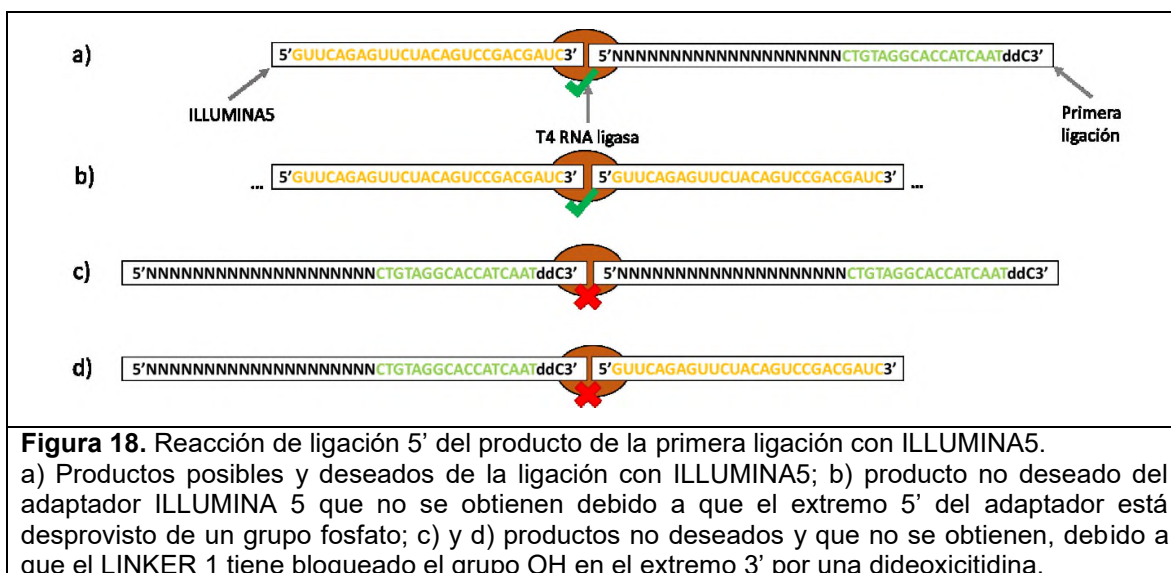
5.8.4 Purificación de productos de la primera ligación

Se preparó un gel de acrilamida 15% desnaturalizante 18 x 16 cm, donde se cargaron las reacciones de ligación y se corrieron a 220 V durante 5 h. Como peso molecular de referencia se usó una mezcla con cantidades iguales de Bridge RT con 39 nt y el index 4 de 47 nt. Se cortó el gel usando las bandas del peso molecular para los productos de ligación con aproximadamente 38-48 nt. Se trituró el gel en tubos con centrifugación y se continuó con el mismo método de precipitación de RNAs pequeños que se indica en la sección 5.8.2. La pastilla obtenida se resuspendió en 8.6 µL de agua con DEPC y se continuó con la ligación del adaptador 5'.

5.8.5 Ligación del adaptador 5'.

El adaptador ILLUMINA5 (RA5) (Anexo 2) es una secuencia de RNA, cuya ligación es dependiente de ATP para unir su extremo 3' con el extremo 5' de los productos de la primera ligación. En esta reacción se evita la obtención de productos indeseados adaptador-

adaptador de RNA debido a que su extremo 5' no está fosforilado, y por lo tanto no pueden formarse este tipo de estructuras en tándem (Figura 18).



Las reacciones de ligación del adaptador 5' se prepararon como se describe en las Tablas 8 y 9, en tubos de 0.2 mL, empleando T4 RNA ligasa 1 (Ambion, AM2141).

Tabla 8. Preparación de reacciones de ligación 5'.

Componentes	Cantidad (µL)
Producto de primera ligación	8.6
Adaptador ILLUMINA5 (1µM)	1
Total	9.6

Se llevó a 70 °C por 2 min en el termociclador, luego se colocó en hielo y se agregaron los componentes de la Tabla 9.

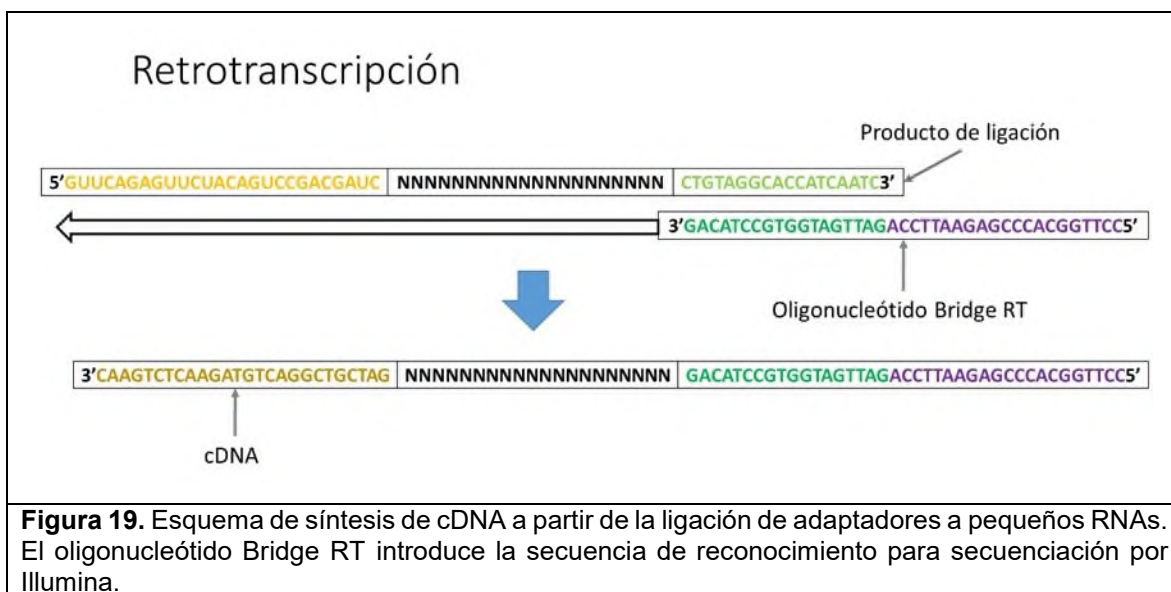
Tabla 9. Preparación de reacciones de ligación 5' (continuación).

Componentes	Cantidad (µL)
Buffer 10X T4 RNA ligasa 2	1.4
Inhibidor de RNA nucleasa	1
DMSO	1
T4 RNA ligasa 2	1
Total	14

Las reacciones se incubaron a 28 °C por 1 h en el termociclador.

5.8.6 Síntesis de DNA complementario.

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo empleando el oligonucleótido BRIDGE RT (Anexo 2), el cual está diseñado para introducir la secuencia de reconocimiento que es empleada por la plataforma Illumina durante la secuenciación (Figura 19).



Las reacciones de síntesis de cDNA se prepararon como se describe en las Tablas 10 y 11, en tubos de 0.2 mL, empleando la retrotranscriptasa MMuLV (ThermoScientific, N8080018).

Tabla 10. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA

Componentes	Cantidad (µL)
Producto de ligación	6
Bridge RT (1µM)	1
Total	7

Las reacciones se incubaron a 70 °C por 2 min, luego se pasaron al hielo para después agregar los componentes de la Tabla 11.

Tabla 11. Preparación de reacciones de síntesis de cDNA (continuación).

Componentes	Cantidad (µL)
Buffer 10X MMuLV	1
dNTPs (10 mM)	0.5
Inhibidor de RNAsa	0.5
Retrotranscriptasa MMuLV	1
Agua DEPC	2.5
Total	12.5

Las reacciones se incubaron a 42 °C por 1 h en el termociclador.

5.8.7 Amplificación de productos por PCR

Todo el volumen de reacción de la síntesis de cDNA fue empleado para una reacción de PCR con la finalidad de amplificar las bibliotecas obtenidas. Los oligonucleótidos usados en la PCR son de tipo overhang y solo el oligonucleótido reverso tiene una secuencia corta llamada índice el cual permitirá identificar al RNA pequeño mediante la secuenciación y agruparlo en el tratamiento al cual pertenece (Figura 20).

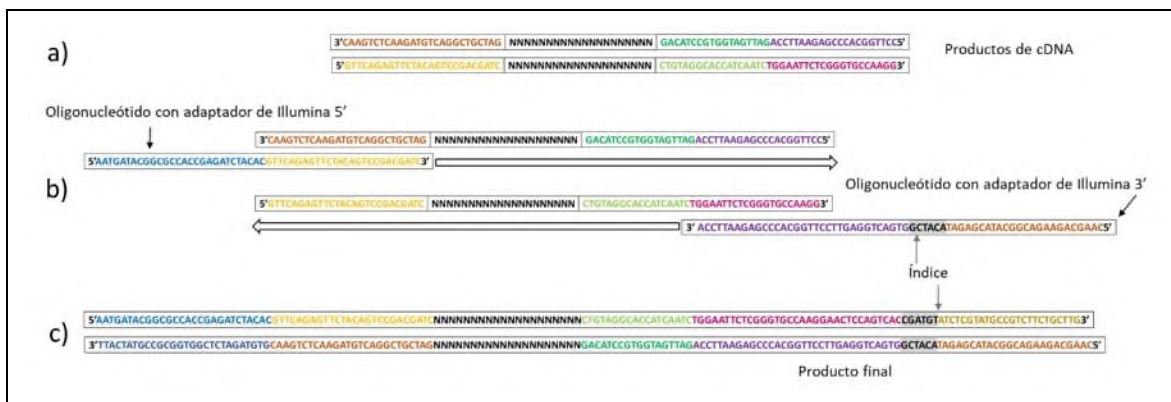


Figura 20. Esquema de amplificación de cDNA. a) hibridación de cDNA; b) hibridación de los oligonucleótidos sobre las cadenas de cDNA; c) hibridación de productos amplificados al finalizar la PCR.

Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a como se describe en la Tabla 12, empleando la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (NEB, M0530L).

Tabla 12. Preparación de reacciones de amplificación por PCR.

Componentes	Cantidad (µL)
Buffer 5X Phusion HF	10
dNTPs (10 mM)	2
Oligonucleótido directo Illumina 5'PCR (10 µM)	1
Oligonucleótido reverso Index-BC# (10 µM)	1
cDNA	12.5
DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity	0.5
Agua	23
Total	50

El programa usado en el termociclador para la amplificación se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de ciclaje para síntesis de cDNA.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	15 s	15
Hibridación	60	30 s	
Extensión	72	15 s	
Extensión final	72	10 min	1

5.8.8 Recuperación de los productos de PCR

Se preparó la reacción para un gel de acrilamida 6% nativo de 18 x 16 cm (Anexo 1). El gel se colocó en una cámara de electroforesis vertical (Hoefer, SE600XCROMA) con TBE1X como amortiguador de corrida. A cada muestra se agregaron 50 µL de amortiguador de carga GLB II y se cargaron en pozos individuales del gel. Se usó como referencia un marcador de peso molecular de 25 bp (Promega, G4511). La duración de la corrida fue de 3 h a 120 V. El gel se tiñó durante 5 min en una solución de bromuro de etidio con agua desionizada estéril para ser visualizado con luz UV en el fotodocumentador.

Con ayuda del peso molecular y el barrido de los productos, se trazó una línea para cortar la fracción de RNA entre 150 y 175 nt. El gel fue cortado y transferido a un tubo de 0.5 mL perforado. El tubo se insertó a otro de 1.5 mL y se centrifugó a 10,000 g hasta que todo el

gel atravesó el tubo de 0.5 mL. Se agregó al gel triturado un volumen de agua y se mantuvo en el vortex por 10 min, para después incubarse a 4 °C durante la noche. El tubo se centrifugó a 12,000 g por 1 min y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo cuidando no arrastrar gel. Se agregó una décima parte del volumen total de acetato de sodio 3 M, 3 µL de glicógeno y 1 mL de etanol absoluto, y se mezcló. Se incubó a -20 °C por 2 h, tras lo cual se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C. La pastilla obtenida se separó del líquido por decantación, se agregó 1 mL de etanol al 70 % y se llevó al vortex por 1 min. Al término se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C, se eliminó el líquido de lavado por decantación y se permitió la evaporación sin dejar que la pastilla se secase. Se resuspendió la pastilla en 12 µL de agua libre de DNAsa. De los 12 µL se usó 1 µL para cuantificar en el NanoDrop y 1 µL para revisar la purificación de la biblioteca con un gel de acrilamida 6% nativo.

5.9 Verificación de la construcción de las bibliotecas

Para verificar las bibliotecas se usaron dos métodos:

- Secuenciación Sanger.
- Digestión con EcoRI.

Ambos métodos de verificación tienen en común la ligación de productos de la biblioteca en un vector, la transformación de bacterias con el plásmido y la extracción del plásmido.

5.9.1 Preparación de los productos de la biblioteca para clonación.

Se empleó el plásmido pGEM-T (Promega), que es un vector linearizado con terminales de timina lo cual lo hace compatible con productos generados por DNA Taq polimerasas. Debido a que los productos fueron generados por Phusion una polimerasa de alta fidelidad, algunos pueden carecer de adenina terminal así que para poder clonar los productos de las bibliotecas se realizó una amplificación con DreamTaq Green (Thermo scientific, K1081). Se usaron los mismos oligonucleótidos empleados en la reacción amplificación por PCR. Las Tablas 14 y 15 describen los componentes y el programa que se usaron para la amplificación con DreamTaq PCR, respectivamente.

Tabla 14. Preparación de reacciones de PCR con Dream Taq PCR.

Componente	Volumen (µL)
DreamTaq PCR master mix	10
Oligonucleótido directo (10 µM)	1
Oligonucleótido reverso (10 µM)	1
Producto de la biblioteca	5
Agua libre de DNAsa	3
Total	20

Tabla 15. Condiciones de ciclaje para la reacción con Dream Taq PCR.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	60 s	1
Desnaturalización	95	15 s	5
Hibridación	60	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
Mantener	4		

Después de la amplificación se hizo una purificación de los productos con AMPure (Beckman, A63881).

5.9.2 Purificación de DNA mediante AMPure.

En un tubo de 1.5 mL se agregó 20 µL de producto de PCR y 36 µL de la solución AMPure. Se homogenizó la solución por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Enseguida se colocó el tubo en el magneto y se esperó a que la solución aclarara por aproximadamente 2 min. Se desechó el sobrenadante con pipeteo sin quitar del magneto y se agregó 200 µL de etanol al 70 % para lavar durante 30 s. Se desechó el sobrenadante, se repitió el lavado con etanol y se permitió la evaporación por 30 s. El tubo se retiró del magneto. Se agregaron 20 µL agua libre de DNAsa, se pipetearon las perlas 10 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se regresó el tubo al magneto por 2 min y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL.

5.9.3 Ligación al vector pGEM- T Easy.

Los productos purificados fueron ligados al vector siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega, A1360). La preparación de las reacciones se describe en la Tabla 16.

Tabla 16. Preparación de reacciones de ligación en el vector pGEM-T Easy

Componente	Volumen (µL)
Buffer de ligación 2X	2.5
Vector pGEM Easy	0.5
Productos de PCR	1.5
Ligasa DNA T4	0.5
Total	5

Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 1 h.

5.9.4 Transformación de células competentes

La transformación de células competentes se realizó siguiendo el manual One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, C4040-03). Brevemente, un vial de células competentes fue removido del ultracongelador a -80 °C y se colocó en hielo. Se permitió descongelar por 10 min, se agregó 2.5 µL de la reacción de ligación del vector pGEM y se mezcló mediante pipeteo despacio para no lisar las células. El vial se mantuvo en hielo por 30 min y después se incubó a 42 °C durante 30 s y luego se regresó inmediatamente al hielo. Se agregaron 125 µL de medio S.O.C. y se incubó a 37 °C por 1 h con agitación a 225 rpm. Se dividió el volumen en 30 µL, 50 µL y 70 µL, para dispersar en medio LB sólido con ampicilina 100 mg/mL y X-Gal 20 mg/mL (Anexo 1). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y después se mantuvieron a 4 °C por 2 h para diferenciar las colonias blancas de las azules.

5.9.5 Cultivo de las colonias blancas

Las colonias blancas que se desarrollaron en las placas son presuntivas de estar transformadas con el vector que contiene inserto. Cada colonia blanca se tomó con la punta de un palillo previamente estéril y se inoculó de inmediato en tubos de vidrio que contenían 5 mL medio LB líquido con ampicilina 100 mg/mL. Los tubos se incubaron en forma inclinada, a 37 °C, con agitación de 225 *rpm* durante toda la noche para favorecer el crecimiento de las células transformadas.

5.9.6 Extracción de plásmidos por lisis alcalina.

Los cultivos obtenidos en el paso anterior se centrifugaron para recuperar el paquete celular, a 12,000 *rpm* por 2 min. Una vez obtenido el paquete celular libre de medio de cultivo, se agregó 100 µL de solución I (Anexo 1) y se homogenizó hasta disolver la pastilla. Se adicionaron 200 µL de solución II (Anexo 1) y se mezcló por inversiones 10 veces. Finalmente se añadieron 150 µL de solución III (Anexo 1) y se mezcló por inversión 10 veces. Se centrifugó a 4 °C a 20,000 *g* por 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.

A la fase recuperada de la lisis se le agregó 1 mL de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión 10 veces, después de lo cual se centrifugó a 20,000 *g* por 5 min a 4 °C. La fase acuosa se extrajo con pipeta y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL, agregando 1 mL de etanol absoluto. Se mezcló en el vortex a velocidad media y se mantuvo a -20 °C por 2 h. Al término se centrifugó a 4 °C a 20,000 *g* por 15 min para precipitar la pastilla de DNA plasmídico. El líquido se desechó por decantación y se agregó 1 mL de etanol al 70 % como solución de lavado. Se mezcló en el vortex a velocidad media y se centrifugó a 20,000 *g* por 10 min a 4 °C. La solución de lavado se decantó y se permitió su evaporación sin dejar que la pastilla se secase totalmente. La pastilla se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas y se agregó 1 µL de RNAsa 10 mg/mL (ThermoScientific, EN0602) para degradar el RNA. Las reacciones se incubaron a 37 °C por 30 min y se procedió a los análisis moleculares subsecuentes.

5.9.7 Purificación de plásmidos y secuenciación

La purificación de plásmidos se realizó con el método de purificación del AMPure, tal como se indica en la sección 5.9.2. Los plásmidos purificados se cuantificaron para ajustar al

volumen y concentración requeridos por el servicio de secuenciación Sanger. Los requerimientos para la síntesis individual del LANGEBIO (<http://www.langebio.cinvestav.mx/>) son una concentración de 120 ng/μL y un volumen de 10-15 μL. Los resultados se analizaron con la herramienta ClustalW de programa BioEdit.

5.9.8 Análisis por digestión con EcoRI.

La digestión del plásmido se realizó siguiendo el manual de EcoRI (Promega, R6011), en tubos de 0.2 mL. La Tabla 17 describe los componentes para realizar las restricciones.

Tabla 17. Preparación de reacciones de restricción con EcoRI.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador RE 10X	2
Plásmido	3.5
Agua	14
EcoRI	0.5
Total	20

Las reacciones se incubaron a 37 °C por 2 h. Al término, la enzima se inactivó a 65 °C por 20 min.

Al finalizar la digestión se corrieron las muestras en un gel de acrilamida 6 % nativo a 120V durante 45 min. Se cargó en el pozo una mezcla de 2 μL del producto de digestión, 1 μL de amortiguador de carga 6X y 3 μL de agua libre de DNasa. Al terminar la corrida, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 5 min y se visualizaron los productos con luz UV en el fotodocumentador.

5.10 Secuenciación masiva de las bibliotecas de RNAs pequeños

Las bibliotecas se procesaron en el secuenciador Illumina HiSEQ2500 del Institute for Integrative Genome Biology de la Universidad de California- Riverside. Previo a su secuenciación, las bibliotecas se analizaron mediante en un equipo Agilent Bioanalyzer (2100 Expert) para conocer su tamaño y concentración exactas. Con estos datos, para cada biblioteca se realizaron ajustes de concentración (normalización) y se mezclaron para ser

secuenciadas dos canales de la celda de flujo, haciendo uso de los índices que permiten identificar al origen de cada biblioteca. Una vez realizada la normalización, se sometieron a secuenciación por 51 ciclos, en lectura simple. Los archivos con los resultados de la secuenciación fueron depositados en el servidor del IIGB para su descarga.

5.11 Análisis bioinformático

Los datos de secuenciación se descargaron de la página <http://illumina.bioinfo.ucr.edu/ht/> para su análisis. El diagrama de flujo de la Figura 21 muestra los pasos realizados para el análisis.

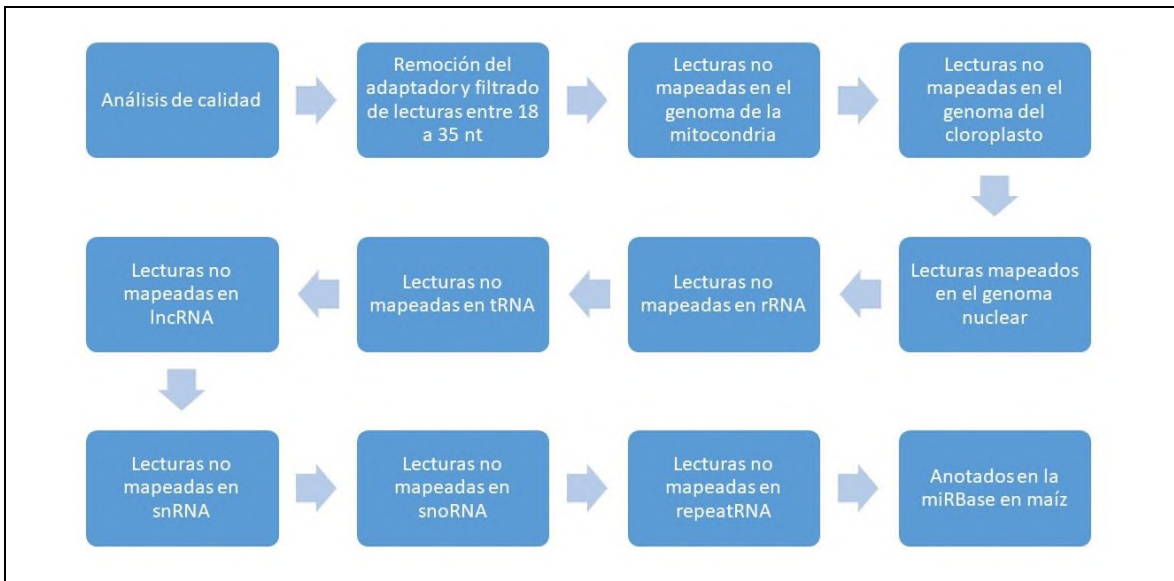


Figura 21. Diagrama de flujo del análisis de las bibliotecas.

5.11.1 Análisis de la calidad de las bibliotecas

El primer análisis de las bibliotecas fue con el programa FastqQC (Babraham Bioinformatics) para revisar la calidad de los datos de secuenciación. El valor de calidad está definido en la Ecuación 3:

$$Q = -10\log_{10}P \quad \text{Ec. 3}$$

donde P es la probabilidad del error del llamado de base. Un valor de Q = 10 tiene una probabilidad de que 1 base este mal definida en 10 bases, o en otras palabras, simboliza un 90% de que la bases se correcta.

5.11.2 Eliminación del adaptador

El análisis más completo de todas las bibliotecas se hizo con el programa CLC genomics workbench versión 8.5 (QIAGEN) en su versión de prueba, la cual solo está disponible por 14 días para usar todas sus herramientas de análisis. Las herramientas usadas se aplicaron en base al manual del software.

Conseguidos los archivos se descomprimieron en formato fastq y se cargaron al programa CLC. La primera tarea fue eliminar el adaptador de las secuencias; esto implica configurar la secuencia del adaptador que va a ser removida de cada secuencia (Figura 22).

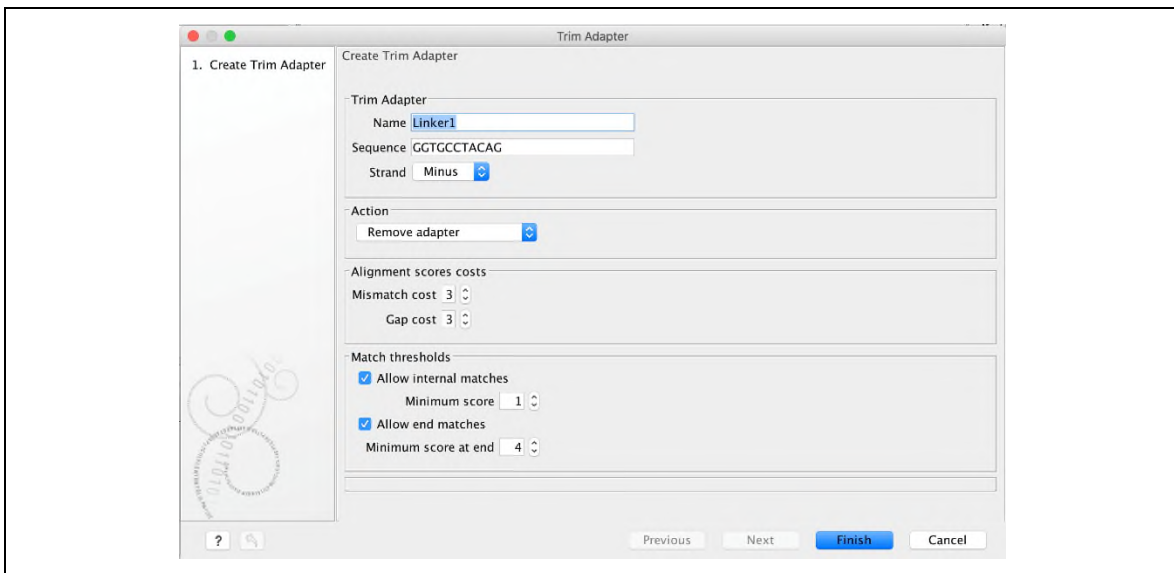


Figura 22. Configuración para crear el adaptador LINKER1 en CLC.

En la casilla de *Sequence* se puso la secuencia del adaptador, la acción aplicada fue remover la secuencia de LINKER1 en cada una de las secuencias de la biblioteca. En el alineamiento y eliminación se permitió cambios de base (mismatch) y espacios (gap).

Usando la herramienta de *Trim sequence* se seleccionó la biblioteca y el adaptador LINKER1 creado del paso anterior. Antes de realizar la eliminación del adaptador se configuraron parámetros de calidad para cada secuencia de la biblioteca (Figura 23).

Durante el análisis de calidad, el programa ajusta un valor límite de error que tiene por default una $P = 0.05$ y que en valor de calidad de Phred significa $Q = 13$, las secuencias con calidad por debajo de 13 no fueron analizadas.

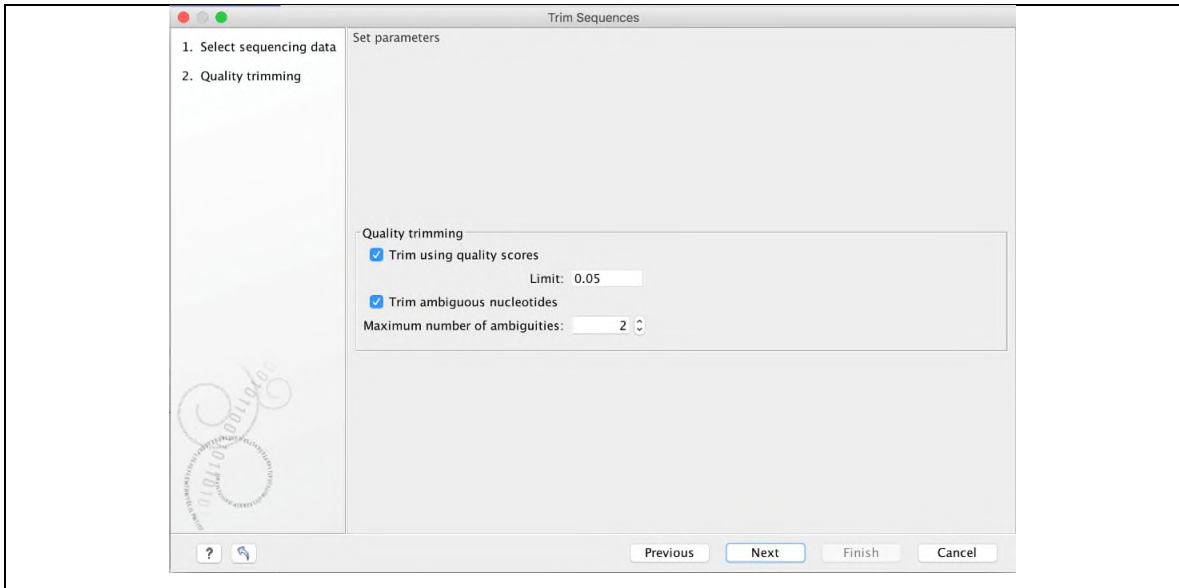


Figura 23. Parámetros para filtrar secuencias por calidad en CLC. Durante la eliminación del adaptador las secuencias que no cumplan con esos valores serán descartadas de la eliminación del adaptador. Nucleótidos ambiguos se refiere a la base “N” que representa a las cuatro bases A, G, T y C.

Otro parámetro definido fue el rango de las secuencias después de haber eliminado el adaptador. Para nuestro interés, y debido al rango de los miRNAs (15 a 34 en la miRBase), se especificó que solo permanecieran las secuencias entre 18 y 35 bases (Figura 24).

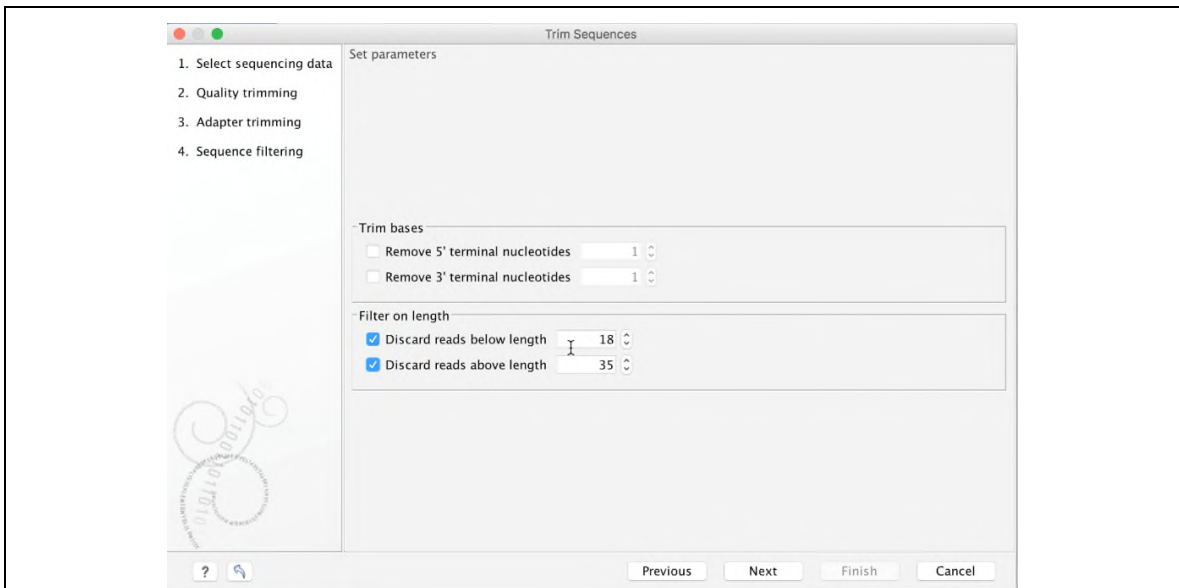


Figura 24. Parámetro de filtro de longitud para las secuencias de la biblioteca después de eliminar el adaptador.

Al finalizar la eliminación se creó una nueva lista con secuencias de 18 a 35 bases con Q > 13.

5.11.3 Mapeo

Se realizó el mapeo de las secuencias en bases de datos de maíz para limpiar las bibliotecas de secuencias artefactos (secuencias no pertenecientes a la propia muestra debido al error de secuenciación o contaminación). Adicionalmente, se descargaron las siguientes bases de datos del maíz para eliminar secuencias pertenecientes a otros grupos de RNAs que no eran objeto de estudio en este trabajo:

Genoma de maíz versión del ensamblaje AGPv3 (incluye en genoma de la mitocondria y el genoma de plástidos): http://plants.ensembl.org/Zea_mays/Info/Index.

RNA ribosomal de maíz: <https://www.arb-silva.de/>

RNA de transferencia de maíz versión 4a.53: <http://gtrnadb.ucsc.edu/>

RNA largos no codificantes de maíz: <http://structuralbiology.cau.edu.cn/PNRD/>

RNA interferente de maíz (tasi): <http://structuralbiology.cau.edu.cn/PNRD/>

Pequeños RNAs nucleares de maíz: <http://rfam.xfam.org/>

Repeticiones de RNAs: <http://plantrepeats.plantbiology.msu.edu/index.html>

Todas las bases de datos fueron cargadas al programa para usarlas como base de datos y mapearlas con las secuencias de las bibliotecas. Con el programa CLC se separaron los genomas del maíz el nuclear, de mitocondria y plastos. Las secuencias en formato de RNA (U) se cambiaron a secuencia en formato DNA (T).

El mapeo se hizo con la herramienta *Maps reads to reference* de CLC. Los parámetros para el análisis son: la lista de lecturas que se desean analizar y referencia. El orden de uso de las bases de datos del maíz no afecta el resultado de los RNAs pequeños. Se usó la lista con secuencias de 18 a 35 bases resultado de la eliminación del adaptador. El análisis generó dos resultados: lista de secuencias que coincidieron y las que no (Figura 25).

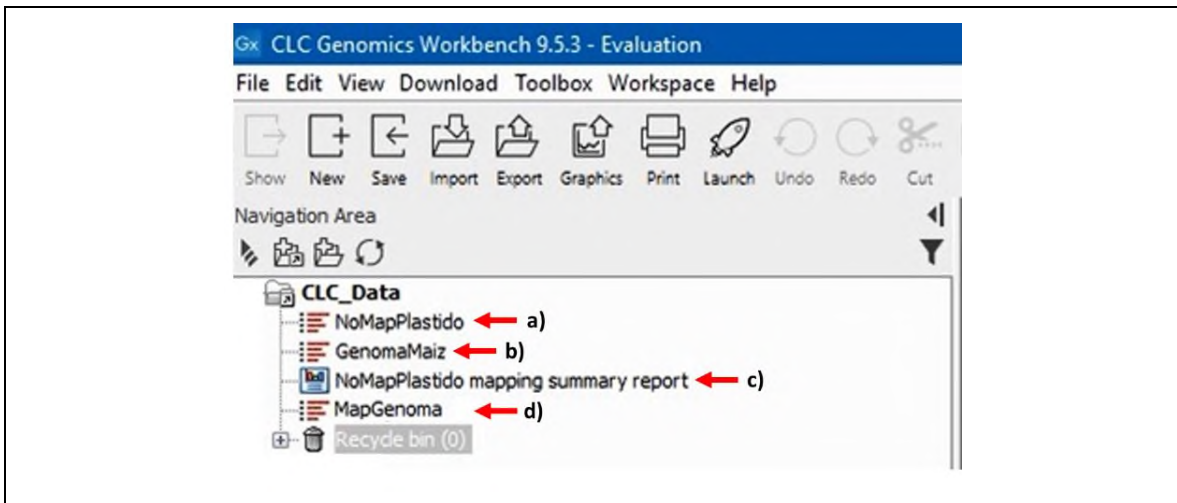


Figura 25. Archivos generados del mapeo de lecturas en el genoma nuclear de maíz. Las secuencias que no coincidieron con el genoma de plástido se mapearon con el genomas nuclear. a) Lista de secuencias no coincidieron con el genoma de plástido; b) genoma del maíz (referencia); c) reporte del mapeo en el genoma de maíz; d) lista de secuencias mapeadas en el genoma de maíz.

En un proceso iterativo se recuperaron las secuencias que no mapearon con las referencias excepto para el genoma nuclear.

5.11.4 Identificación de pequeños RNA en la base de datos miRBase

Después del mapeo, las bibliotecas quedaron “limpias” esto es, solo permanecieron las lecturas que tienen identidad con el genoma de maíz y aquellas que no son parte de algún tipo de RNA, a estas secuencias les llamamos lista de pequeños RNAs. El análisis continuó con la identificación de las secuencias limpias con miRNAs reportados por lo cual se agruparon para determinar su frecuencia usando la herramienta *Extract and Count*. Se descargó la base de datos de miRNAs desde el CLC con versión 21 de la página miRBase (www.mirbase.org).

La lista de RNAs pequeños agrupados por frecuencia se identificaron con secuencias de de maíz de la miRBase usando la herramienta de *Annotate and Merge Counts* (Figura 26).

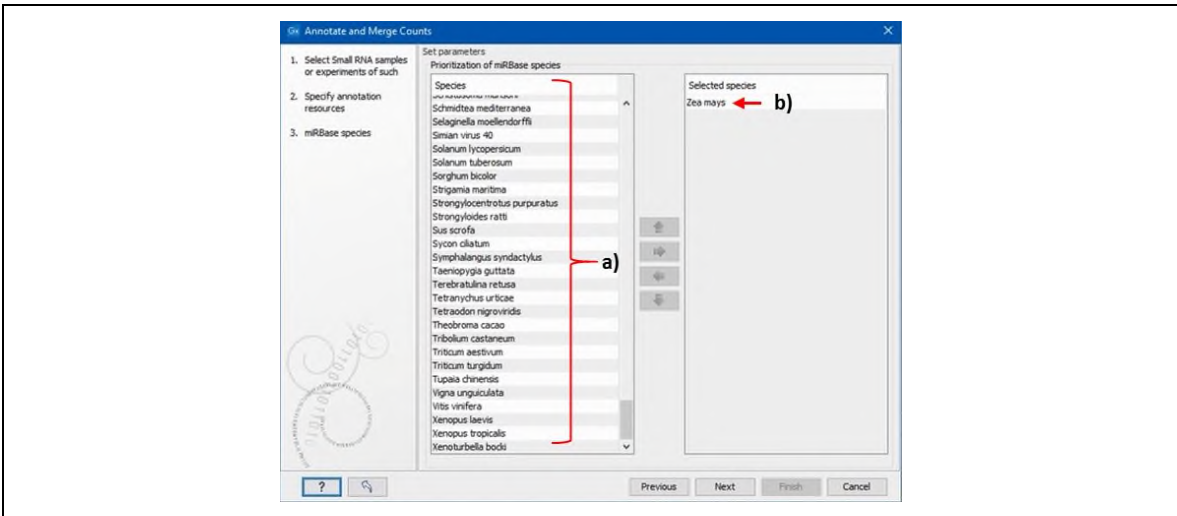


Figura 26. Selección de especies en la miRBase para la identificación de miRNAs con la lista de pequeños RNAs.
a) Lista de especies de la base de datos de la miRBase; b) especie de maíz seleccionada para el análisis.

Otro parámetro que se ajustó fueron las isoformas y los cambios de bases (mismatch) con la finalidad de aumentar los resultados de la búsqueda (Figura 27).

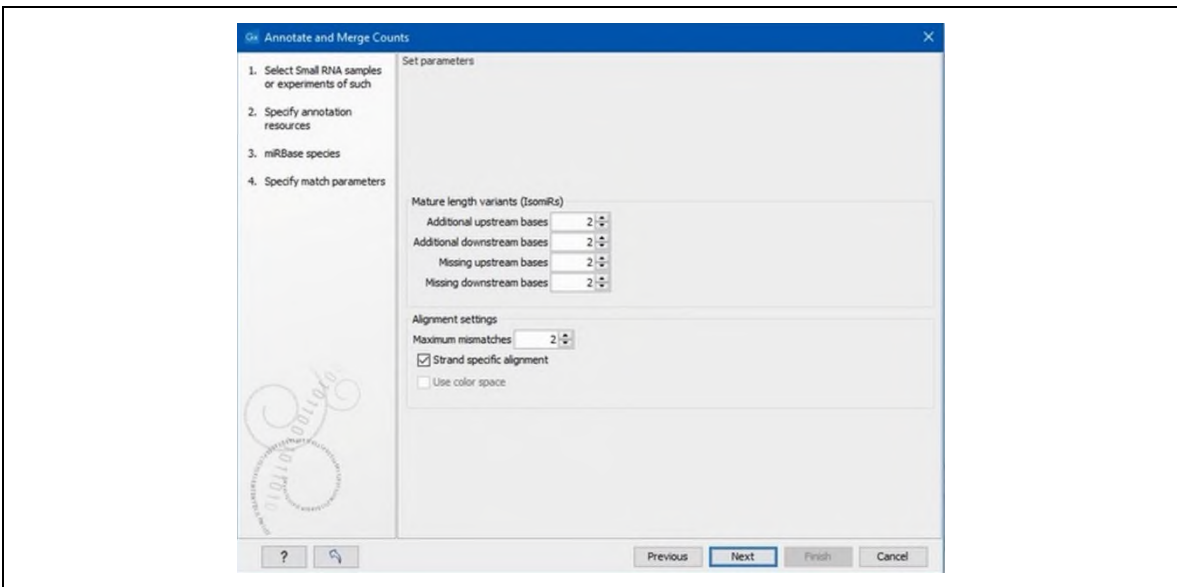


Figura 27. Parámetros de isoformas y ajustes de cambios de base en el alineamiento para la identificación de miRNAs en maíz de la lista de pequeños RNAs agrupados con frecuencia de una biblioteca.

Al finalizar el análisis de *Annotate and Merge Counts* se crearon 5 archivos (Figura 28):

- Reporte del análisis.
- Lista de secuencias anotadas de las especies seleccionadas en la miRBase.
- Lista de secuencias no anotadas en la de las especies seleccionadas en la miRBase.
- Resultados tabulados del alineamiento de los anotados, mostrando los hits de forma individual de cada microRNA sobre la secuencia del precursor.
- Resultados tabulados del alineamiento de los anotados, *agrupando los hits por secuencia madura* de microRNAs.

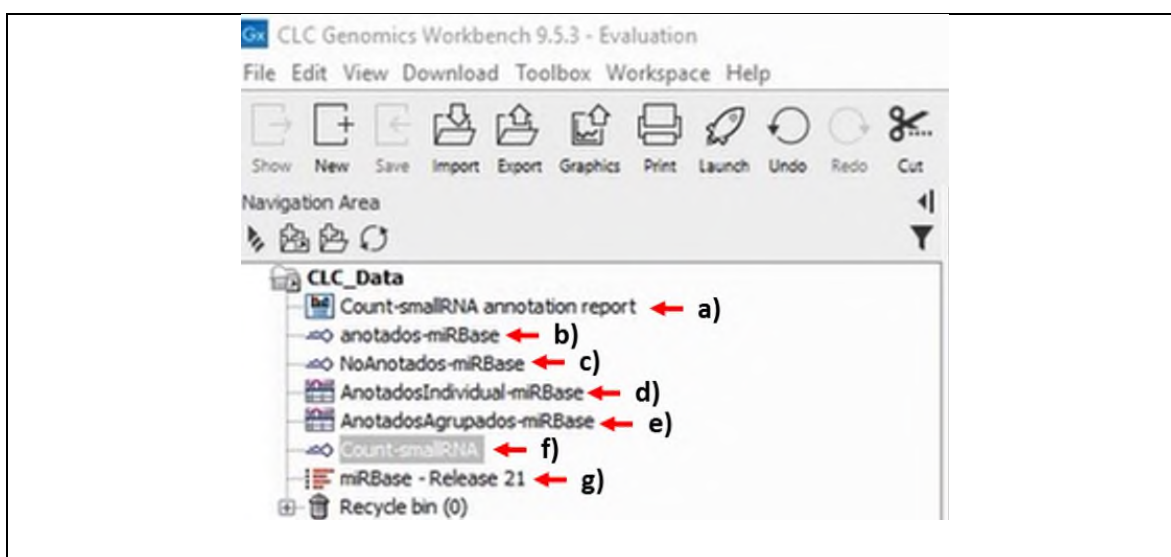


Figura 28. Archivos generados de la herramienta de *Annotate and Merge Counts* de CLC. a) reporte; b) lista de secuencias identificadas con la miRBase; c) lista de secuencias no identificadas con la miRBase; d) resultados del alineamiento en forma individual sobre el precursor; e) resultados del alineamiento en forma agrupada sobre la secuencia madura; f) pequeños RNAs agrupados con frecuencias; g) base de datos de la miRBase versión 21.

5.11.5 Agrupación de los tratamientos de las bibliotecas

Cada una de las bibliotecas llevó el procedimiento descrito. Los resultados de *agrupados por secuencia madura* de todas las bibliotecas se unieron en un archivo usando la herramienta de *Set Up Experiment* el cual ordena las tablas respetando los valores de miRNAs anotados para cada biblioteca. También se realizó para los resultados de individuales sobre el precursor (Figura 29).

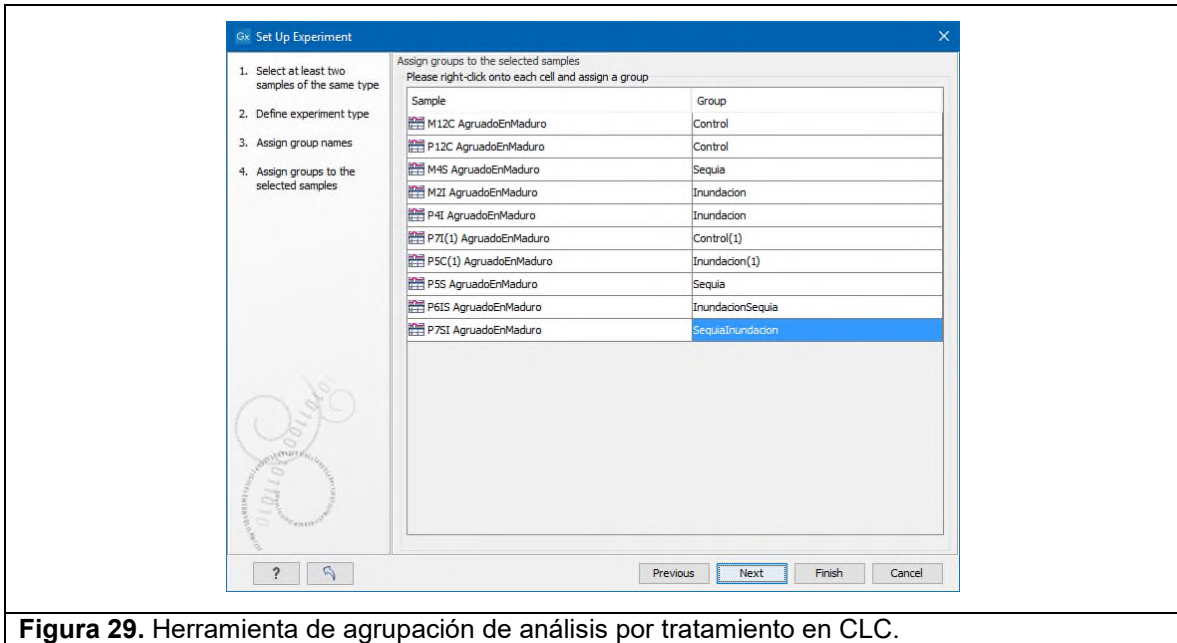


Figura 29. Herramienta de agrupación de análisis por tratamiento en CLC.

El resultado de la compilación de las tablas se exportó en formato de hoja de cálculo.

5.11.6 Normalización de las lecturas

En la hoja de cálculo se separaron las bibliotecas por especie, ya que en la última tabla se agruparon 10 bibliotecas: 3 de maíz, 5 de teocintle y 2 adicionales de teocintle. Una vez separadas, se aplicaron dos normalizaciones: normalización global o partes por millón (TPM) y la normalización de cuantiles.

5.11.6.1 Normalización por TPM

Las lecturas fueron transformadas para cada biblioteca usando la Ecuación 4, la cual describe la normalización TPM.

$$TPM = \frac{lectura * 1x10^6}{tamaño} \quad \text{Ec. 4}$$

donde *lectura* es el valor del miRNA encontrado en la biblioteca y *tamaño* es el total de secuencias el cual es el valor antes de se haga el conteo de pequeños RNAs.

Como ejemplo de la aplicación de la ecuación de normalización TPM se muestra la Tabla 18.

Tabla 18. Ejemplo de normalización de las bibliotecas con TPM.

Nombre	MC	MI	MC (TPM)	MI (TPM)	MC (TPM)	MI (TPM)
MIR156k-3p	155	40	$(155 \cdot 1 \times 10^6) / 9,850,239$	$(40 \cdot 1 \times 10^6) / 15,964,518$	15.7	2.5
MIR399f-5p	28	4	$(28 \cdot 1 \times 10^6) / 9,850,239$	$(4 \cdot 1 \times 10^6) / 15,964,518$	2.84	0.25
Total de lecturas después del mapeo en repeatsRNA	9,850,239	15,964,518	-	-	-	-

5.11.6.2 Normalización por cuantiles.

Este tipo de normalización tiene como fin dar a diferentes conjuntos de datos (bibliotecas) la misma distribución, tomando el promedio de cuantiles y sustituyéndolo por el valor original (Bolstad *et al*, 2003).

1. Dado un conjunto de datos n de longitud p , forma X de dimensiones $p * n$ donde cada conjunto de datos es una columna.
2. Ordenar cada columna de X para tener $X_{ordenado}$.
3. Tomar el promedio de las filas y asignar el promedio a cada elemento de la fila para conseguir $X'_{ordenado}$.
4. Para obtener el conjunto de datos normalizados arregla cada columna de $X'_{ordenado}$ en el mismo orden que la original X .

Después de conseguir el arreglo por cuantiles se aplicó normalización TPM.

5.12 Identificación de microRNAs de expresión diferencial usando prueba estadística

En este trabajo se empleó la herramienta de análisis estadístico IDEG6 (Romualdi *et al*, 2003) para hacer una aproximación de la expresión diferencial de los miRNAs. Se usó la prueba exacta de Fisher con corrección Bonferroni (http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6_form/index.html).

5.13 Cálculo de la expresión de miRNAs

Para calcular la expresión de miRNA, los valores normalizados de los tratamientos de estrés fueron divididos por el control y después se aplicó logaritmo base 2, para obtener el *Fold change*, de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$Fold\ change = \text{Log}_2 (VN\ problema / VN\ control) \quad \text{Ec. 5}$$

donde VN es el valor normalizado de abundancia de cada microRNA en la biblioteca respectiva.

6. Resultados y discusión

6.1 Crecimiento de maíz y teocintle

Al inicio de este trabajo, se estableció el cultivo de maíz B73 y de teocintle en una casa de malla sombra. Desafortunadamente, las plantas de maíz B73 mostraron crecimiento desfavorable dentro de la malla sombra ya que no superaron el metro de altura y no emergieron las inflorescencias. Es posible que las plantas no se hayan adaptado al clima debido a que esta variedad es de clima templado. Por otro lado, no se contaban con suficientes semillas de la variedad B73, así que fue sustituida por CML496, una variedad de maíz tropical aportada también por el CIMMYT. Los experimentos de estrés hídrico se realizaron usando la variedad CML496, para la cual no fue necesario realizar propagación porque se contaba con semillas suficientes.

Las plantas de teocintle *Zea mays* ssp. *parviglumis*, serán referidas a partir de aquí como Parviglumis, se desarrollaron de manera normal en la casa de malla sombra, cumpliendo su ciclo de vida desde la siembra hasta la cosecha de semillas (Figura 30). A los 80 días emergieron de forma simultánea las inflorescencias de las plantas y se realizó el cruzamiento de forma manual, como se indica en la sección 5.1.



Figura 30. Espiga de la planta de Parviglumis con 80 dds.

6.2 Efectos del estrés hídrico en la supervivencia de plantas de maíz y Parviglumis.

Los ensayos de estrés hídrico se realizaron en un cuarto de crecimiento. Como puede apreciarse en la Figura 31, las plantas tuvieron un crecimiento adecuado, 14 dds para alcanzar la etapa V2, esto es un indicativo de crecimiento normal (Zhang *et al*, 2008; Mano y Omori, 2013).

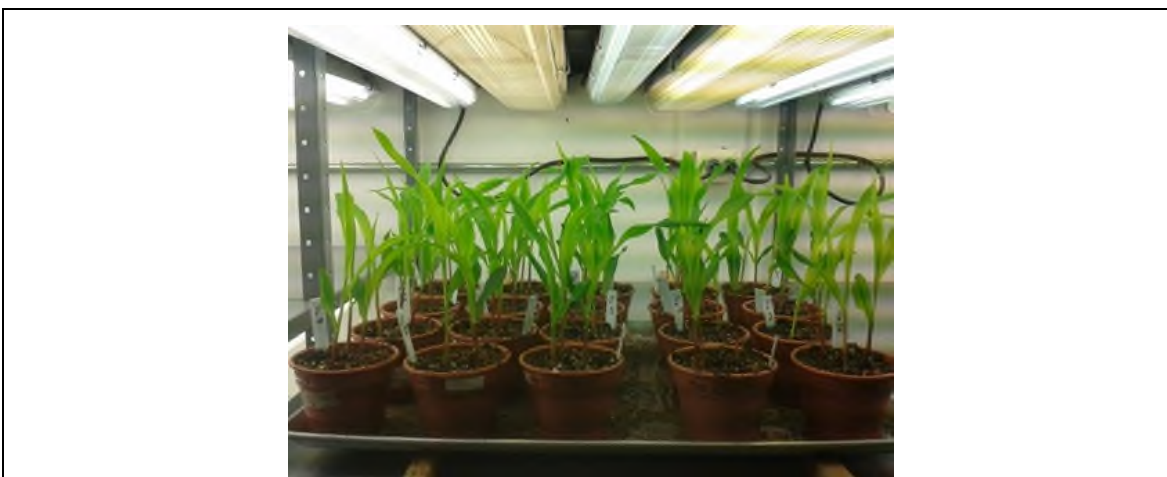


Figura 31. Plántulas de maíz con 14 dds todas en etapa V2 dentro del cuarto de crecimiento.

Se realizaron las pruebas de supervivencia en plántulas de maíz en la etapa V2 para definir el tiempo de estrés de los tratamientos de inundación y sequía, como se describió en la sección 5.3.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 19, el tratamiento con dos días de inundación induce un nivel de estrés que permite la supervivencia del 100% de las plantas analizadas y es suficiente para inducir cambios fisiológicos visibles (Singh y Ghildyal, 1980; Liu *et al*, 2010), como el control del crecimiento y daño mínimo a las puntas de las hojas.

Tabla 19. Porcentaje de supervivencia por inundación.

Tiempo de estrés por inundación (días)	Porcentaje de supervivencia (%)
2	100
4	25
6	0

En general los efectos de la inundación fueron reducción de crecimiento como demuestran (Ren *et al*, 2013; Liu *et al*, 2012; Mano y Omori, 2013) (Figura 32).

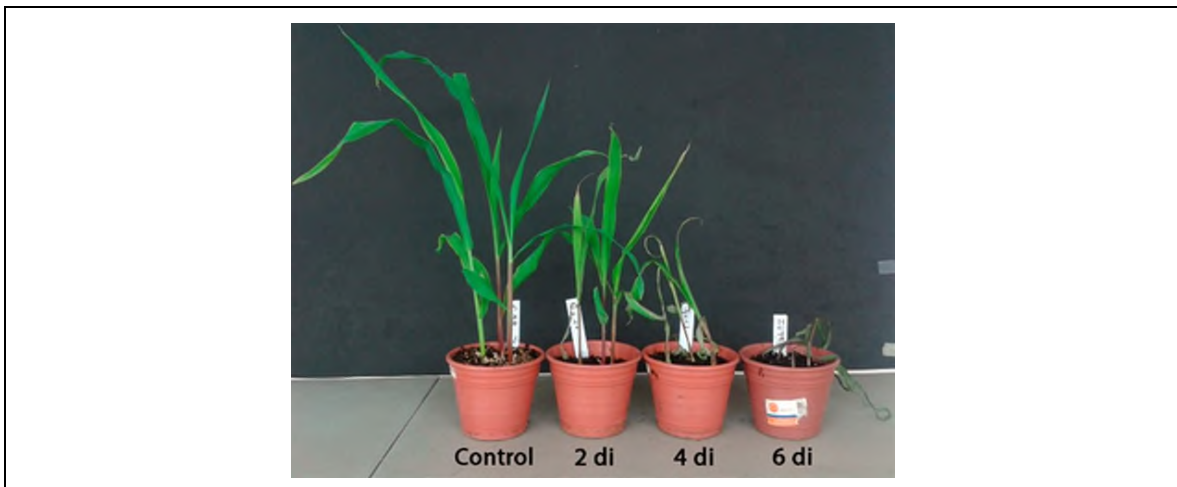


Figura 32. Efecto de los días de sumersión sobre el crecimiento de las plántulas en maíz.
2 di: Dos días de inundación y cuatro de recuperación; 4 di: Cuatro días de inundación y dos de recuperación; 6 di: Seis días de inundación sin recuperación.

El tratamiento de inundación por 4 días permitió la recuperación de algunas plantas sin embargo, éstas presentaron necrosis en sus tejidos como se muestra en la Figura 33 Campbell *et al* (2015) obtuvieron resultados similares. El proceso de recuperación a partir de inundación es reportado por Wenkert *et al* (1981) ellos también muestran reducción de biomasa en las primeras 12 h de estrés por inundación en etapas mayores a V2 en maíz. Las plántulas con tratamiento de seis días de sumersión no se recuperaron del estrés.



Figura 33. Necrosis de la hoja de maíz, resultado de cuatro días bajo el agua.

Por lo anterior, se eligió el tratamiento de dos días para aplicarlo en los tratamientos de inundación y los seriados con sequía, ya que más dos días de estrés bajo el agua provocó en las plantas necrosis y senescencia debido a reducción de la fotosíntesis (Yordanova y Popova, 2007). Zhang *et al* (2008) describen que la etapa más susceptible a la inundación es la etapa V2 con 36 h de estrés.

Las plantas en estrés por sequía en etapa V2 mostraron un atraso de creciendo como describe Kong *et al* (2010) causado por la disminución del potencial de agua lo que lleva a la reducción de la actividad fotosintética (Țerbea y Ciocăzanu, 1999). En la Figura 34 se muestra la recuperación de las plantas después de la rehidratación, tras haber estado sujetas a tratamientos de sequía durante los tiempos indicados.

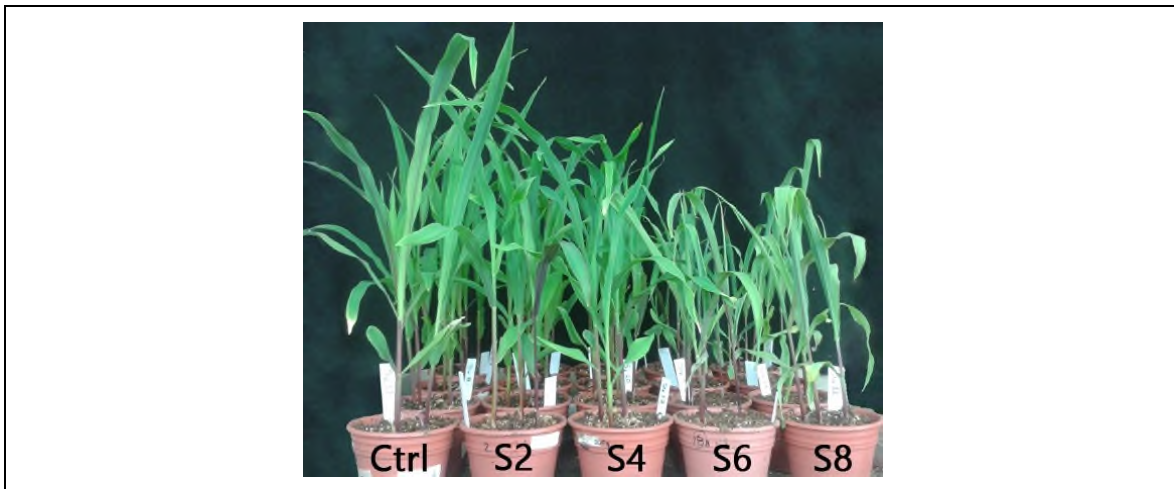


Figura 34. Efecto de la privación y recuperación hídrica en plantas de maíz. S2: dos días y seis de recuperación; S4: cuatro días y cuatro de recuperación; S6: seis días y dos de recuperación; S8: ocho días sin recuperación.

Se observó que 4 días de tratamiento fueron suficientes para que las plantas presentaran epinastia y reducción de la biomasa este comportamiento fue observado por Bridget (2013) en plantas de maíz al reducir el volumen de riego.

6.3 Comparación de los efectos del estrés sobre el crecimiento y el contenido de agua en maíz y teocintle

Se realizaron mediciones fisiológicas a las plantas tratadas con inundación y sequía en ambas especies con el fin de diferenciar los efectos del estrés. Para la inundación se adoptó

el coeficiente de tolerancia al anegamiento (CTA) reportado por Qiu *et al* (2007). Para calcular el factor se usó la ecuación 2 descrita en la metodología. El CTA no proporcionó información para definir la especie tolerante a la inundación como lo reporta Liu *et al* (2010), es posible que esto se deba a las condiciones de crecimiento de las plantas (Figura 35).

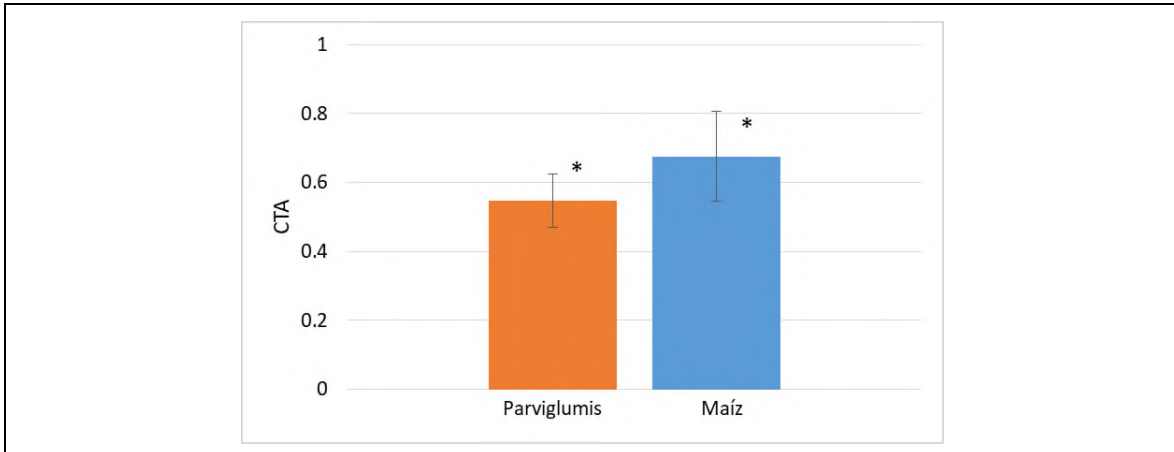


Figura 35. Coeficiente de tolerancia al anegamiento (CTA) en maíz y Parviglumis. No hay diferencia significativa en la tolerancia al anegamiento en triplicados ($p < 0,05$, prueba t de Student).

Los tratamientos de inundación produjeron efectos negativos en el crecimiento de las raíces como lo reportado por Lizaso *et al* (2001). En la Figura 36 puede observarse que la inundación provoca que se inhiba el crecimiento de las raíces hacia la profundidad del sustrato, por lo tanto, sus raíces son más cortas que las de las plantas control. Este efecto fue observado en plantas de maíz y Parviglumis indistintamente.



Figura 36. Reducción del crecimiento de raíces en plantas de Parviglumis por efecto de la inundación.

Para el caso del tratamiento de sequía, se determinó el estado de hidratación celular a través del contenido relativo de agua (CRA) como parámetro fisiológico de estrés. En la Figura 37 se muestran los resultados de este ensayo en plantas de maíz y Parviglumis, tanto para las plantas control, como para las plantas al término del tratamiento, y después de 24h del estrés.

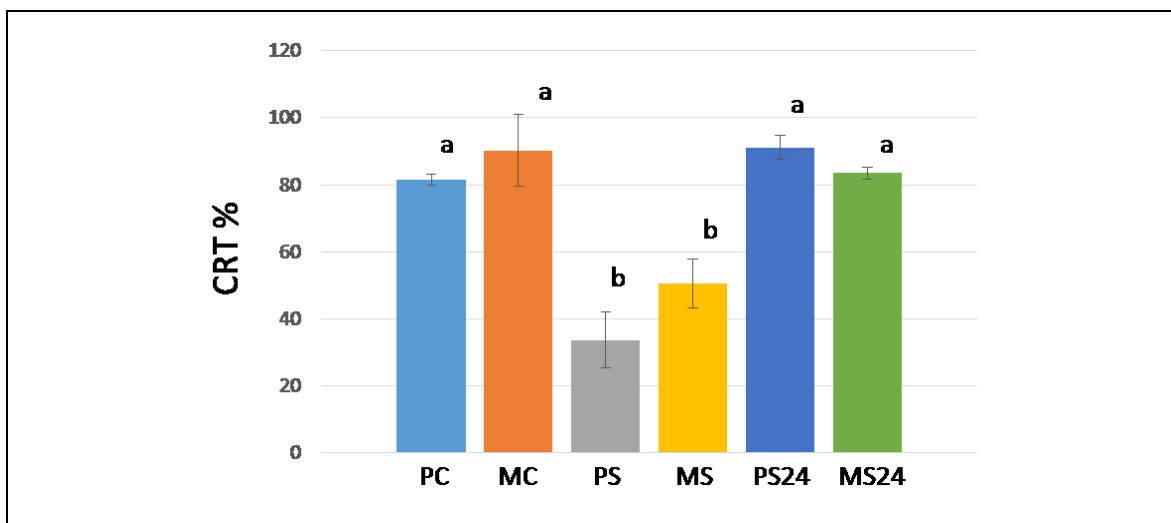


Figura 37. Contenido relativo de agua en maíz y Parviglumis. PC: Parviglumis Control; MC: Maíz Control; PS: Parviglumis Sequía; MS: Maíz Sequía; PS24: Parviglumis a 24 h de rehidratación; MS24: Maíz a 24h de rehidratación (Prueba Tukey $p < 0.05$).

Diversos trabajos han remarcado que el germoplasma de las plantas silvestres es una fuente valiosa para el estudio y la transferencia de la tolerancia a la inundación hacia sus relativos domesticados, tal como es el caso del teocintle hacia el maíz (Bailey-Serres *et al*, 2012; Hufford *et al*, 2012). Para esto se ha hecho necesario establecer metodologías que permitan, en principio, evaluar diferentes genotipos para identificar aquellos que posean mayor tolerancia y así facilitar la selección del germoplasma, o bien, para evaluar la tolerancia en líneas resultantes de cruza.

Los métodos de evaluación de la tolerancia consideran principalmente tres respuestas que muestran las plantas que son capaces de sobrevivir a la inundación: la elongación de la parte aérea, la aireación de las raíces a través de la formación de raíces adventicias y de aerénquima, la formación de barreras radiales contra la pérdida del oxígeno en raíces vía la acumulación de suberina o lignina, y la retención de capas de aire en la interface planta-agua (Nagai *et al*, 2010; Bailey-Serres *et al*, 2012). Por ejemplo, Mano *et al* (2006) analizaron la variación en la formación de aerénquima entre maíz y teocintle como respuesta de tolerancia a la inundación, observando que la mayor capacidad para formar

aerénquima se encontraba en el teocintle (*Zea nicaraguensis*), lo que se correlaciona con su alta adaptabilidad a condiciones de inundación. Adicionalmente al aerénquima, la formación de una barrera radial contra la pérdida de oxígeno contribuye directamente a la alta tolerancia de *Z. nicaraguensis* a la inundación (Abiko *et al*, 2012). En contraste, más tarde Mano y Omori (2013) analizaron líneas híbridas de introgresión de un teocintle (*Zea nicaraguensis*) y maíz con diferentes niveles de tolerancia a la inundación en etapas tempranas de desarrollo. En dicho trabajo se encontró que no siempre existe una correlación significativa entre la tolerancia y la formación constitutiva de aerénquima en algunas de las líneas, ya que se encontraron líneas tolerantes incapaces de formar un aerénquima constitutivo, lo que sugiere la participación de mecanismos adicionales para la tolerancia.

Además de las respuestas mencionadas, se ha considerado como una característica de tolerancia a la capacidad de no afectar dramáticamente el desarrollo en respuesta al estrés, o de limitar el daño foliar. Por ejemplo, para el caso específico de la inundación en plantas de maíz, se ha propuesto el empleo del Coeficiente de Tolerancia al Anegamiento (CTA) como parámetro de comparación (Qiu *et al*, 2007).

El CTA considera en su cálculo mediciones de desarrollo, como la longitud y la biomasa de las plantas en estrés y en condiciones control. Tal como lo reportado por Qiu *et al* (2007), la medición del CTA en germinados de maíz permitió discriminar entre maíz tolerante y no tolerante, así como identificar loci de características cuantitativas (QTLs) asociados a la tolerancia. Por tal razón, este parámetro fue utilizado en este trabajo, aunque de acuerdo a los resultados, no fue posible encontrar diferencias significativas entre maíz y teocintle. Esto pudo deberse a que el CTA hasta ahora solo se había aplicado a la evaluación de la tolerancia al anegamiento, y en el caso de este trabajo, se empleó en experimentos de sumersión.

Estos resultados hacen evidente la necesidad de emplear varios indicadores para realizar la evaluación adecuada de la tolerancia al estrés entre diferentes genotipos, considerando que la efectividad de los indicadores para detectar diferencias dependerá de la etapa de desarrollo de las plantas, y del tipo e intensidad del estrés, entre otros factores.

6.4 Dinámica del estado hídrico en el curso de los tratamientos

Con la finalidad de llevar a cabo los tratamientos en plantas de la misma edad y de alcanzar el punto final de todos los tratamientos de forma simultánea, se realizó el monitoreo de los días requeridos para completar cada uno de los ensayos de estrés individual y secuenciales. De acuerdo a consideraciones preliminares, se estableció que el tratamiento más largo es inundación-sequía (IS). En efecto, para este tratamiento, una vez aplicado el estrés por inundación, se requirieron de 5 ± 2 días para que las macetas perdieran agua hasta llegar al peso de control, y 7 ± 2 días adicionales para alcanzar el peso de sequía (Figura 38).

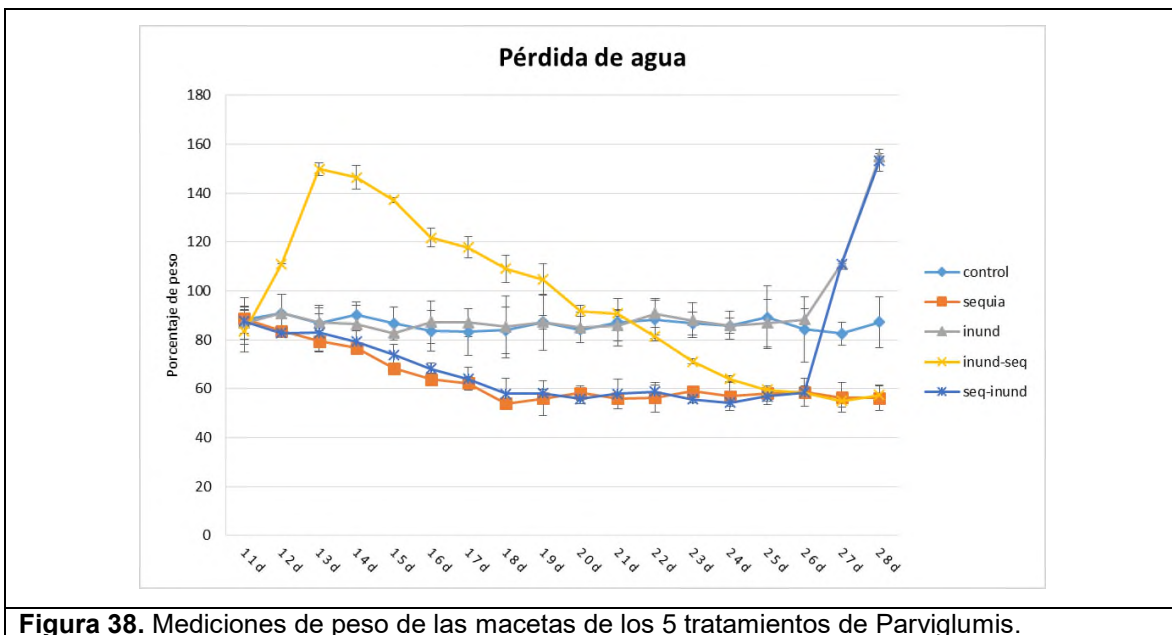


Figura 38. Mediciones de peso de las macetas de los 5 tratamientos de Parvigitum.

Con respecto al resto de los tratamientos, el de sequía inició al día 11 y terminó el día 28; el de inundación se realizó del día 26 al 28. El tratamiento secuencial de seq- inundación tomó del día 11 al 26 en sequía, para después inundar del día 26 al 28.

Las plantas se colectaron el día 28 al finalizar todos los tratamientos. A las macetas que finalizaron con inundación se le permitió drenar el exceso de agua por 10 min para hacer la colecta y proceder a la extracción de RNA.

6.5 Calidad del RNA para la construcción de bibliotecas

El RNA total se verificó en gel desnaturalizante de agarosa al 1% (Figura 39). En el gel se puede ver la integridad por definición de los RNA ribosomales 28S y 16S, superior e inferior respectivamente.

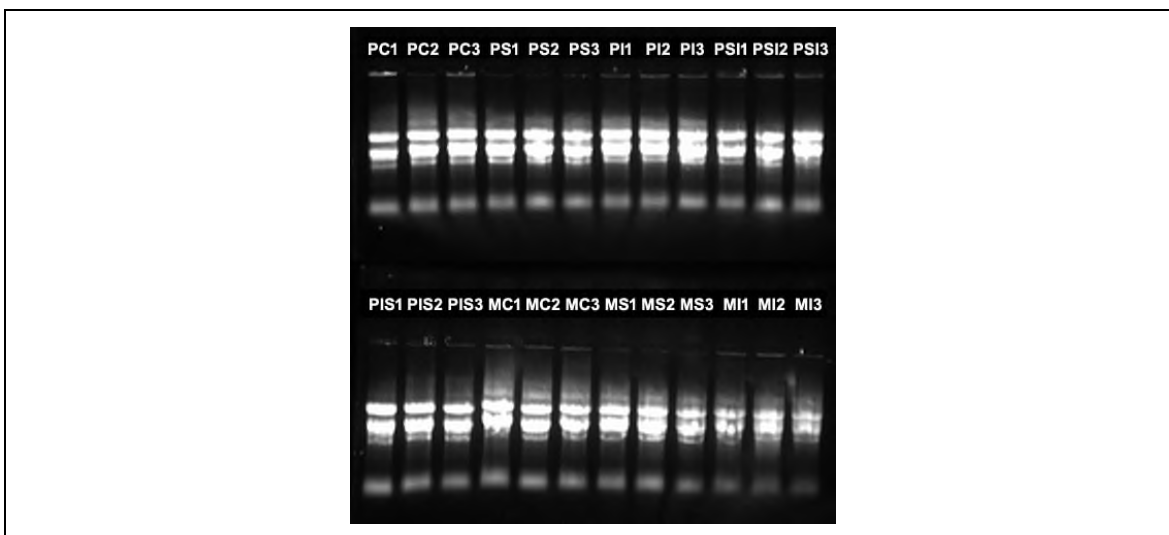


Figura 39. Verificación de integridad del RNA total de maíz y Parviglumis y sus tratamientos. Electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa 1%. En cada carril se observan dos bandas definidas las cuales son RNA ribosomal 28S y 16S. No se observa degradación de RNA. PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; PSI: Parviglumis Sequía-Inundación; MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía.; los números 1,2 y 3 se refiere a replicas.

Las extracciones mostraron buena integridad y cantidad adecuada para ser usadas en la preparación de bibliotecas (Tabla 20).

Adicionalmente, las mediciones del Nanodrop nos confirman la calidad de la extracción ya que las relaciones 260/280 son cercanas a 2, lo cual indica RNA con buena pureza. El valor aceptable de 260/230 para definir ácido nucleico puro es de 2.0-2.2 algunas de las muestras están por debajo de ese valor lo que indica la presencia de carbohidratos o fenol proveniente del trizol usado para la extracción.

Tabla 20. Cuantificación del RNA total en el Nanodrop.

Código	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
PC1	1842.1	2.08	1.39
PC2	5087.2	2.09	1.92
PC3	4776.4	2.06	1.9
PS1	4059.7	2.12	1.65
PS2	4687.8	2.07	1.9
PS3	4874.3	2.08	1.68
PI1	4471.7	2.05	1.89
PI2	4205.7	2.04	1.76
PI3	3556.4	2.07	1.76
PSI1	3791.3	2.07	1.94
PSI2	4245.7	2.06	1.79
PSI3	3696.8	2.05	1.76
PIS1	5535.5	2	1.61
PIS2	3780.6	2.03	1.47
PIS3	4718.3	1.99	1.45
MC1	5625.8	2.04	1.82
MC2	5189.8	2.05	1.78
MC3	7423	2.08	1.94
MS1	7631	2.08	1.77
MS2	7370.3	2.08	1.84
MS3	6988	2.08	1.93
MI1	5528.1	2.02	1.92
MI2	5711.1	2	1.73
MI3	5238.4	2.03	1.73

6.6 Generación de bibliotecas de pequeños RNAs y análisis de su calidad

6.6.1 Productos de construcción

El proceso de construcción de las bibliotecas comenzó con la purificación de RNAs pequeños a partir del RNA total. La extracción se realizó mediante una electroforesis en gel de acrilamida desnaturizante seleccionando la fracción de 20-30 nt, como se muestra en la Figura 40 para las muestras de teocintle. Resultados similares se observaron para las muestras de maíz.

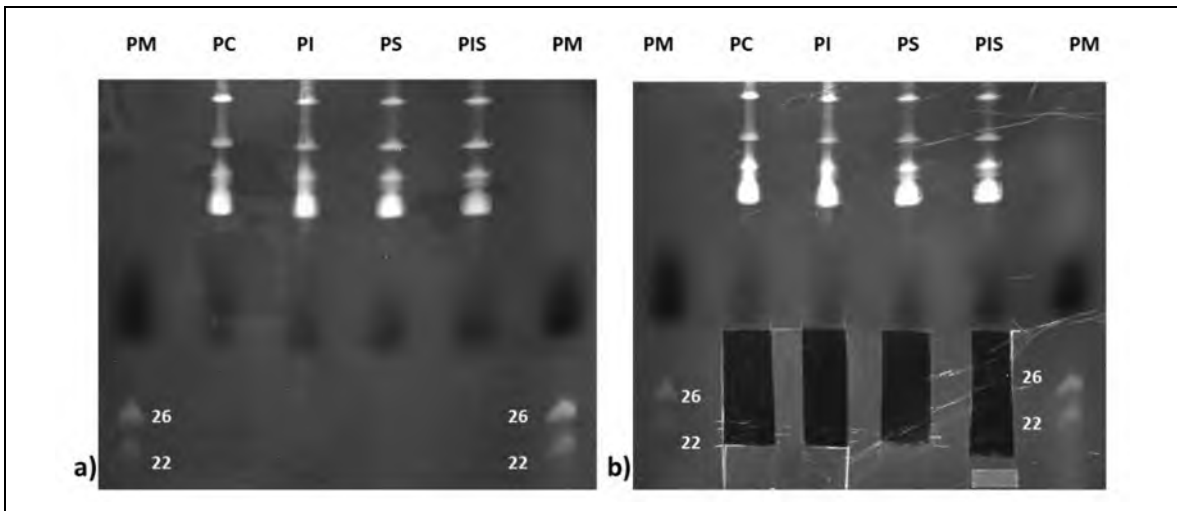


Figura 40. Fracción de RNAs pequeños entre 20-30 nt en gel de acrilamida 15% desnaturante. Como peso molecular (PM) se usó RNA de 22 y 26 nt. a) gel sin procesar, no se observan bandas o barrido entre 22 y 26; b) Corte del gel aproximado a 20-30 nt. PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía.

Se continuó con la ligación del adaptador LINKER1 a los RNAs pequeños purificados. El producto de la ligación fue separado en gel desnaturante y se purificó la fracción correspondiente a 36-46 nt, que correspondía al tamaño esperado (Figura 41).

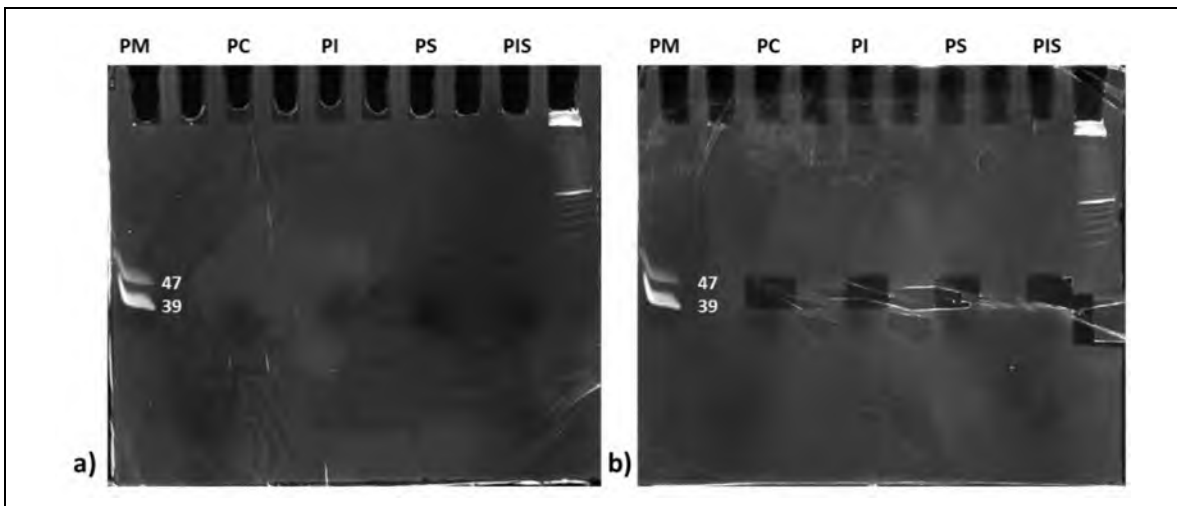


Figura 41. Gel de acrilamida 15% desnaturante para separar los productos de la primera ligación de pequeños RNAs y el adaptador LINKER1. Como peso molecular se usaron oligos de tamaño 39 y 47 nt. a) gel sin procesar; b) corte del gel en aproximadamente 36-46 nt. PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía.

Los productos purificados se ligaron al adaptador ILLUMINA5 y posteriormente se emplearon para la síntesis de cDNA. En las Figura 42 se muestran los productos de las bibliotecas en un gel de acrilamida. Algunas bibliotecas mostraron más de un producto para el tamaño esperado de la construcción aproximadamente 165 nt éstos fueron purificados a partir de gel y procesados para analizarlos.

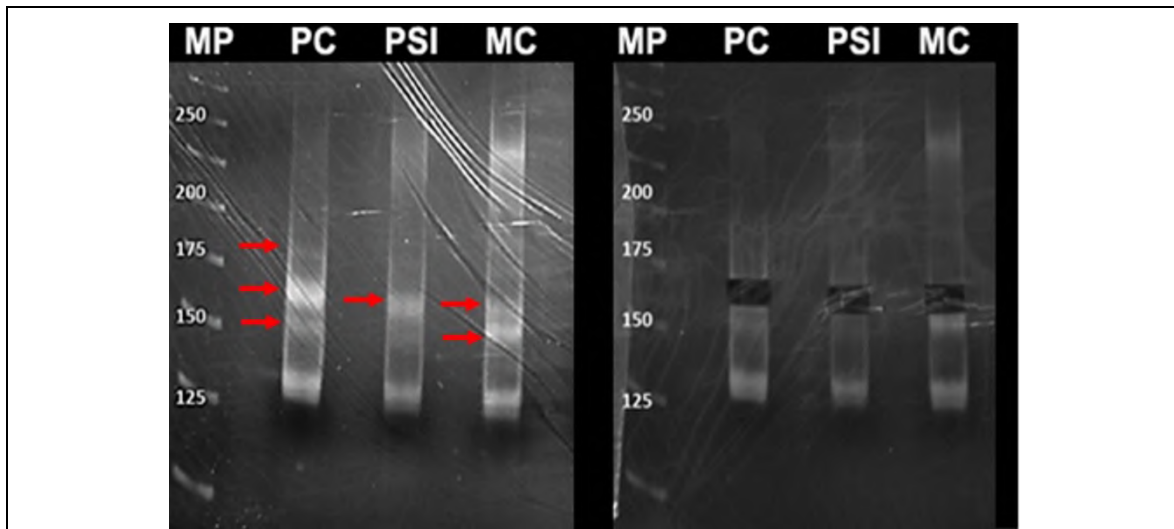


Figura 42. Gel de acrilamida de los productos de amplificación de tres bibliotecas. Se observan tres bandas para la biblioteca de PC (Parviglumis Control), una sola banda para PSI (Parviglumis Sequía-Inundación), y dos bandas para MC (Maíz Control). MP: Marcador de peso molecular. Se recuperó la banda de ~165 nt.

En la biblioteca de PC se observan tres bandas, pero la banda mayor a 175 nt excede el tamaño esperado de la construcción. Ya que se desconocía cuál banda era la indicada para la secuenciación, se seleccionaron dos bibliotecas: PC para recuperar el producto superior a 175 nt/banda grande y MC aportó el producto ~165 nt/banda mediana y de tamaño aproximado a 150 nt/banda chica (MbC) para posteriormente verificar las construcciones mediante digestión y secuenciación capilar de los fragmentos.

En la Figura 43 se muestran otras bibliotecas que presentaron más de una banda sin embargo todas la mostraron mayor intensidad de la banda de ~165 nt.

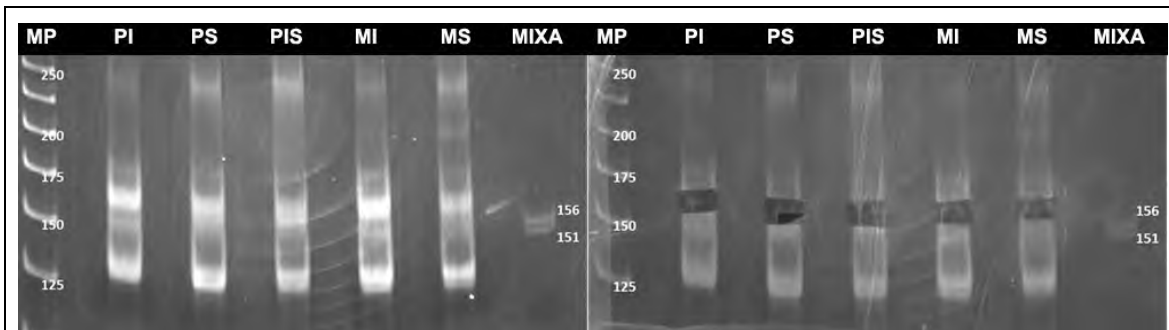


Figura 43. Gel de acrilamida de los productos de amplificación de cinco bibliotecas. Se observan tres bandas para la biblioteca de PI, dos bandas para PS, una banda para PIS, tres bandas para MI y una banda para MS. MIXA: Marcador de peso molecular de 151 y 156 b. PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía.

Cada producto recuperado se reamplificó y se volvió a purificar a partir del gel de acrilamida 6% nativo. En la Figura 44 se observan los productos de reamplificación seleccionados para clonar en el vector.

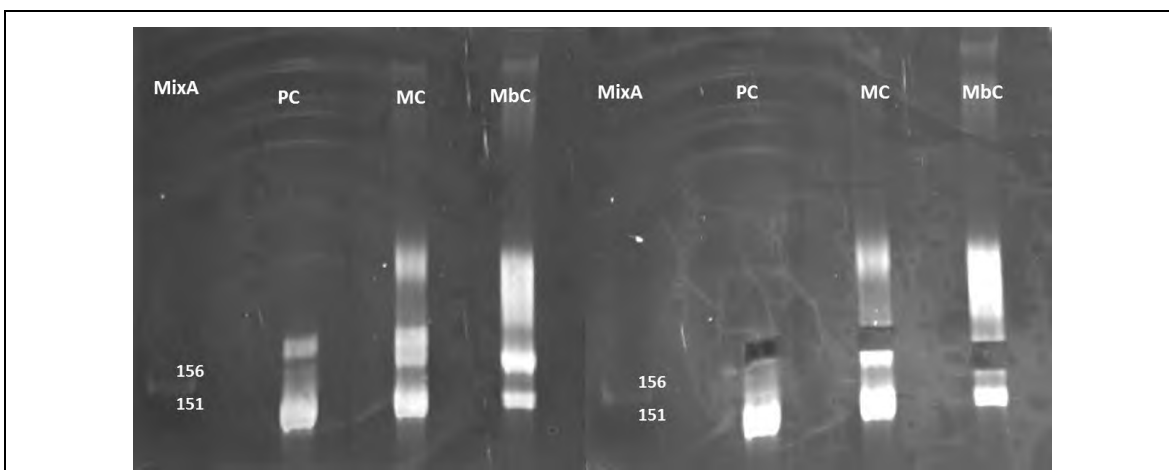


Figura 44. Gel de acrilamida 6% nativo mostrando la reamplificación de los productos recuperados para clonación. La biblioteca de Parviglumis control (PC) se seleccionó para recuperar la banda superior a 175 nt. De maíz control (MC) el producto de 150-175 nt y el de tamaño aproximado a 150 nt (MbC).

Los subproductos son un problema recurrente en la preparación de bibliotecas de pequeños RNAs como lo muestra Shore *et al* (2016). Los tamaños diferentes a ~165 nt son dimerización de adaptadores o construcciones vacías. Como se explicó en la sección 5.8.5 el adaptador ILLUMINA5 no tiene modificaciones en los extremos para evitar que se unan entre ellos o con pequeños RNAs-LINKER1 (Figura 45).

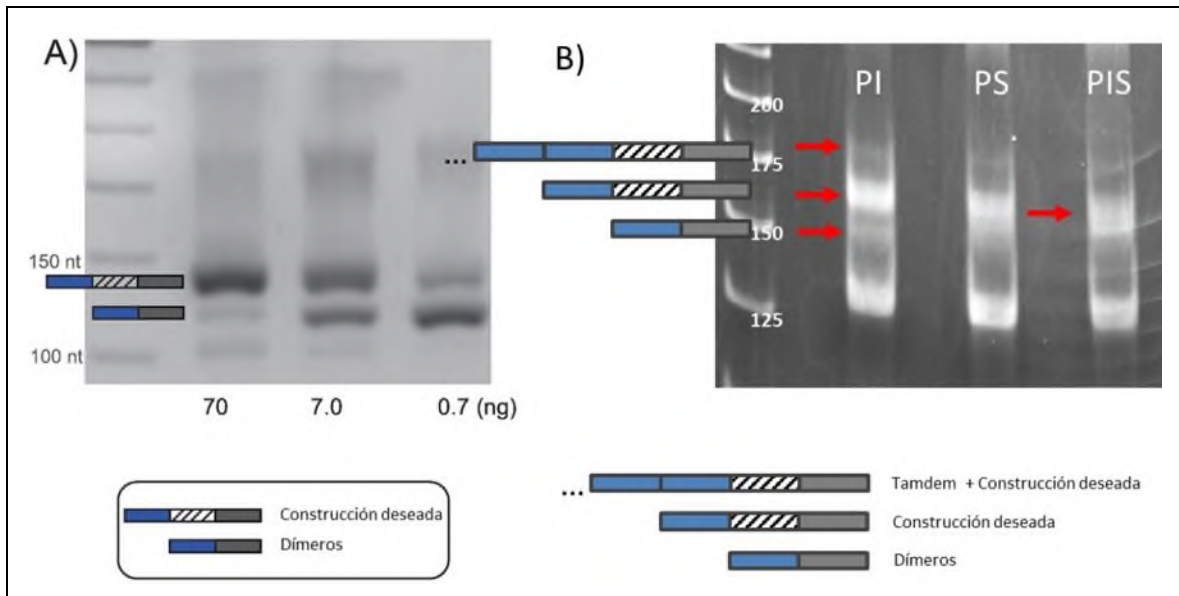


Figura 45. Subproductos de la construcción de bibliotecas de pequeños RNAs. A) Gel de agarosa 4% usando diferentes cantidades de RNA de cerebro (Shore *et al*, 2016); B) Gel de acrilamida 6% de bibliotecas de Parviglumis. En ambos resultados se observan subproductos y construcciones vacías. PI: Parviglumis Inundación; PS; Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía.

6.6.2 Análisis preliminar de las bibliotecas.

Los productos purificados se ligaron en el vector pGEM-T y se insertaron en *E. coli*, para posteriormente extraer plásmido y realizar reacciones de restricción con EcoRI. El vector pGEM-T el extremo 3' y 5' tiene un sitio de restricción por EcoRI (Anexo 3). La construcción de las bibliotecas también tienen un sitio de corte de EcoRI oligo Bridge RT el cual se señala en la Figura 55.

Los tamaños de los productos de digestión con EcoRI dependieron de la dirección en la que se ligaron las secuencias de las bibliotecas. Los productos probables de la reacción de digestión usando la enzima EcoRI se muestran en la Figura 46.

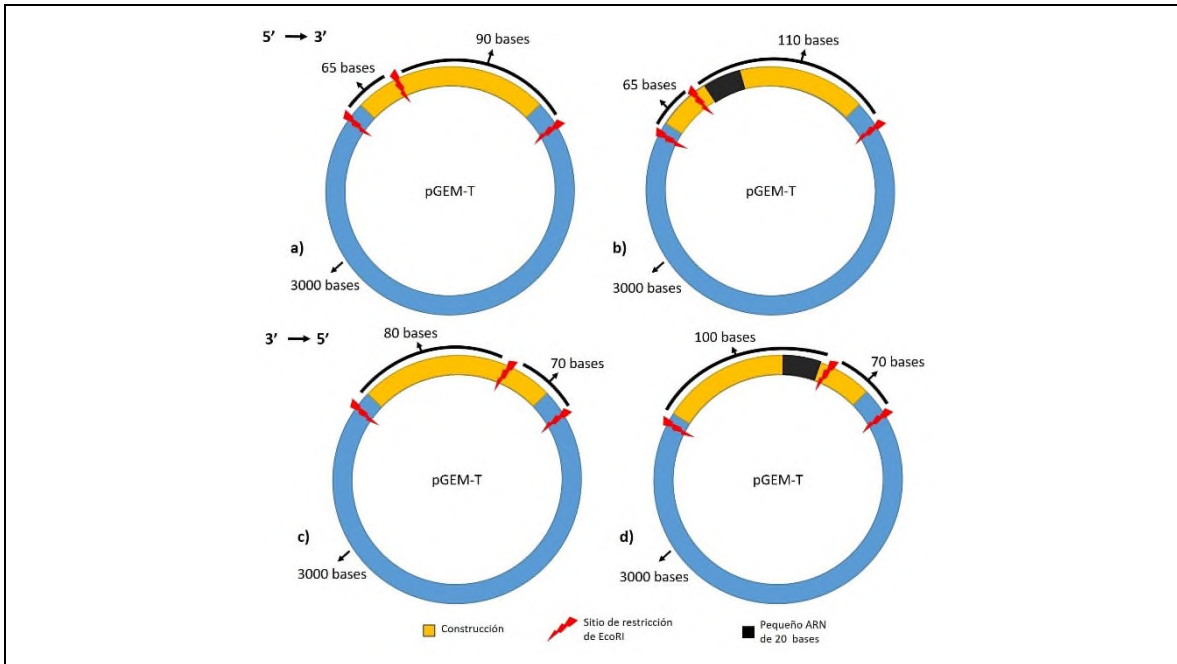


Figura 46. Posibles productos de la digestión con EcoRI de las secuencias de la biblioteca ligados al plásmido.

a) Producto vacío de la biblioteca ligado en dirección 5'—3'; b) producto de la biblioteca con RNA de 20 nt ligado en dirección 5'—3'; c) producto vacío de la biblioteca ligado en dirección 3'—5'; d) producto de la biblioteca con RNA de 20 nt ligado en dirección 3'—5'.

En la Figura 47 se muestran los fragmentos de digestión separados en geles de acrilamida 6% nativo.

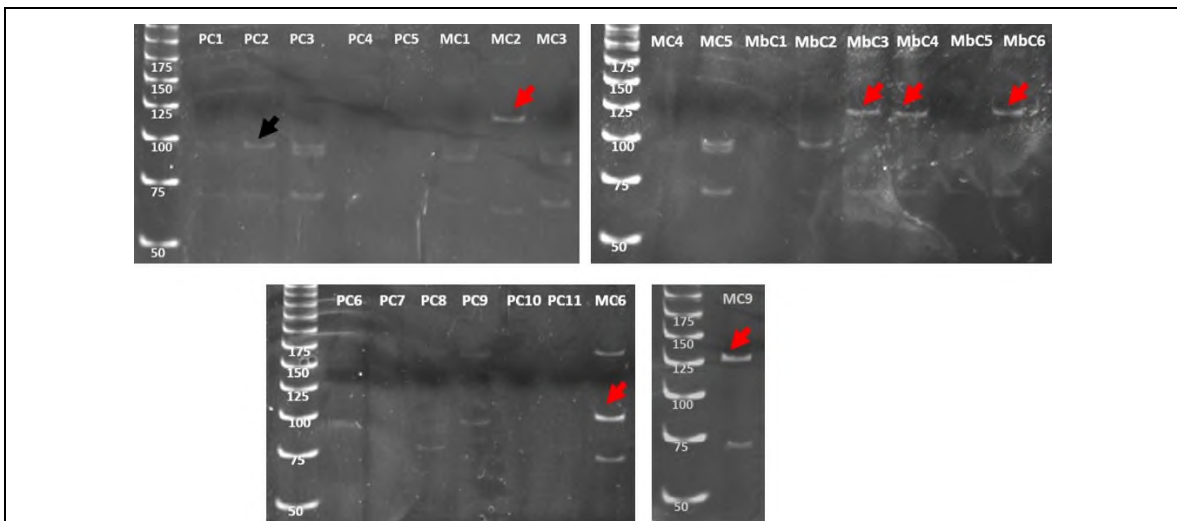


Figura 47. Productos de digestión con EcoRI en geles de acrilamida 6% nativo.

Con la flecha roja se señalan las construcciones que incluyen un fragmento de 20 nt, en color negro producto de la biblioteca vacío. PC: Parvigliumis Control banda grande; MC: Maíz Control banda mediana; MbC: Maíz Control banda chica.

De acuerdo al tamaño esperado, los productos de MC2, MC6, MC9, MbC3, MbC4, MbC6 mostraron fragmentos que suman ~170 nt que se representa en la Figura 46 inciso b. Los productos de PC resultaron construcciones vacías.

De los fragmentos de MC6 se observa un producto de tamaño cercano a 175 nt, esto puede deberse a una baja eficiencia de digestión de la enzima EcoRI cortando los extremos del plásmido y no sobre la región del Bridge RT.

Se seleccionaron en 33 plásmidos para secuenciación capilar algunos de la digestión con EcoRI como PC2, PC3, PC6, PC8, PC9, PC11, MC1, MC2, MC3, MC5, MC6, MC9, MbC2, MbC3, MbC4, MbC6, MbC7, MbC9, MbC10, MbC11 y otros más se agregaron a lista seleccionados mediante amplificación y visualización de los productos en geles de acrilamida. Se realizó alineamiento múltiple a las secuencias usando ClustalW (BioEdit) para identificar a los insertos. En la Figura 48 se muestra el resultado del alineamiento de las 33 secuencias.

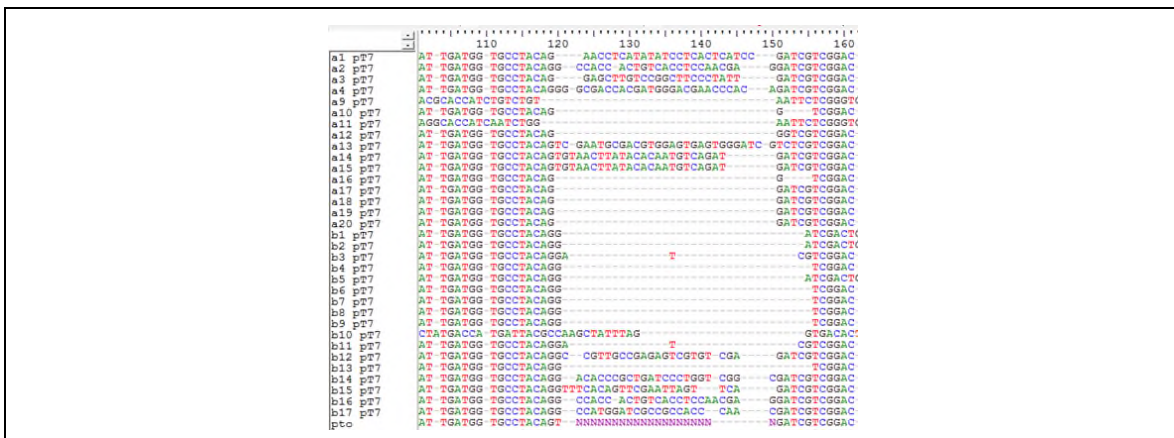


Figura 48. Alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas. La última secuencia con nombre 'pto' representa la construcción deseada de un fragmento de 20 nt.

20 plásmidos resultaron vacíos y 13 con un inserto mayor a 10 nt. La obtención de secuencias vacías está relacionada con el tamaño de las bandas purificadas de las bibliotecas con más de un producto. En la Tabla 21 se presentan el análisis de las secuencias por banda.

Tabla 21. Resultados de secuenciación Sanger en base al tamaño de las bandas purificadas.

Banda	Plásmidos secuenciados	Inserto mayor a 10 nt
Chica	10	10
Mediana	18	3
Grande	5	0

Con los datos de secuenciación se determinó que los productos de la banda grande estaban vacías, y que las bandas chica y mediana contenían insertos de 20 nt. Se identificaron las secuencias usando la herramienta de BLAST (NCBI), especificando la búsqueda para *Zea mays var. mays* los resultados con Evalue menor a 1 se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Identificación de las secuencias de bibliotecas de maíz.

Banda	Secuencia	Longitud	Identificación	Evalue (BLAST)
Chica	CCATGGATCGCCGCCACCCAAC	22	Transposon	0.29
Chica	GGCGACCACGATGGGACGAA	20	CDS parcial	0.29
Mediana	CGAATGCGACGTGGAGTGAG	20	Gen TGA1	0.001

Aunque con banda chica obtuvimos insertos mayores a 10 nt ninguno de ellos fue identificado con pequeños RNAs. En la sección 6.7 6.7.1 describimos que a través de secuenciación masiva la banda chica tiene alto porcentaje (>80%) de construcciones vacías. Las secuencias de la Tabla 22 también fueron analizadas en la página miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>) usando BLAST contra la base de datos de miRNAs de todas las plantas. No hubo coincidencia con alguna secuencia de miRNAs sin embargo, no se descarta que las bibliotecas contengan miRNAs debido a que este análisis de bibliotecas se realizó en *Brachypodium distachyon* y dos secuencias de la banda mediana tuvieron identidad con pequeños RNAs (Figura 49 y Tabla 23).

C18	TTGATGGTGCCTACAG	-----	CAGAGCTCCCTTCAATCCAAAGATCGTCGGACTGTAGAA
C3	TTGATGGTGCCTACAG	-----	CAGTCAAGAAAGCCTGTGGAGATCGTCGGACTGTAGAA
ConstruccionFinal	TTGATGGTGCCTACAG	TNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NGATCGTCGGACTGTAGAA

Figura 49. Alineamiento de secuencias de bibliotecas de *Brachypodium distachyon*.

Tabla 23. Identificación de las secuencias de bibliotecas de *Brachypodium distachyon*.

Banda	Secuencia	Longitud	Identificación	Evalue (BLAST)
Mediana	CAGTTCAAGAAAGCCTGTGGA	21	Bdi-miR159b	1e-04
Mediana	CAGAGCTCCCTTCAATCCAAA	21	Bdi-miR 396a	1e-04

El análisis preliminar de las bibliotecas definió que la banda mediana contenía la construcción deseada. Con este resultado se reanudó la generación de las bibliotecas considerando que el producto a purificar sería el tamaño ~165 nt (Figura 50).

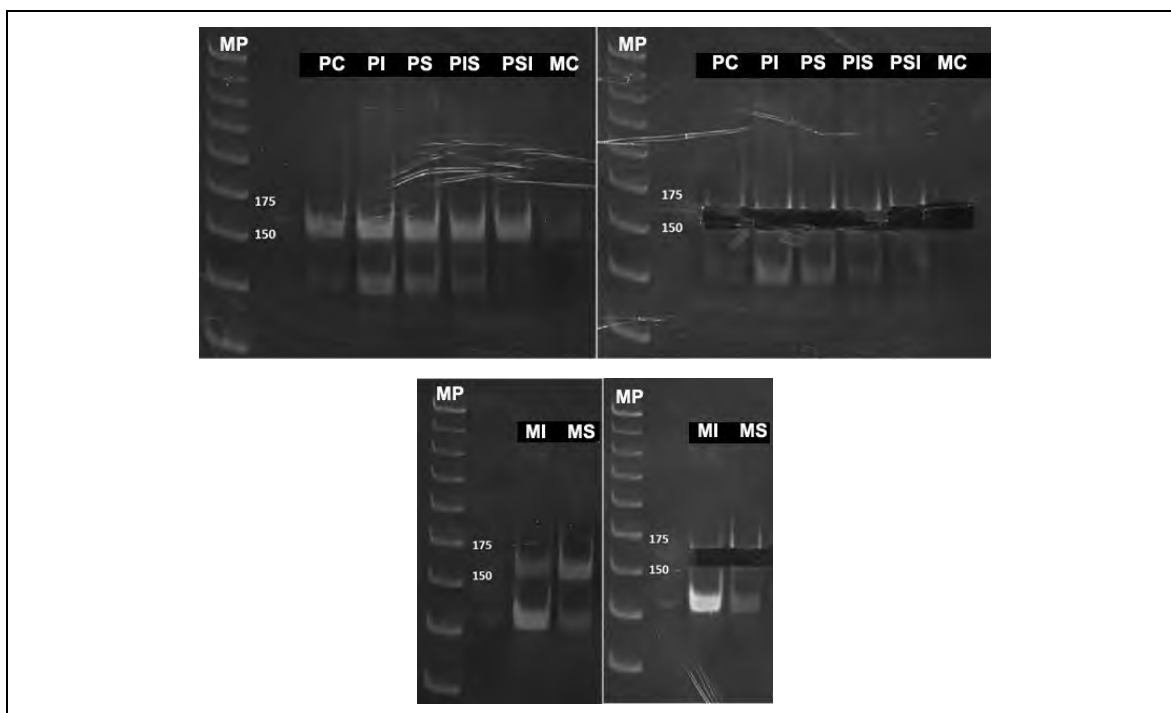


Figura 50. Purificación de los productos de las bibliotecas Parviglumis y maíz a partir de gel de acrilamida 6%.

Se recuperó el producto con tamaño aproximado de 165 nt. MP: Marcador de peso molecular, PC: Parviglumis Control, PI: Parviglumis Inundación, PS: Parviglumis Sequía, PIS: Parviglumis Inundación Sequía, PSI: Parviglumis Sequía Inundación, MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía

Se purificó la banda de entre 150 y 175 bases y se corrió un gel adicional para corroborar un solo producto (Figura 51).

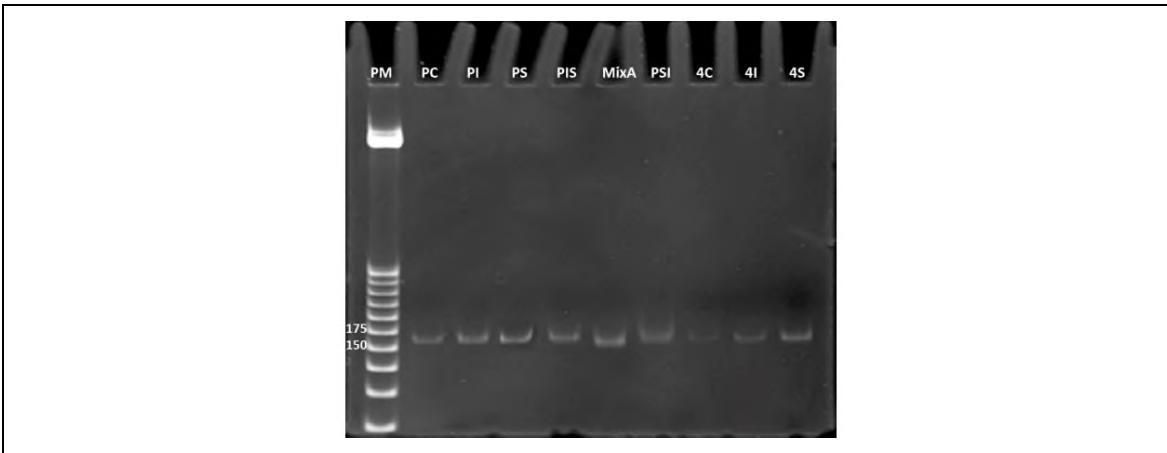


Figura 51. Confirmación de un producto después de la purificación de las bibliotecas de Parvigitumis y maíz con un tamaño entre 150 y 175 bases.

MP: Marcador de peso molecular, PC: Parvigitumis Control, PI: Parvigitumis Inundación, PS: Parvigitumis Sequía, PIS: Parvigitumis Inundación-Sequía, MixA: Marcador de 156 y 151 nt, PSI: Parvigitumis Sequía-Inundación, MC: Maíz Control, MI: Maíz Inundación, MS: Maíz Sequía.

Como prueba final de calidad, una parte de las bibliotecas de PC, PS, PSI y MI se clonaron y se realizaron digestiones con EcoRI, como se muestra en la Figura 52 la mayoría de los fragmentos suman más de 170 nt indicando que prestan insertos el resto de evidencia se muestra en el Apéndice E.

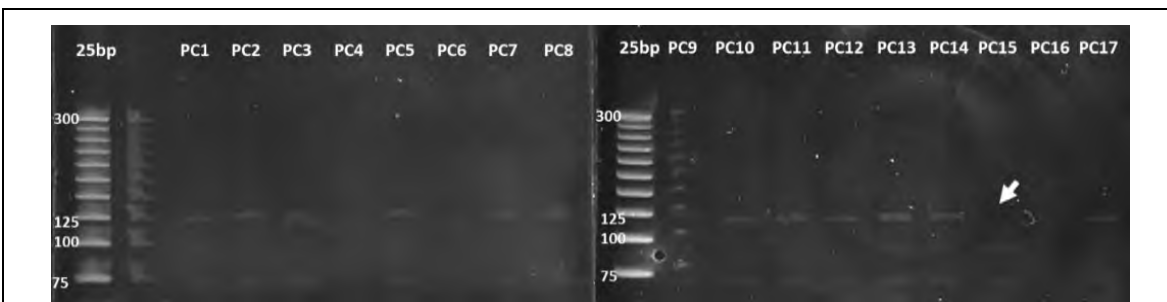


Figura 52. Productos de digestión de la biblioteca PC (Parvigitumis Control) usando EcoRI.

La mayoría de los productos son productos con inserto de al menos 20 nt, excepto el inserto del plásmido PC15, que resultó vacío (señalado con la flecha blanca).

6.6.3 Análisis de calidad, tamaño y concentración de las bibliotecas.

Las bibliotecas se enviaron al Instituto para la Biología Integral del Genoma de la Universidad de California-Riverside (UCR). El equipo técnico de ahí cuantificó la masa molar de las bibliotecas y determinaron el tamaño mediante el equipo Bioanalyzer (Agilent) (Figura 53).

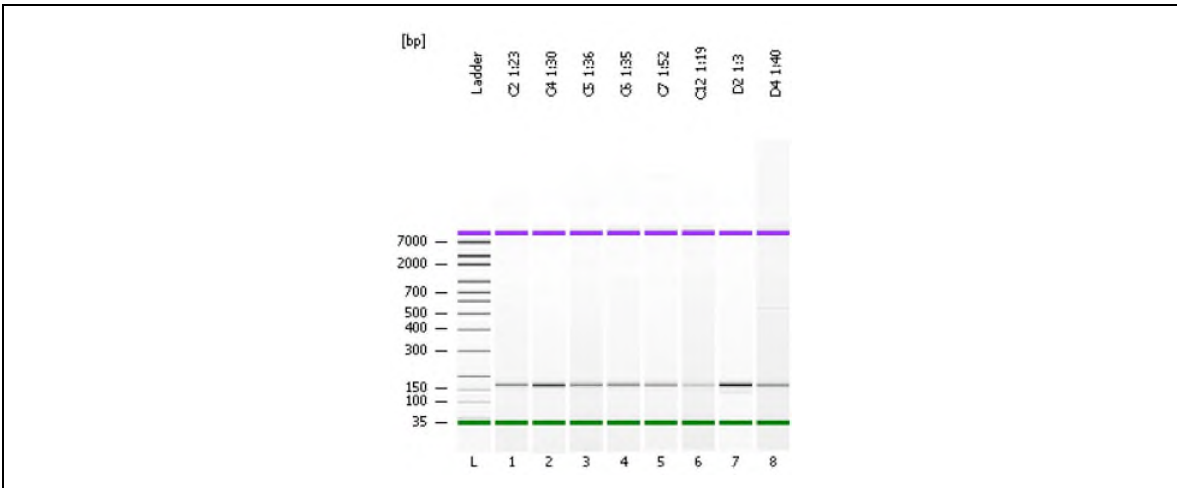


Figura 53. Gel digital de las bibliotecas, en el que se confirma la presencia de un producto entre 150 y 175 nt.
 C2: Parviglumis Control; C4: Parviglumis Inundación; C5: Parviglumis Sequía; C6: Parviglumis Inundación-Sequía; C7: Parviglumis Sequía-Inundación; C12: Maíz Control; D2: Maíz Inundación; D4: Maíz Sequía.

En el reporte mediante electroferogramas se confirma que las bibliotecas contienen productos únicos en el espectro de tamaño ~165 nt (Figura 54).

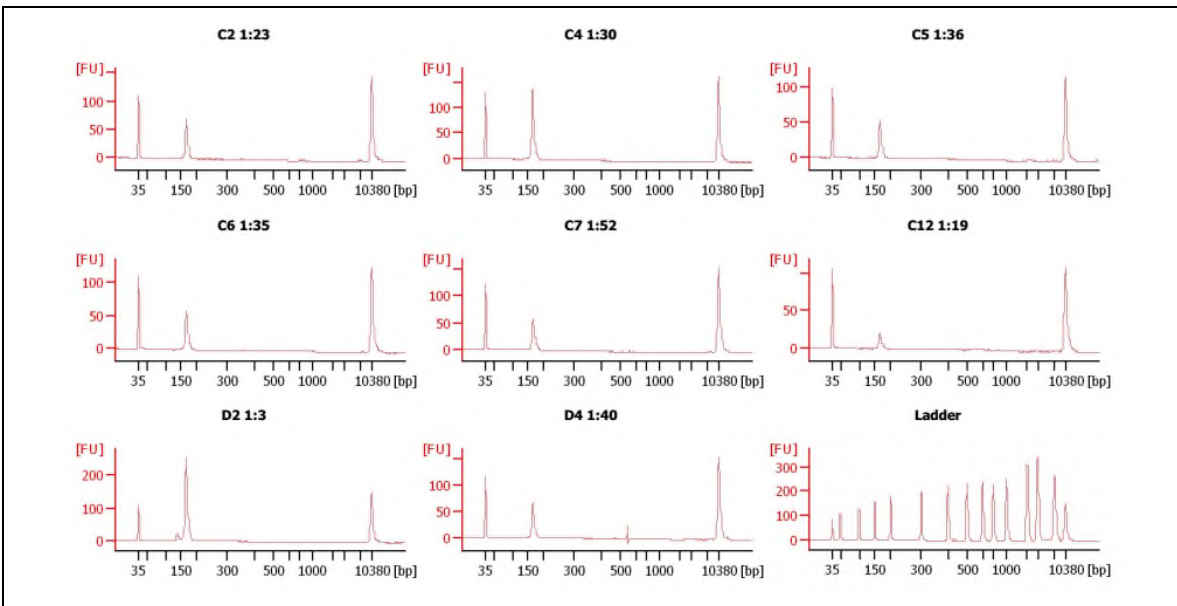


Figura 54. Electroferograma de las bibliotecas de Parviglumis y maíz mostrando un producto cercano a 150 nt.
 C2: Parviglumis Control; C4: Parviglumis Inundación; C5: Parviglumis Sequía; C6: Parviglumis Inundación-Sequía; C7: Parviglumis Sequía-Inundación; C12: Maíz Control; D2: Maíz Inundación; D4: Maíz Sequía.

El equipo Bioanalyzer generó el cálculo de concentración molar y en peso para cada biblioteca en base al área de los picos en el electroferograma. Con estos valores y el factor de dilución se calcularon las concentraciones finales de las bibliotecas para realizar los ajustes de normalización y mezcla de las mismas. Para calcular la concentración final (*Cf*) se usó la ecuación 6:

$$Cf = \frac{(Concentración)(factor\ de\ dilución)}{1000} \quad \text{Ec. 6}$$

Las concentraciones determinadas por Bioanalyzer y las finales se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Concentraciones finales de las bibliotecas.

Muestra	Conc. [pg/μL]	Molaridad [pmol/L]	Factor de dilución	Conc. Final [μg/μL]	Molaridad Final [μmol/L]
C2	122.3	1106	23	2.8129	25.438
C4	226.1	2062.1	30	6.783	61.863
C5	126.17	1142	36	4.54212	41.112
C6	122.64	1104.5	35	4.2924	38.6575
C7	110.12	994.7	52	5.72624	51.7244
C12	44.13	400.5	19	0.83847	7.6095
D2	495	4547.3	3	1.485	13.6419
D4	117.75	1072.3	40	4.71	42.892

C2: Parvigitumis Control; C4: Parvigitumis Inundación; C5: Parvigitumis Sequía; C6: Parvigitumis Inundación-Sequía; C7: Parvigitumis Sequía-Inundación; C12: Maíz Control; D2: Maíz Inundación; D4: Maíz Sequía.

6.7 Análisis bioinformático

Las bibliotecas generadas se secuenciaron en el equipo Illumina HiSEQ2500 de la UCR, empleando los siguientes parámetros 1 X 51 X 7 ciclos, lo cual significa: 1; lectura individual únicamente desde el extremo 5'), 51; la longitud de las bases secuenciadas y 7 el número de ciclos para identificar el índice del extremo 3'. Después de la secuenciación, el software del equipo Illumina realizó la separación de secuencias de acuerdo a su índice y registró parámetros de calidad de la corrida de secuenciación. Las regiones que se secuenciaron en el equipo de Illumina se muestran en la Figura 55.

Adicionalmente a estas bibliotecas, 2 más se secuenciaron en LANGEBIO para ese momento no contábamos con el análisis preliminar por lo tanto desconocíamos el tamaño del producto a purificar. Las lecturas que enviamos al servicio secuenciación masiva fueron de Parviglumis control e inundación ambas de la banda chica ~150 nt, PC(1) y PI(1) respectivamente.

6.7.1 Análisis de calidad de las secuencias obtenidas

El programa FastQC calcula el promedio de calidad de las bases y grafica los valores en cajas con percentiles. La calidad de las bibliotecas superó el valor de 30 esto representa una probabilidad de error de base 1 en 1000 o una exactitud de 99.9% (Figura 56).

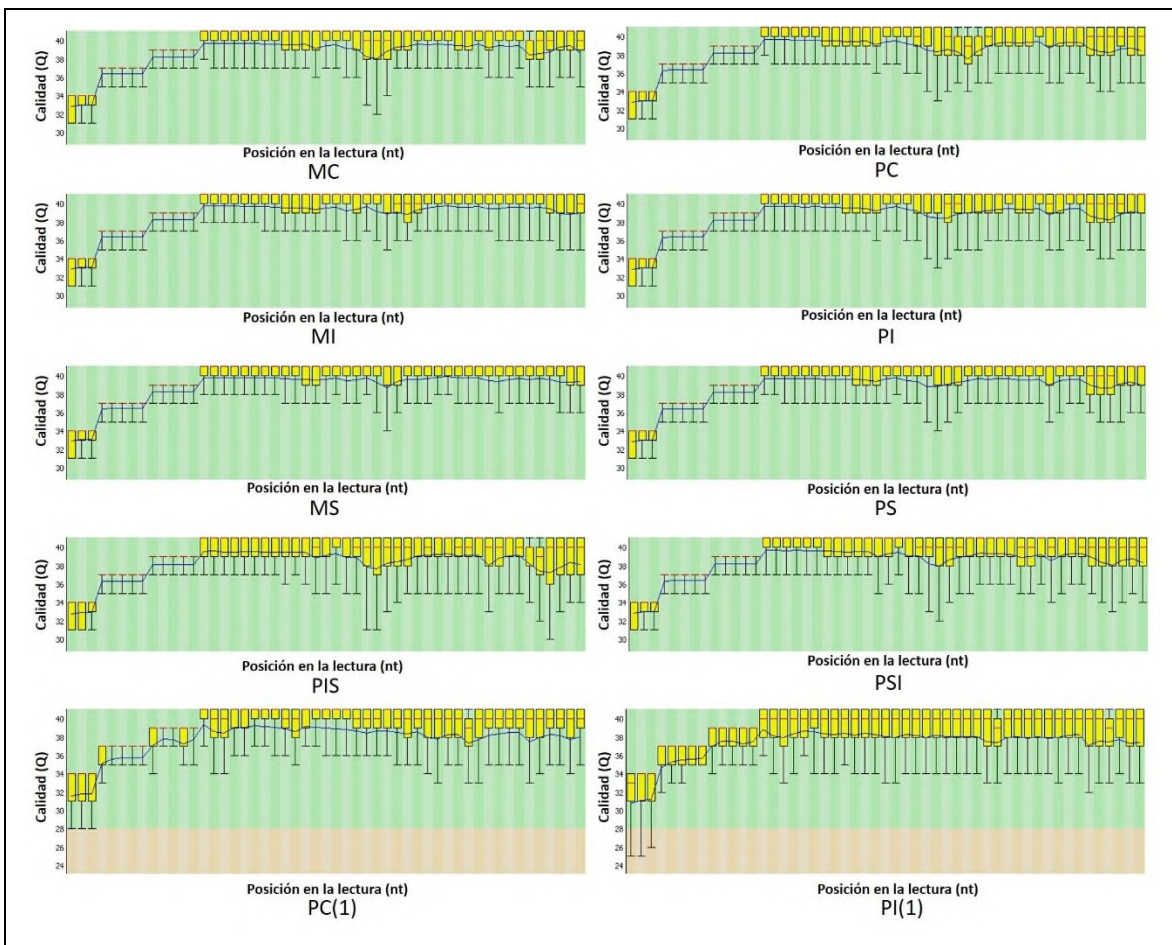


Figura 56. Gráfico de calidad de las bibliotecas con promedio $Q > 30$. Se usó el software fastQC en bibliotecas de PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; PSI: Parviglumis Sequía-Inundación; MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC(1): Parviglumis Control-previo; PI(1): Parviglumis Inundación-previo.

Como podemos observar en la Figura 56, PC(1) y PI(1) muestran límites de calidad inferiores a 30 al inicio de la secuencia.

El gráfico de contribución de nucleótidos resultado de CLC muestra el porcentaje de la variabilidad de las bases a través de la secuencia (Figura 57).

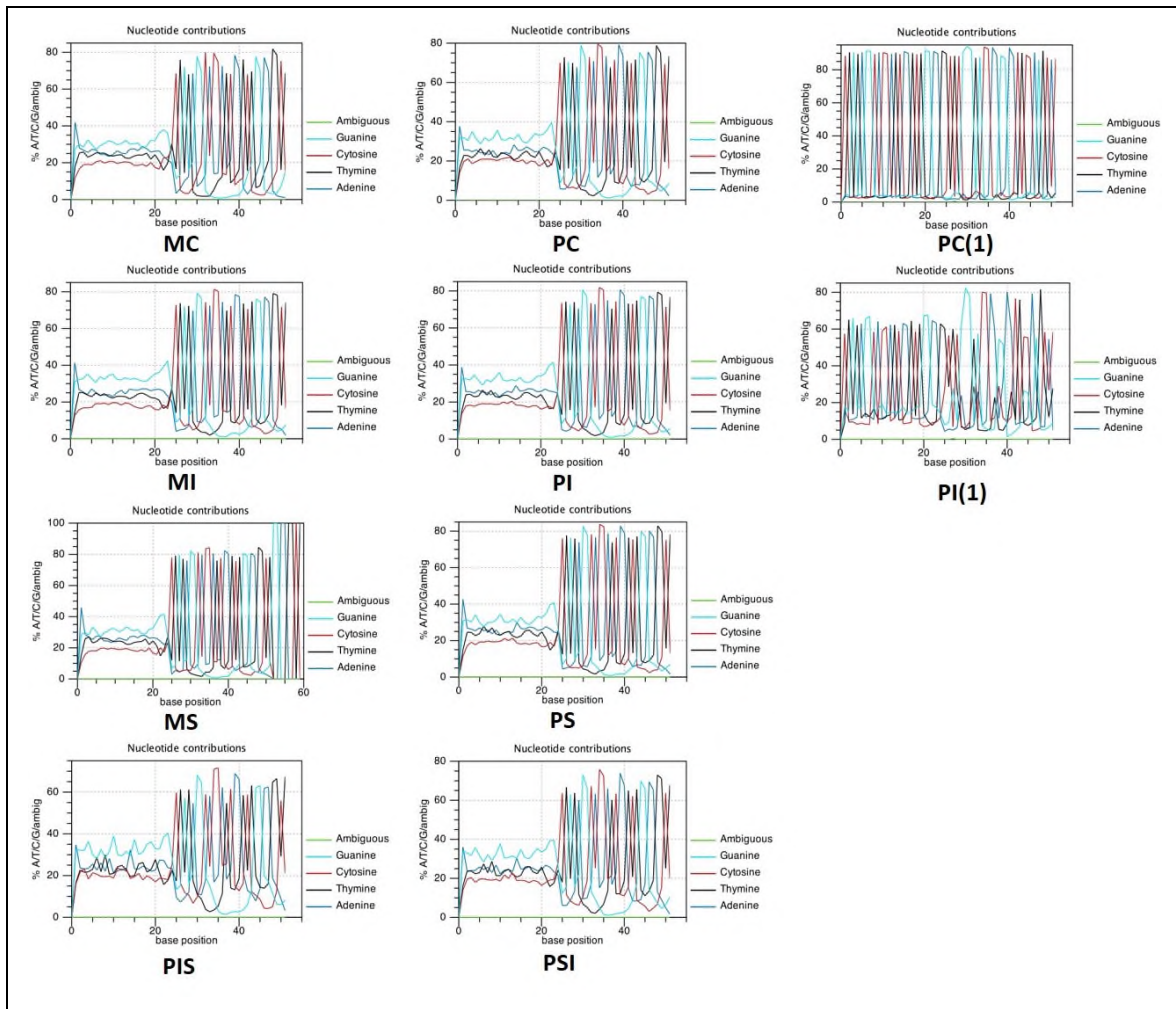


Figura 57. Gráfico de contribución de nucleótidos de las bibliotecas realizado con el programa CLC.

Las primeras dos columnas corresponden a las bibliotecas construidas después del análisis preliminar de las bandas y se observa que las 25 posiciones iniciales tienen baja uniformidad por el contrario las bibliotecas PC(1) y PI(1) presentan alta uniformidad de las bases desde el inicio de la secuencia. PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; PSI: Parviglumis Sequía-Inundación; MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC(1): Parviglumis Control-previo; PI(1): Parviglumis Inundación-previo.

En las bibliotecas se aprecia que hasta la posición 25 tienen baja uniformidad, es decir, que existe una alta variabilidad de bases, esto se entiende como diferentes bases desde 1 hasta

la 25 debido al inserto de 20 nt. Posteriormente a esa posición se observa uniformidad, indicando que se trata de las mismas bases correspondientes al LINKER1 y parte del oligo Bridge RT (Figura 58).

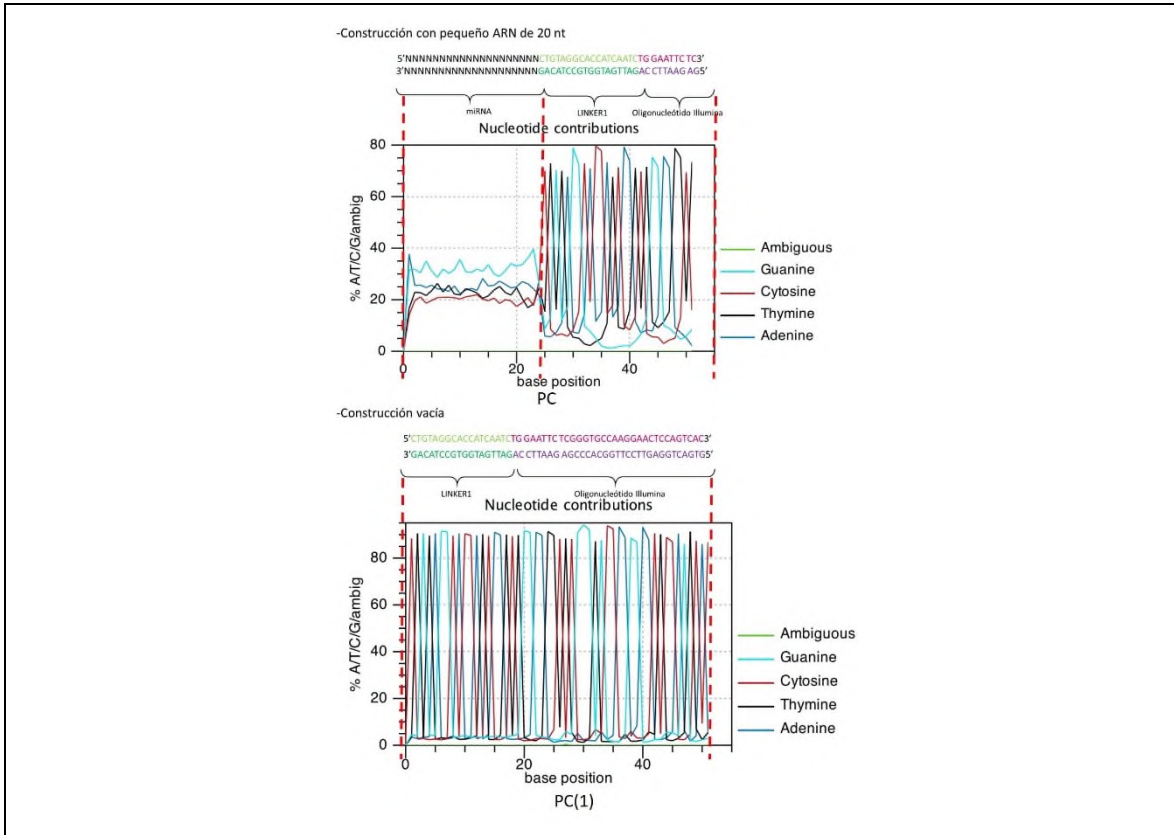


Figura 58. Comparación de la construcción con insertos y vacío con gráficos de contribución. Se distingue que la biblioteca PC tiene baja uniformidad en las primeras 25 bases correspondiendo a fragmentos de ~20 nt, mientras que la PC(1) tiene alta uniformidad desde la primera base indicando sin inserto. PC: Parvoglumis Control; PC(1): Parvoglumis Control-previo.

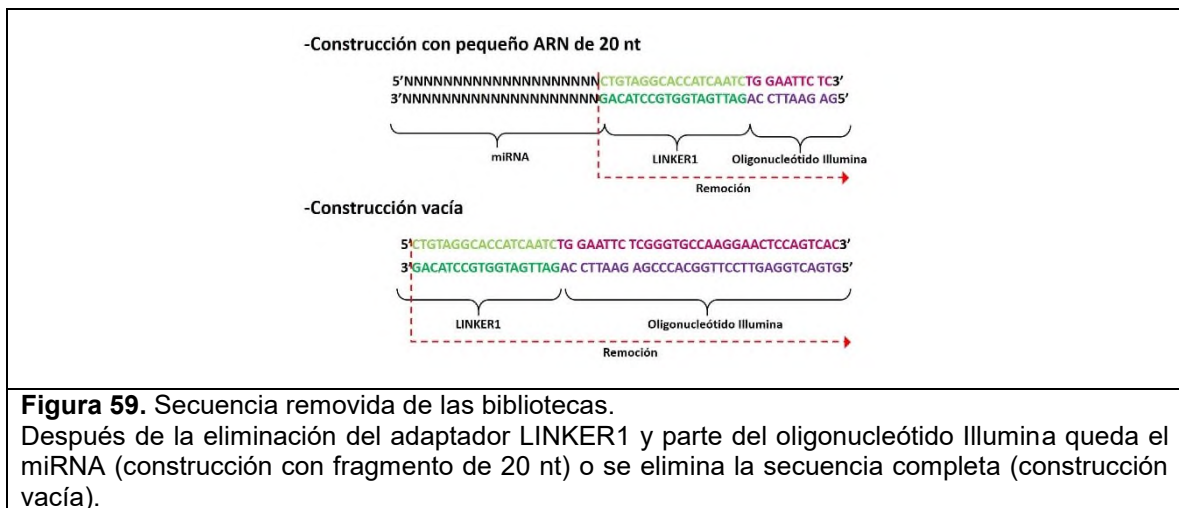
Dado que los resultados de contribución de nucleótidos de las bibliotecas PC(1) y PI(1) mostraron alta uniformidad de las bases a partir de aquí se describen como bibliotecas malas. Datos similares usando 100 ng y 10 ng de RNA muestran que el uso de menor cantidad de masa genera mayor cantidad de dímeros o construcciones vacías (Shore *et al*, 2016) nosotros usamos la misma cantidad de masa para preparar las bibliotecas secuenciadas en UCR y las malas.

6.7.2 Depuración de las bibliotecas

La depuración de las bibliotecas consistió en remover el adaptador LINKER1 y filtrar las lecturas empleando bases de datos de maíz. Los gráficos presentados en cada paso de la depuración corresponden a valores promedio de las bibliotecas en el Apéndice C se muestran de forma individual o agrupados por tratamiento.

6.7.2.1 Remoción del adaptador y filtrado de lecturas entre 18 y 35 nt.

La remoción del adaptador LINKER1 se realizó con el programa CLC como se describe en la sección 5.11.2 de Materiales y métodos. La secuencia del adaptador LINKER1 fue removida de la región 3' de las lecturas y solo permaneció la región del extremo 5' de las lecturas (Figura 59).



Las secuencias que quedaron de la eliminación de LINKER1 se filtraron por tamaño aquellas con longitud menor a 18 y mayor de 35 nucleótidos se graficaron para conocer ver la distribución de longitudes de las secuencias descartadas (Figura 60).

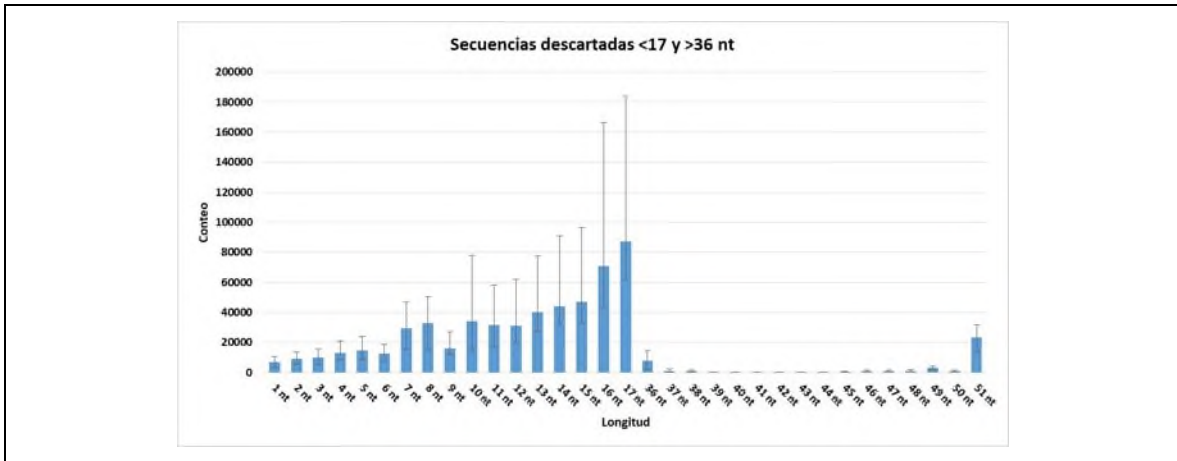


Figura 60. Distribución promedio de las longitudes excluidas después de la remoción del adaptador y filtro de longitud. Las longitudes de 16 y 17 nt fueron mayormente representadas en la eliminación.

La abundancia de tamaños de 16 y 17 nucleótidos descartadas podrían tener una relación con miRNA ya que en la miRBase se encuentran reportadas longitudes desde 15 nt como es el caso de *Mus musculus* miR-7238 (CUGUCCUUUGUGUUC).

Las secuencias de longitud de 18 a 35 nt, se mapearon en el genoma de la mitocondria. En la biblioteca de PC, después de la remoción del adaptador quedaron 16 millones de lecturas y para PC(1) 1.5 millones ambas partieron de ~20 millones de lecturas crudas con este resultado confirmamos que la banda chica purificada (~150 nt) contenía un elevado porcentaje de secuencias vacías.

6.7.2.2 Mapeo de lecturas en el genoma de mitocondria

El genoma de la mitocondria fue extraído del archivo del genoma de maíz y genoma de cloroplasto. El tamaño del genoma de mitocondria es de 569,630 nt. Se detectó que las lecturas mapeadas no tenían una profundidad uniforme en todo el genoma mitocondrial, sino solamente en algunas regiones (Figura 61).

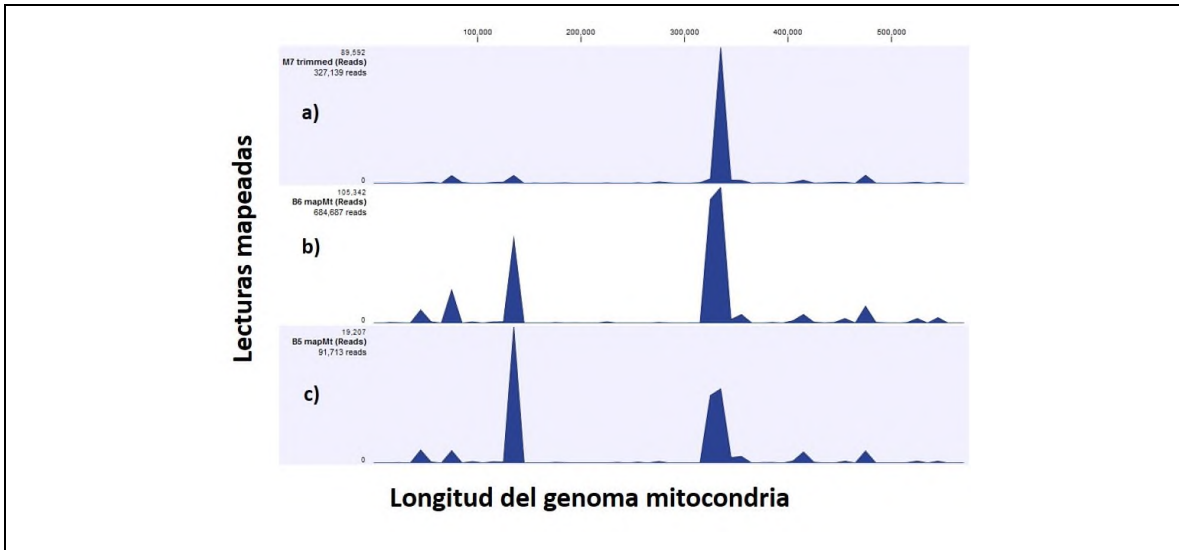


Figura 61. Cobertura de las lecturas de 18 a 35 nt mapeadas en el genoma de la mitocondria. a) MC: Maíz Control; b) PC: Parviglumis Control, y c) PC(1): Parviglumis Control-previo.

No se observó gran variación en el porcentaje de lecturas mapeadas MC (0.02%), PC (0.04%), PC(1) (0.05%) sin embargo existe una acumulación entre 100,000 y 200,000 nt la cual es diferente en altura para maíz y Parviglumis. Ruwe *et al*, (2016) reportan pequeños RNAs provenientes de mitocondria y cloroplastos en bibliotecas *Arabidopsis thaliana* tienen funciones de silenciamiento. La diferencia de lecturas mapeadas puede deberse a la diferencia de especie como lo describen Hufford *et al* (2012).

Las secuencias mapeadas en el genoma de la mitocondria se graficaron para conocer la distribución de longitudes excluidas se observó los tamaños fueron entre 24, 25 y 26 nt (Figura 62).

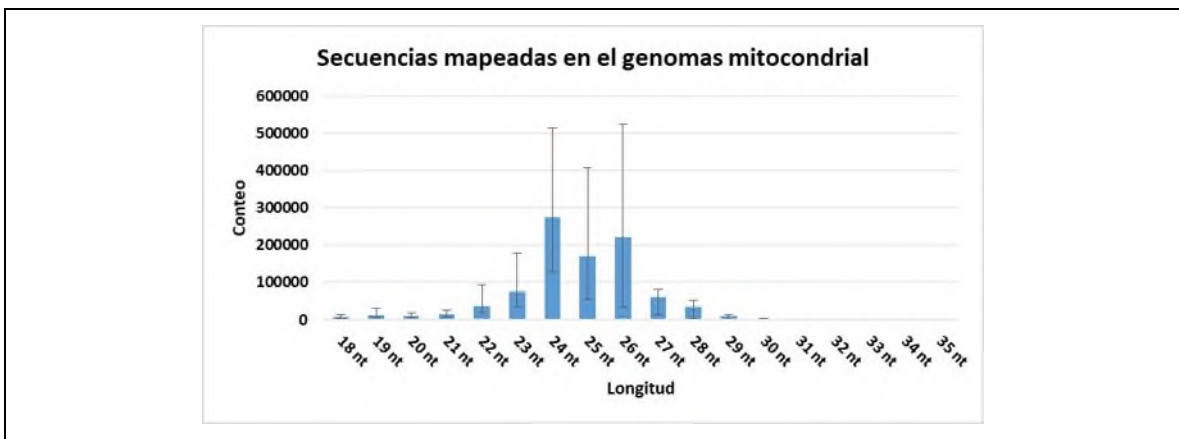
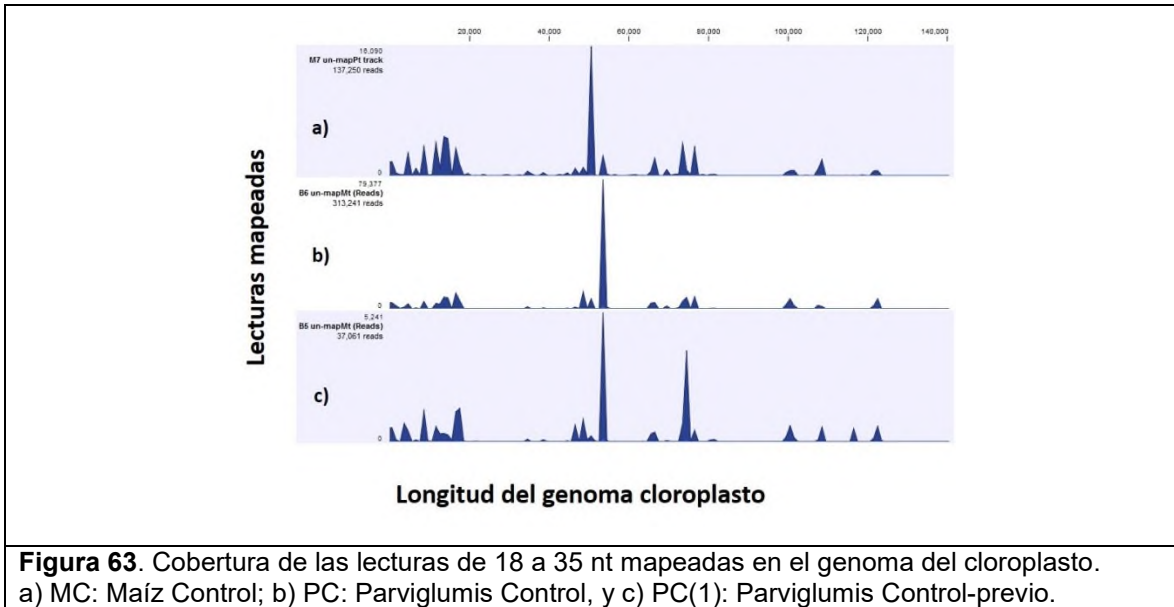


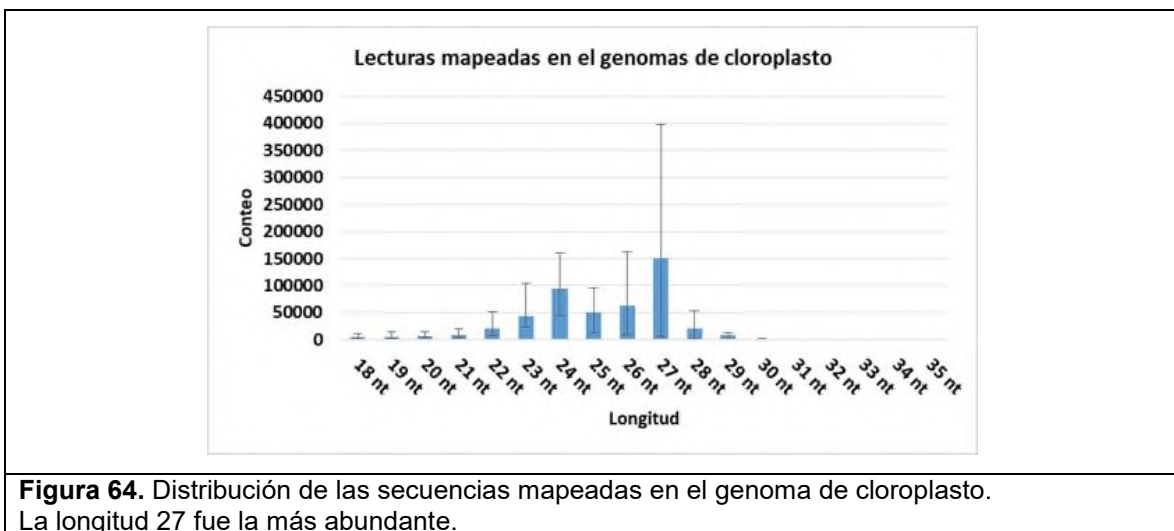
Figura 62. Distribución promedio de las lecturas mapeadas en el genoma de la mitocondria. Las longitudes entre 24 y 26 fueron las más abundantes.

6.7.2.3 Mapeo de lecturas en el genoma de cloroplasto

Las lecturas que no coincidieron del análisis en mitocondria se mapearon en el genoma de cloroplasto, de tamaño 140,384 nt. En el gráfico de cobertura se muestran regiones de acumulación más conservadas entre el maíz y Parviglumis (Figura 63).



En cuanto al porcentaje de lecturas mapeadas PC(1) tuvo mayor coincidencia seguido de PC y MC, 2.5%, 2% y 1% respectivamente. En el reporte de secuencias eliminadas la longitud de 17 nt fue mayoritariamente representada (Figura 64).



6.7.2.4 Mapeo de lecturas en el genoma nuclear

El archivo del genoma nuclear está constituido por 10 secuencias que representan a los 10 cromosomas del maíz, las lecturas de las bibliotecas que coincidieron con éstas se aprobaron para los siguientes análisis. En la Figura 65 se despliegan los gráficos de cobertura de las lecturas mapeadas para las bibliotecas maíz control, Parvigliumis control y Parvigliumis control-previa.

Rajagopalan *et al* (2006) reportaron miRNAs de 24 nt en *Arabidopsis thaliana* que mapean sobre regiones intergénicas. Zhang *et al* (2009) encontraron que el 87% de los miRNAs analizados en maíz están localizados en regiones intergénicas.

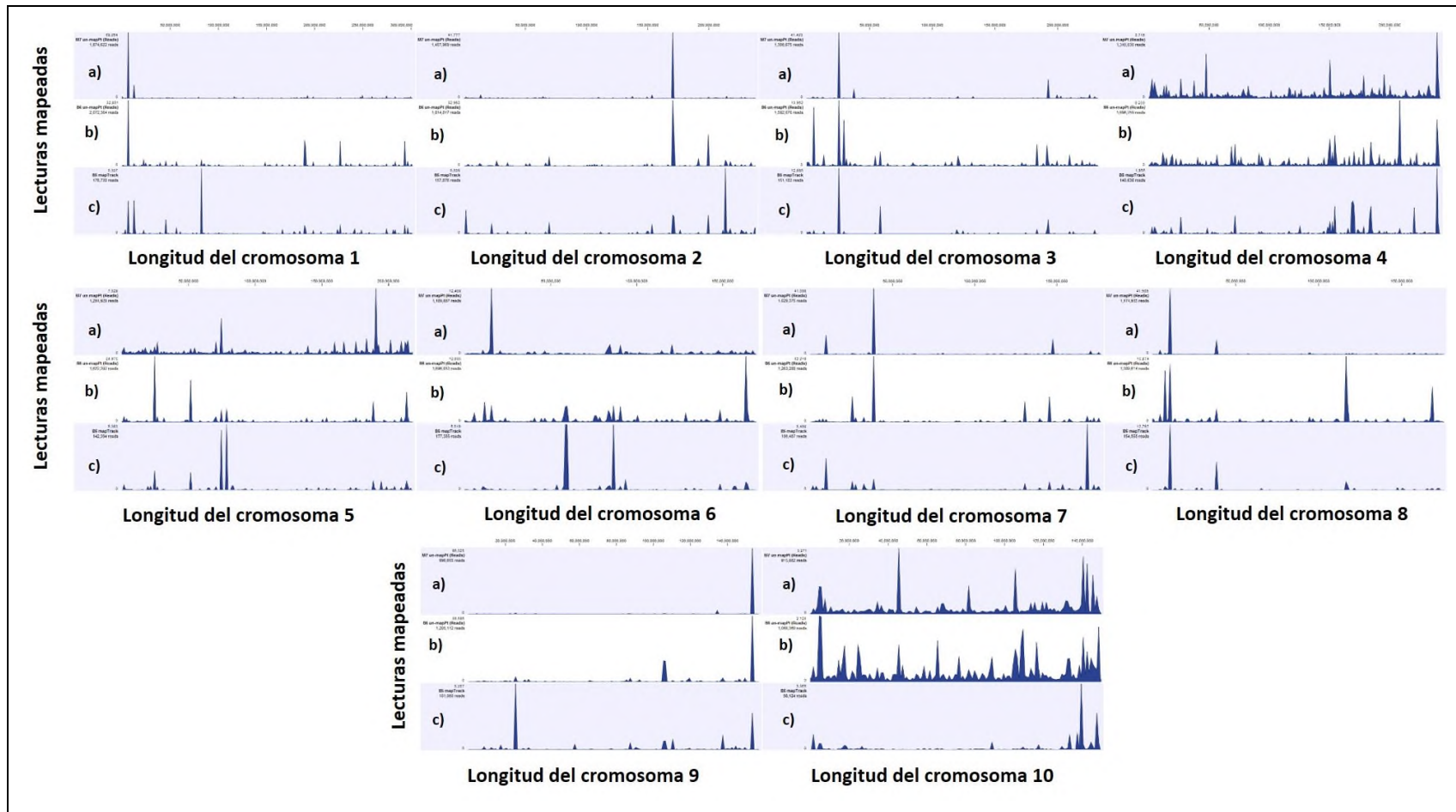


Figura 65. Gráfico de cobertura de las lecturas mapeadas en el genoma nuclear. Las lecturas mapeadas son las que no coincidieron con el genoma de cloroplasto ni la mitocondria. Los cromosomas 4 y 10 mostraron mayor cantidad de lecturas identificada para a) MC: Maíz Control; b) PC: Parviglumis Control, y c) PC(1): Parviglumis Control-previous.

El cromosoma 1 tuvo el mayor porcentaje de lecturas mapeadas y el menor fue en el cromosoma 10 (Tabla 35 de Apéndice A).

En la gráfica de la Figura 66 se observa que la longitud de 24 nt fue la que tuvo mayor número de secuencias eliminadas en el mapeo con el genoma nuclear., este tamaño es el más reportado en bibliotecas de pequeños RNAs (Li *et al*, 2013 (1); Liu *et al*, 2013(1); Li *et al*, 2013 (2); Liu *et al*, 2014(3); Qiu *et al*, 2009; Rajagopalan *et al*, 2006) y nos da referencia de que nuestras bibliotecas están bien construidas.

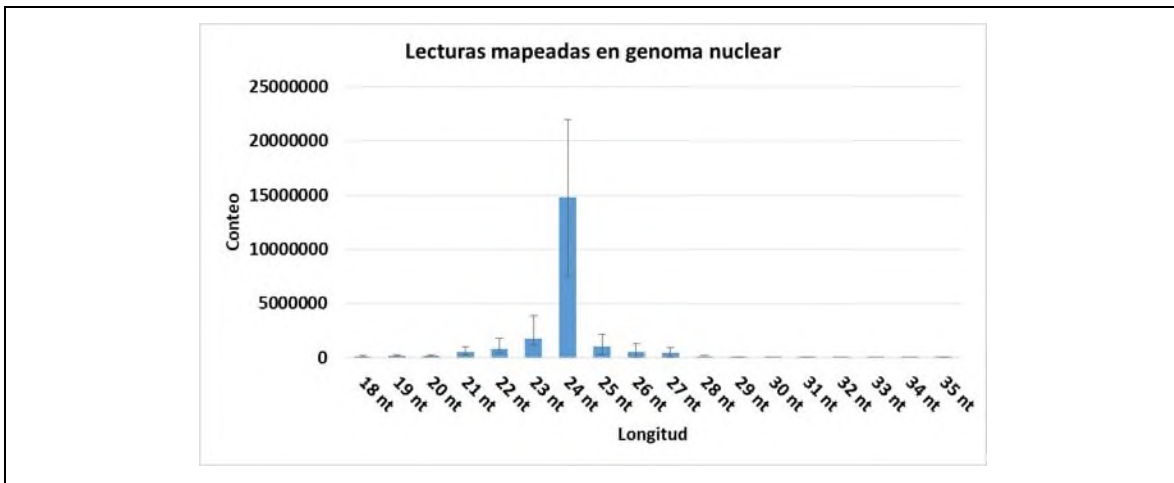


Figura 66. Distribución promedio de longitud de las secuencias mapeadas en el genoma nuclear de maíz. La longitud 24 fue la más abundante.

6.7.2.5 Mapeo de lecturas en RNA ribosomal (rRNA)

Los RNA ribosomales en eucariotas tienen un tamaño de 5070 nt para la subunidad grande (23S/28S) y 1869 nt para la subunidad pequeña 16S/18S). Se realizó el mapeo con la base de datos descargada de 16S de maíz para descartar fragmentos ribosomales en las bibliotecas las cuales son contaminantes comunes en la preparación de bibliotecas (Matts *et al*, 2014; Li *et al*, 2013 (1); Liu *et al*, 2013(1); Li *et al*, 2013 (2). Se graficaron las longitudes de las secuencias descartadas y se muestran en la Figura 67.

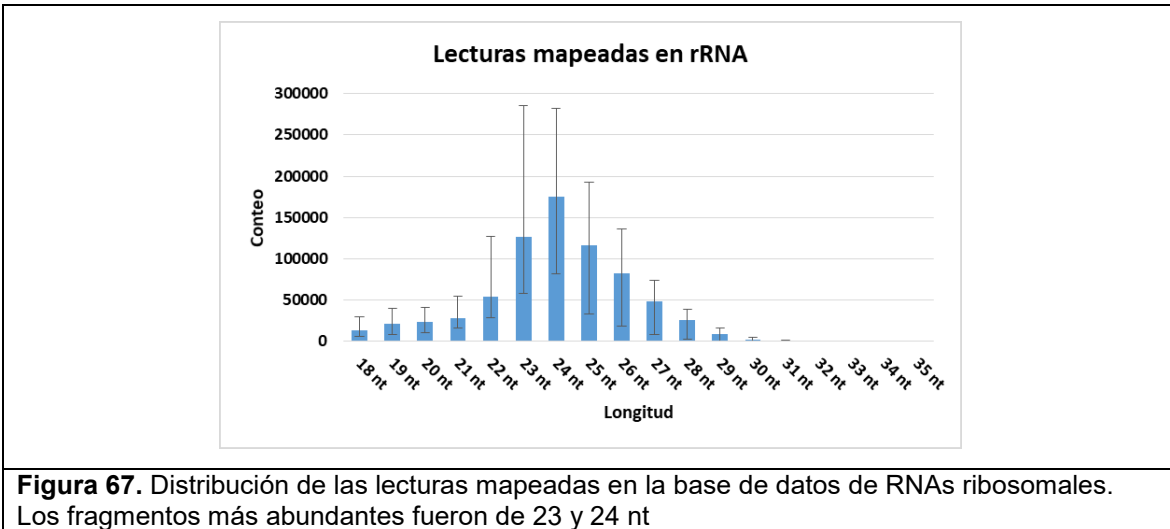


Figura 67. Distribución de las lecturas mapeadas en la base de datos de RNAs ribosomales. Los fragmentos más abundantes fueron de 23 y 24 nt

6.7.2.6 Mapeo de lecturas en RNAs de transferencia (tRNA)

La longitud promedio reportada de los tRNAs es de 76 nt. Por el tamaño podría no representar un problema de contaminación. Sin embargo, la degradación del tRNA y pequeños fragmentos generados en su biogénesis podrían estar presentes en las bibliotecas. Los siguientes autores reportan tRNAs en sus bibliotecas Li *et al*, 2013 (1); Liu *et al*, 2013(1); Li *et al*, 2013 (2). Se mapearon las lecturas provenientes de rRNA y se graficaron las longitudes de las lecturas que coincidieron con la base de datos de tRNA (Figura 68).

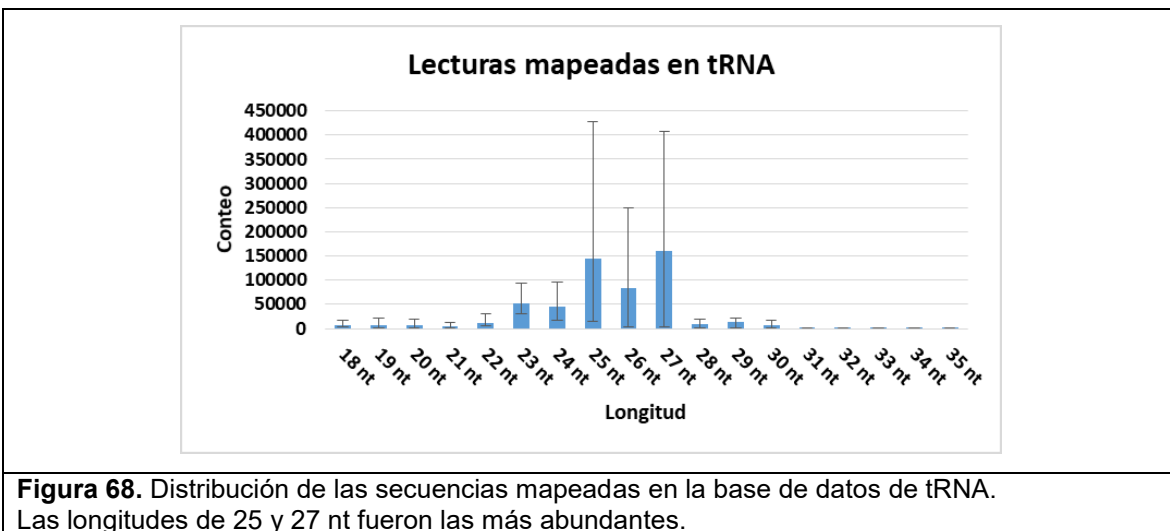


Figura 68. Distribución de las secuencias mapeadas en la base de datos de tRNA. Las longitudes de 25 y 27 nt fueron las más abundantes.

6.7.2.7 Mapeo de lecturas en RNA largos no codificantes (lncRNA).

Se mapearon las secuencias de resultantes de tRNA en la base de datos de lncRNA. La longitud de los lncRNA supera los 200 nt, por lo que las secuencias degradadas podrían representar contaminación. Esta clase de RNA has sido reportado como regulador de miRNAs (Jeggari *et al*, 2012; Memczak *et al*, 2013). Las secuencias descartadas más abundantes fueron las de 24 nt (Figura 69).

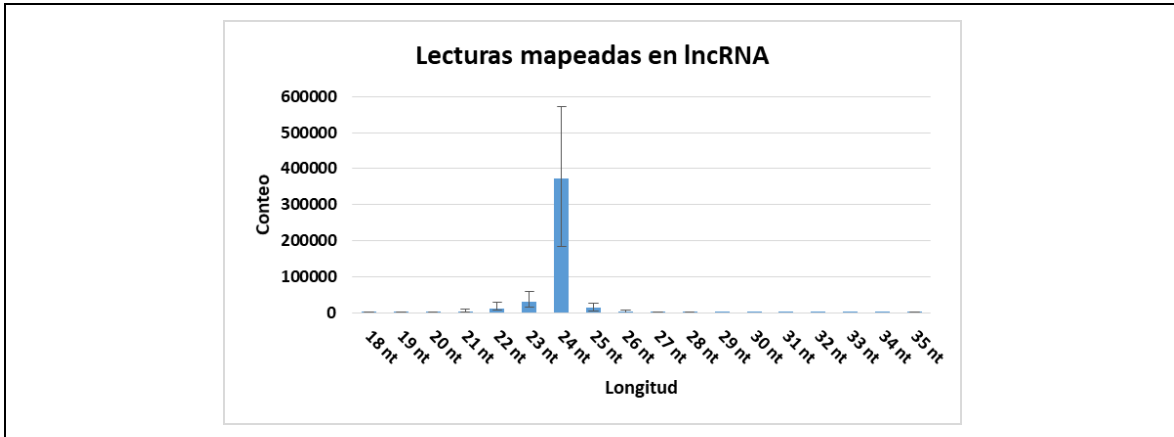


Figura 69. Distribución de las lecturas mapeadas en la base de datos de lncRNA. La longitud de 24 nt fue la más abundante.

6.7.2.8 Mapeo de lecturas en RNA nuclear (snRNA)

La base de datos descargada incluía secuencias de snRNA y snoRNA estas se separaron y se hicieron mapeo de lecturas con cada una. Los fragmentos de 24 nt fueron los más abundantes con snRNAs (Figura 70).

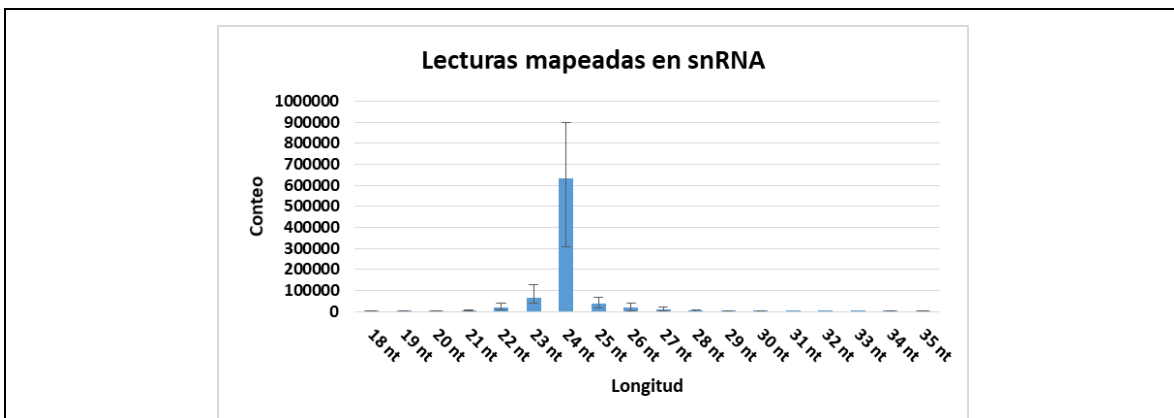


Figura 70. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de snRNA. La longitud de 24 nt fue la más abundante.

6.7.2.9 Mapeo de lecturas en pequeños RNA nuclear (snoRNA)

La longitud de las secuencias de snoRNA se encuentra entre 60 y 120 nt. Al igual que los snRNA, los fragmentos más abundantes fueron los de 24 nt (Figura 71).

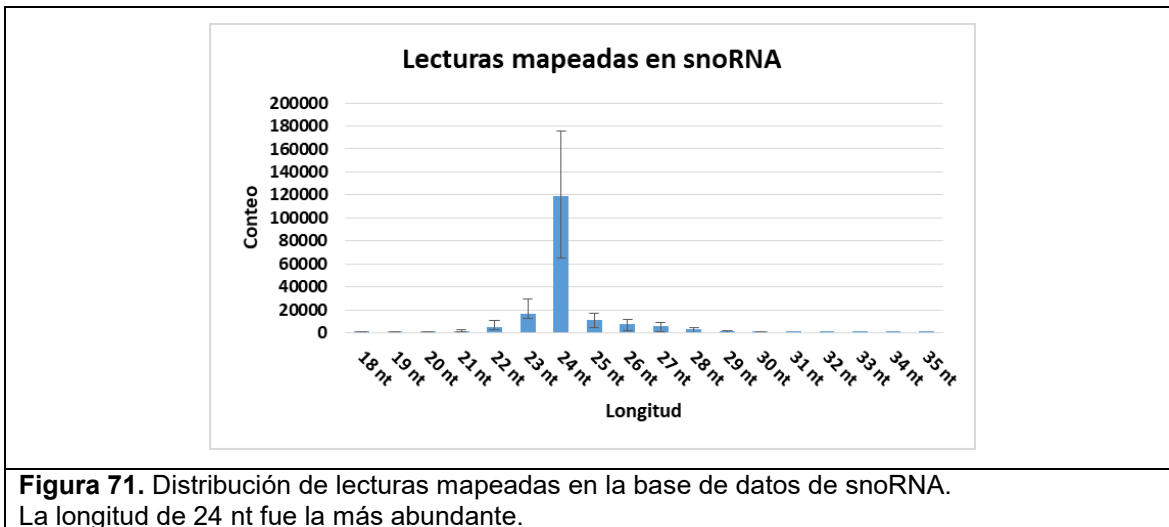


Figura 71. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de snoRNA. La longitud de 24 nt fue la más abundante.

Los siguientes autores reportaron estos dos tipos de RNAs en sus bibliotecas Sheng *et al* (2015), Liu *et al* (2013) (1), Liu *et al* (2014) (3), Li *et al* (2013) (2).

6.7.2.10 Mapeo de lecturas en RNA repetitivos (repeatsRNAs)

Las longitudes de las secuencias de repeatsRNA reportadas son de 14 a 200 nt con abundancia en 35 nt, por lo que son potenciales contaminantes de las bibliotecas. Las lecturas filtradas de snoRNA se mapearon en esta base de datos como lo reportan Sheng *et al* (2015), Liu *et al* (2014) (3) y Ren *et al* (2012). En la Figura 72 se muestra la distribución de lecturas asociadas a 24 nt.

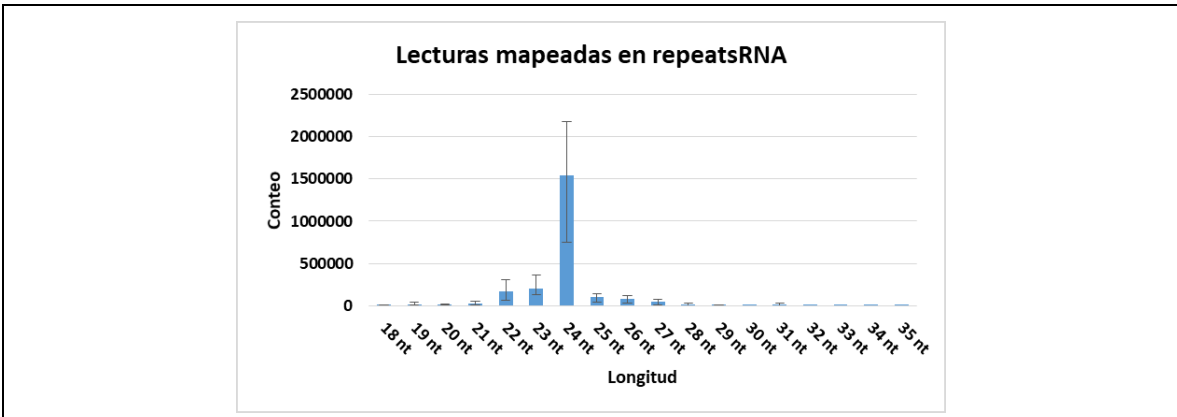


Figura 72. Distribución de lecturas mapeadas en la base de datos de RNA repeats. La longitud de 24 nt fue la más abundante.

El mapeo en RNA repeats fue el último análisis, ya que no se encontraron más referencias en maíz (como los tasiRNA) para continuar limpiando las bibliotecas. Las secuencias no mapeadas de la base de datos de RNA repeats se describen como lecturas filtradas.

El resumen del análisis de mapeo se muestra en la Figura 73 con porcentaje de lecturas excluidas. En promedio, 50% de las lecturas crudas finalizaron como filtradas del análisis de mapeo.

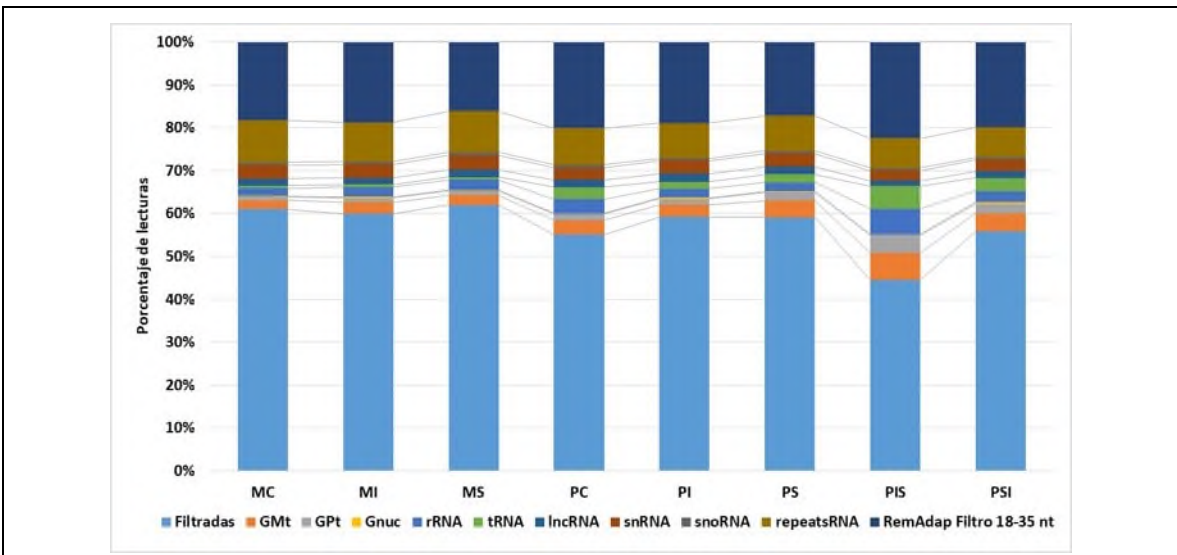


Figura 73. Categoría de las secuencias de las bibliotecas.

Filtradas: lecturas que quedaron después de aplicar el mapeo en las bases de datos de maíz. GMt: Genoma de mitocondria; GPt: Genoma de cloroplastos; Gnuc: Genoma nuclear; rRNA, tRNA, lncRNA, repeatsRNA: clases de RNAs; RemAdap Filtro 18-35 nt: remoción del adaptador y filtro de secuencias de 18 a 35 nt. MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; PSI: Parviglumis Sequía-Inundación.

Las bibliotecas que se muestran en la Figura 73 presentaron una media de 20% en contenido de construcciones vacías y secuencias de baja calidad como lo conseguido por Liu *et al* (2013)(1).

En contraste, las bibliotecas malas PC(1) y PI(1) presentaron más del 60% fueron construcciones vacías (Figura 74). Otros estudios con bibliotecas maíz reportaron hasta 40% (Li *et al*, 2013 (1); Sheng *et al*, 2015).

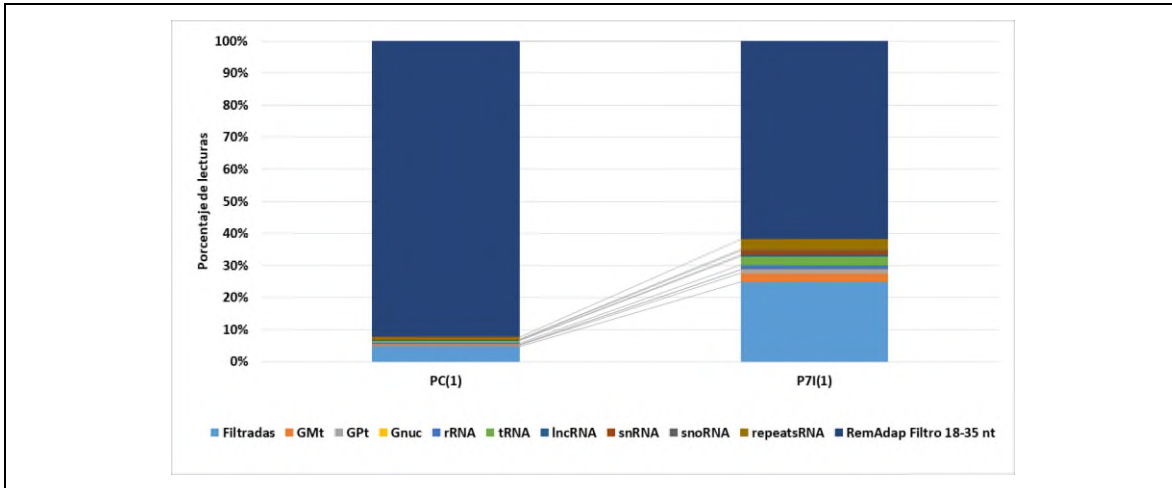


Figura 74. Categoría de las secuencias de las bibliotecas malas. Filtradas: lecturas que quedaron después de aplicar el mapeo en las bases de datos de maíz. GMT: Genoma de mitocondria; GPt: Genoma de cloroplastos; Gnuc: Genoma nuclear; rRNA, tRNA, lncRNA, repeatsRNA: clases de RNAs; RemAdap Filtro 18-35 nt: remoción del adaptador y filtro de secuencias de 18 a 35 nt. PC(1): Parviglumis Control-previo; PI(1): Parviglumis Inundación-previo.

Los resultados obtenidos de las bibliotecas malas están directamente relacionados con la presencia de construcciones vacías. Como ya se explicó estos resultados se obtuvieron por una inadecuada selección de los productos obtenidos a partir del gel de acrilamida de la síntesis de cDNA o por una mala optimización de la concentración de la muestra de RNA total inicial, la concentración de adaptadores como lo describe Shore *et al* (2016).

También existe la posibilidad de que la purificación de la banda del tamaño adecuado haya sido deficiente, arrastrando contaminación de productos indeseados por hibridación con secuencias de tamaño más largo o más corto como lo indican Trapp *et al* (2011). Todos estos aspectos realzan la importancia de contar con protocolos eficientes para la construcción de bibliotecas, que consideren la inclusión de pasos necesarios de purificación de los productos deseados (Ortiz-Yescas 2016).

6.7.2.11 Distribución de longitud de las lecturas filtradas

Se obtuvo el promedio de las filtradas de las bibliotecas (excluyendo las malas) para graficar la distribución de lecturas totales o globales y las únicas o no redundantes (Figura 75).

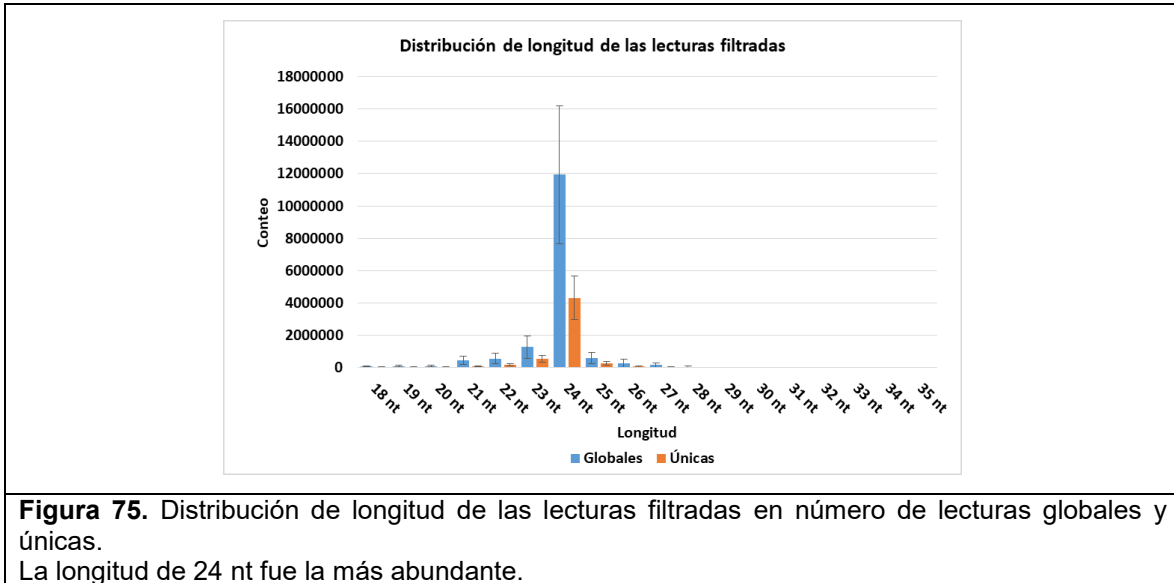


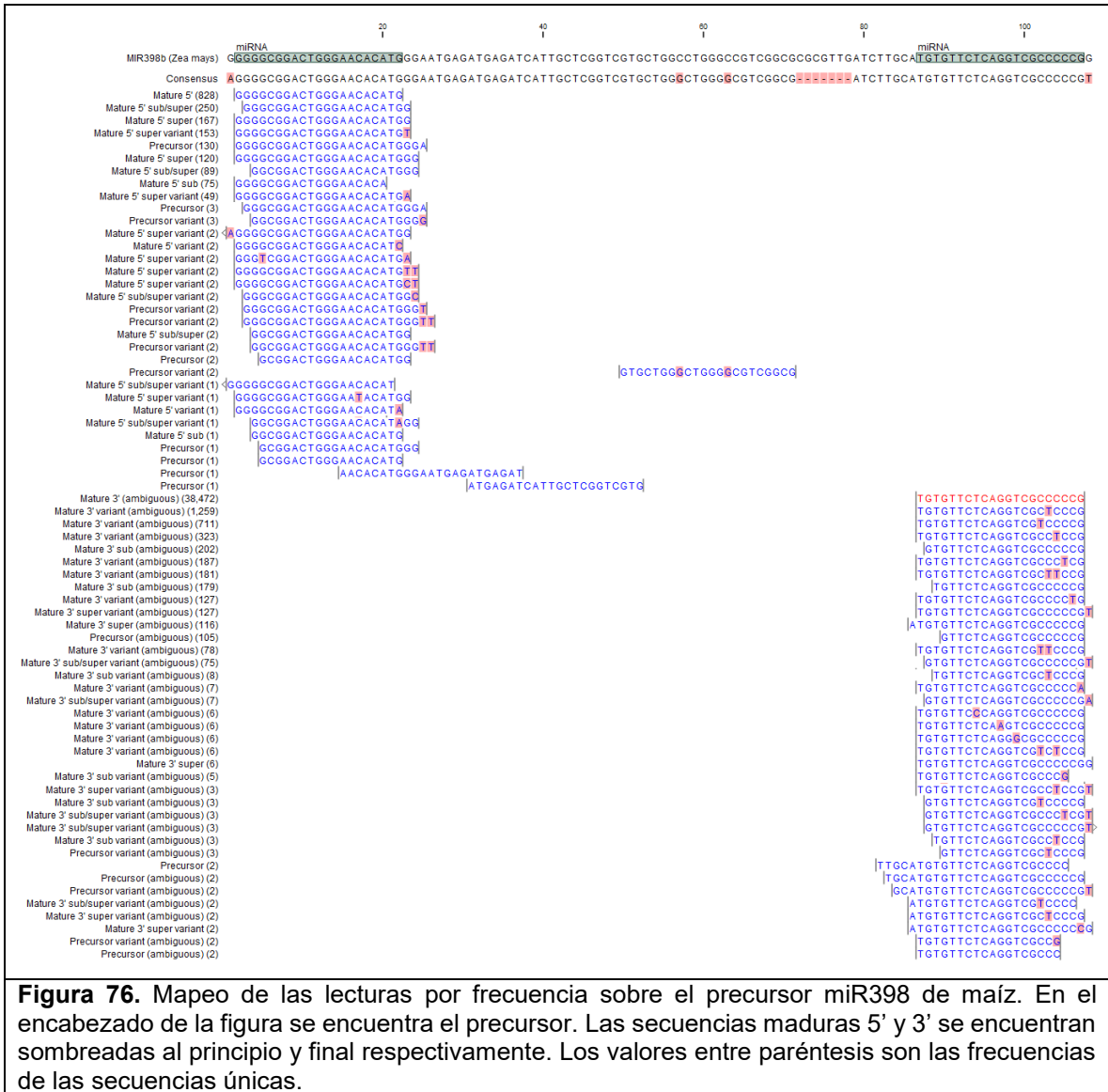
Figura 75. Distribución de longitud de las lecturas filtradas en número de lecturas globales y únicas. La longitud de 24 nt fue la más abundante.

Como se describió en la sección de Mapeo de lecturas en el genoma nuclear la longitud más abundante de las bibliotecas es 24 nt como lo reportan Li *et al* (2013) (1), Liu *et al* (2013)(1), Li *et al* (2013) (2), Liu *et al* (2014)(3) en el análisis de sus datos de secuenciación masiva de maíz.

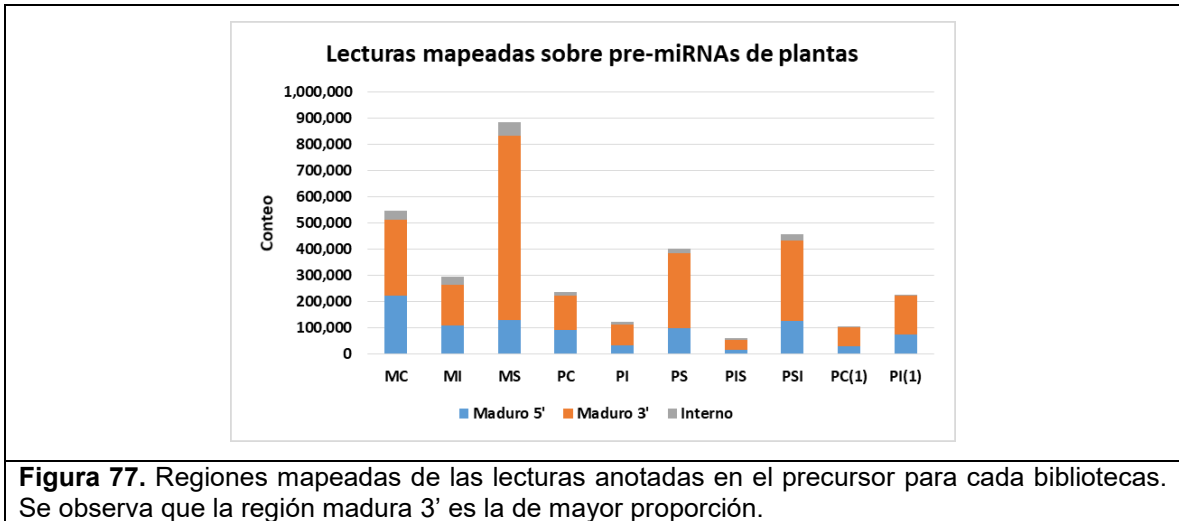
6.7.2.12 Mapeo de las lecturas en la miRBase de plantas.

Las lecturas filtradas se agruparon por frecuencia para hacer el mapeo de secuencias únicas en precursores de miRNAs de la miRBase como se describió en el punto 5.11.4 de la sección de Materiales y Métodos. Este procedimiento generó 2 tipos de datos: anotados y no anotados.

Los anotados son aquellas secuencias que coincidieron con algún precursor de miRNA en cambio los no anotados no se alinearon pre-miRNA. La Figura 76 ejemplifica identificación de pequeños RNAs con el precursor del miR398 de maíz.

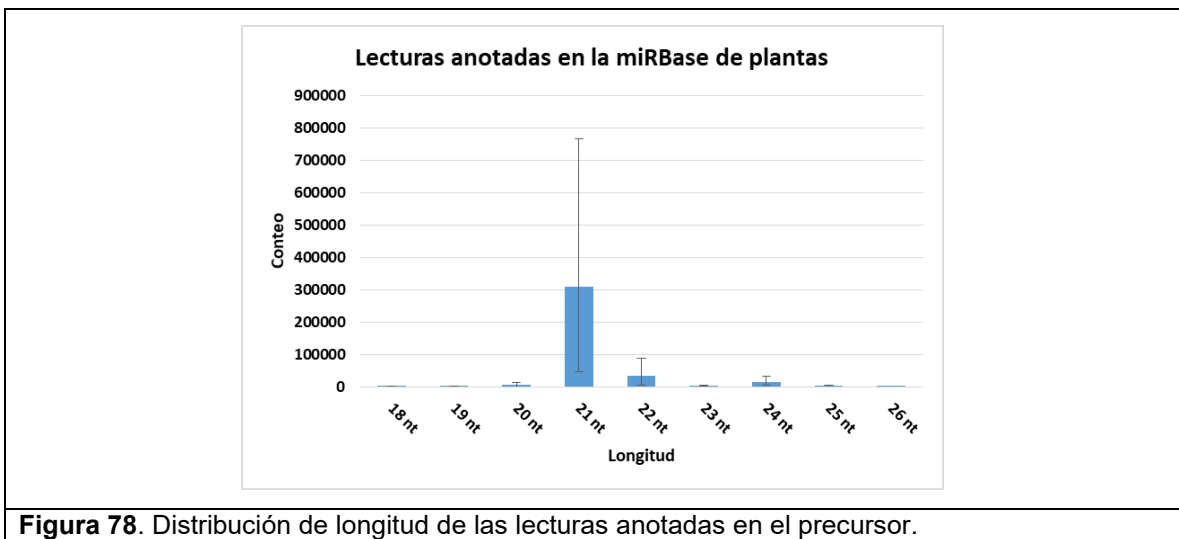


En la Figura 76 se puede observar bases sombreadas en color rosa, las cuales representan *mismatch*, las secuencias que las contienen se conocen como isoformas de miRNAs y se incluyeron en los resultados cuando se defirieron los parámetros en la herramienta *Annotate and Merge Counts*. Otro punto a resaltar es que las lecturas anotadas se alinean a las regiones maduras del precursor las cuales se encuentran en los extremos en algunos casos, pocas secuencias se alinean en la región interna demostramos esto mediante graficas de mapeo para cada biblioteca en la Figura 77.



Li *et al* (2013) (2) y Sheng *et al*, 2015 reportaron nuevos potenciales miRNA en la mayoría mostrando la secuencia madura en los extremos del precursor. El bajo reporte de miRNAs en la región interna puede estar relacionado con la formación de horquillas y la longitud del precursor como los pre-miRNAs publicados por Bartel (2004).

El tamaño de 21 nt representó la mayor cantidad de lecturas identificadas en la miRBase de plantas como se muestra en la Figura 78.



En las lecturas filtradas, la longitud de 24 nt fue la más abundante por lo tanto esperábamos que se mantuviera el tamaño con mayor número de conteos en análisis posteriores, lo cual no fue así. Este resultado se debe a que las longitudes de las secuencias de la miRBase de plantas tiene el rango de 18 a 26 nt dominando 21 nt con 54% de ocupación de la base

de datos Figuras 124 y 125 del Apéndice B. El cambio de abundancia de 24 nt a 21 nt también corresponde con la información publicada por Xu *et al* (2017) en bibliotecas de maíz y arroz.

Por el contrario, en las secuencias no anotadas el tamaño de 21 nt obtuvo el mayor número de conteos (Figura 79).

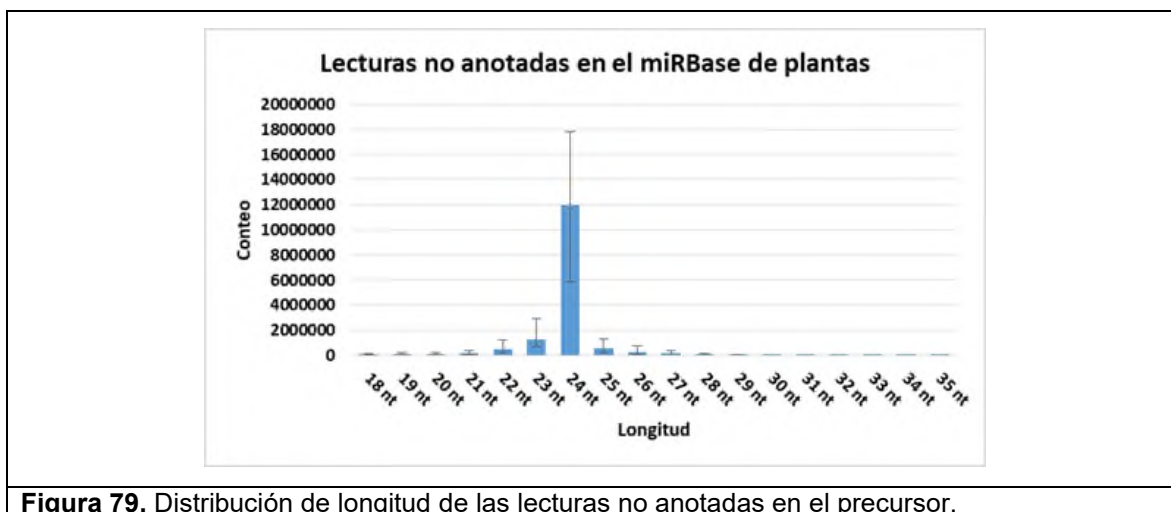


Figura 79. Distribución de longitud de las lecturas no anotadas en el precursor.

La importancia de secuencias no anotadas en bases de datos cae en que son potenciales a ser RNAs de interferencia, sin embargo, para lograrlo deben pasar algunos criterios de evaluación para ser propuestos como novedosos (Meyers *et al* 2008). En este trabajo no analizamos este conjunto de lecturas.

En la Tabla 25 se muestran todos los resultados del análisis de las bibliotecas hasta la anotación en la miRBase.

Tabla 25. Resumen de lecturas recuperadas del análisis de depuración de las bibliotecas.

Locus	MC (%)	MI (%)	MS (%)	PC (%)	PI (%)	PS (%)	PIS (%)	PSI (%)	PC(1) (%)	PI(1) (%)
RemAdap filtro 18-35 nt	2,958,189 (18.33)	4,989,452 (18.74)	5,107,388 (16.14)	4,152,570 (20.09)	5,428,277 (18.94)	5,008,411 (17.23)	4,031,874 (22.40)	9,274,821 (19.94)	18,754,248 (92.32)	12,929,293 (61.77)
GMt	327,139 (2.03)	719,895 (2.70)	715,354 (2.26)	684,687 (3.31)	816,447 (2.85)	1,107,660 (3.81)	1,135,613 (6.31)	1,947,246 (4.19)	91,713 (0.45)	574,088 (2.74)
GPt	137,250 (0.85)	262,813 (0.99)	311,575 (0.98)	313,241 (1.52)	383,021 (1.34)	598,198 (2.06)	756,506 (4.20)	1,060,246 (2.28)	37,061 (0.18)	208,198 (0.99)
Gnuc	23,494 (0.15)	66,854 (0.25)	44,985 (0.14)	25,127 (0.12)	68,634 (0.24)	42,672 (0.15)	26,965 (0.15)	131,385 (0.28)	6,503 (0.03)	29,955 (0.14)
rRNA	288,257 (1.79)	601,629 (2.26)	778,148 (2.46)	687,038 (3.32)	591,868 (2.07)	588,819 (2.03)	1,056,243 (5.87)	1,240,514 (2.67)	75,452 (0.37)	283,711 (1.36)
tRNA	103,451 (0.64)	161,288 (0.61)	200,294 (0.63)	569,294 (2.75)	480,975 (1.68)	553,939 (1.91)	953,794 (5.30)	1,426,872 (3.07)	152,137 (0.75)	563,446 (2.69)
lncRNA	258,027 (1.60)	416,896 (1.57)	519,449 (1.64)	362,527 (1.75)	530,505 (1.85)	528,963 (1.82)	231,375 (1.29)	719,402 (1.55)	21,517 (0.11)	115,677 (0.55)
snRNA	516,999 (3.20)	838,151 (3.15)	1,071,157 (3.39)	576,299 (2.79)	868,349 (3.03)	890,657 (3.06)	421,404 (2.34)	1,220,748 (2.62)	50,739 (0.25)	274,292 (1.31)
snoRNA	105,518 (0.65)	168,088 (0.63)	228,389 (0.72)	141,006 (0.68)	174,443 (0.61)	190,297 (0.65)	111,528 (0.62)	256,675 (0.55)	14,320 (0.07)	63,913 (0.31)
repeatsRNA	1,570,791 (9.73)	2,431,864 (9.13)	3,035,923 (9.59)	1,773,053 (8.58)	2,332,654 (8.14)	2,364,989 (8.14)	1,254,103 (6.97)	3,264,256 (7.02)	138,812 (0.68)	680,194 (3.25)
Anotados maíz	545,123 (3.38)	295,842 (1.11)	883,969 (2.79)	235,184 (1.14)	122,988 (0.43)	402,097 (1.38)	61,175 (0.34)	455,871 (0.98)	105,287 (0.52)	227,394 (1.09)
No anotados maíz	9,305,116 (57.65)	15,668,676 (58.86)	18,745,579 (59.24)	11,152,387 (53.95)	16,858,595 (58.83)	16,786,886 (57.76)	7,956,457 (44.21)	25,524,193 (54.86)	866,485 (4.27)	4,981,493 (23.80)
Lecturas crudas	16,139,354	26,621,448	31,642,210	20,672,413	28,656,756	29,063,588	17,997,037	46,522,229	20,314,274	20,931,654

RemAdap Filtro 18-35 nt: remoción del adaptador y filtro de secuencias de 18 a 35 nt; GMt: Genoma de mitocondria; GPt: Genoma de cloroplastos; Gnuc: Genoma nuclear; rRNA, tRNA, lncRNA, repeatsRNA: clases de RNAs; Anotados y No anotados en maíz forman lecturas filtradas; Lecturas crudas: son las lecturas totales o iniciales de las bibliotecas; MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC: Parviglumis Control; PI: Parviglumis Inundación; PS: Parviglumis Sequía; PIS: Parviglumis Inundación-Sequía; PSI: Parviglumis Sequía-Inundación; PC(1): Parviglumis Control-previo; PI(1): Parviglumis Inundación-previo.

Menos del 4% del total de lecturas terminaron siendo anotadas para cada biblioteca (Figura 80) aparentemente puede ser un valor muy bajo sin embargo, Liu *et al*, (2013) (1) hallaron menos del 0.1%. Al contrario de lo publicado por Li *et al* (2012) (2) con un 14% de lecturas identificadas como miRNAs.

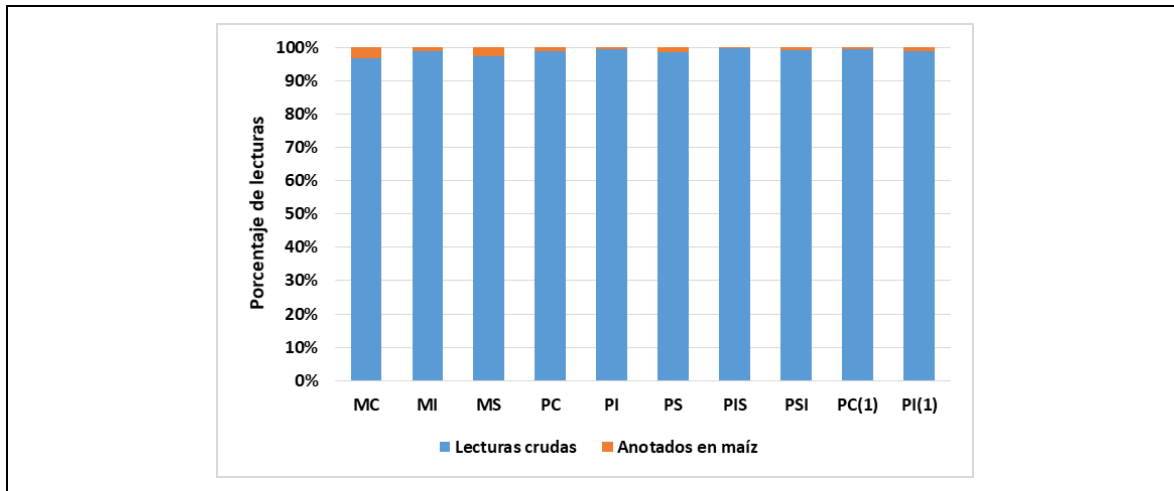


Figura 80. Porcentaje de lecturas crudas y anotadas en la miRBase de maíz. MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC: Parvigitumis Control; PI: Parvigitumis Inundación; PS: Parvigitumis Sequía; PIS: Parvigitumis Inundación-Sequía; PSI: Parvigitumis Sequía-Inundación; PC(1): Parvigitumis Control-previo; PI(1): Parvigitumis Inundación-previo.

Las lecturas anotadas en todas las plantas y en maíz de la miRBase se comparan en la Figura 81.

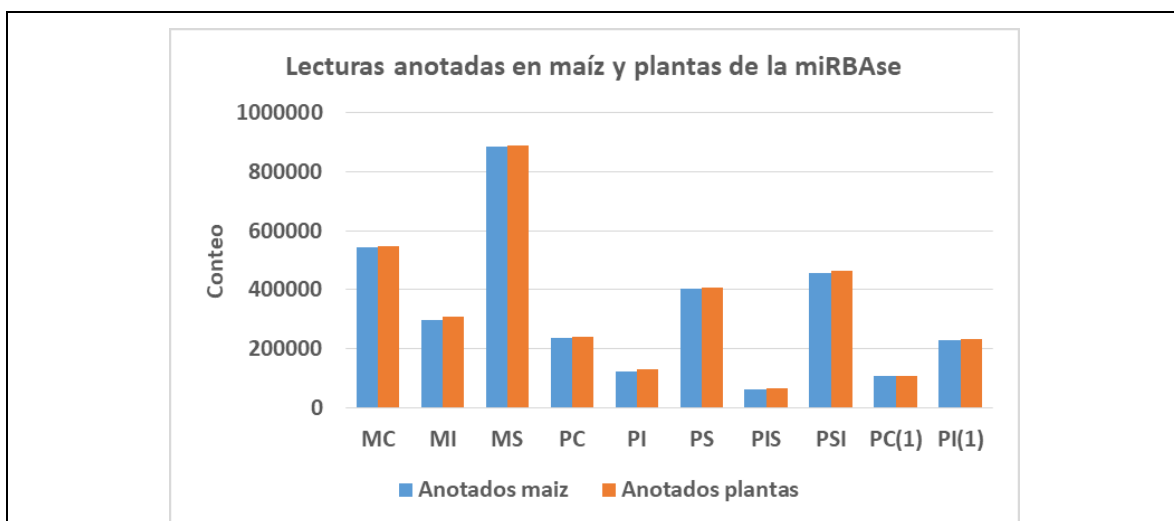


Figura 81. Comparación de lecturas anotadas en maíz y plantas de la miRBase

6.7.3 Análisis de miRNAs específicos de grupo

Las lecturas anotadas de cada biblioteca fueron agrupadas por categorías de la miRBase: monocotiledóneas, dicotiledóneas y otras plantas. Usando diagramas de Venn observamos que en maíz no hubo miRNAs de dicotiledóneas y otras plantas, en contraste, Parviglumis presentó 130 y 19 respectivamente (Figura 82).

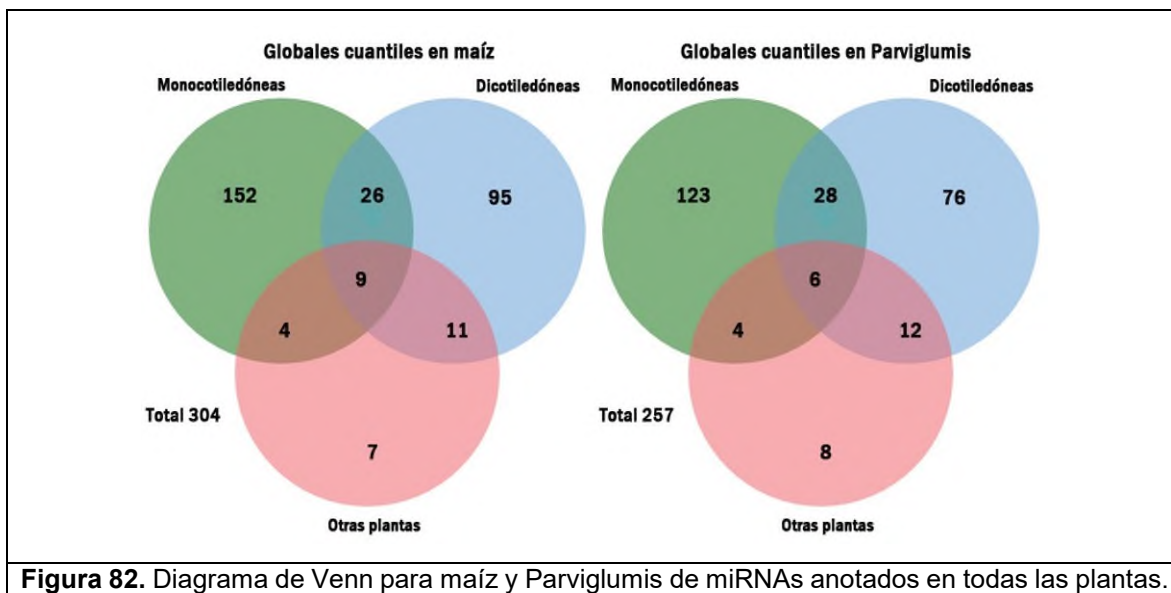


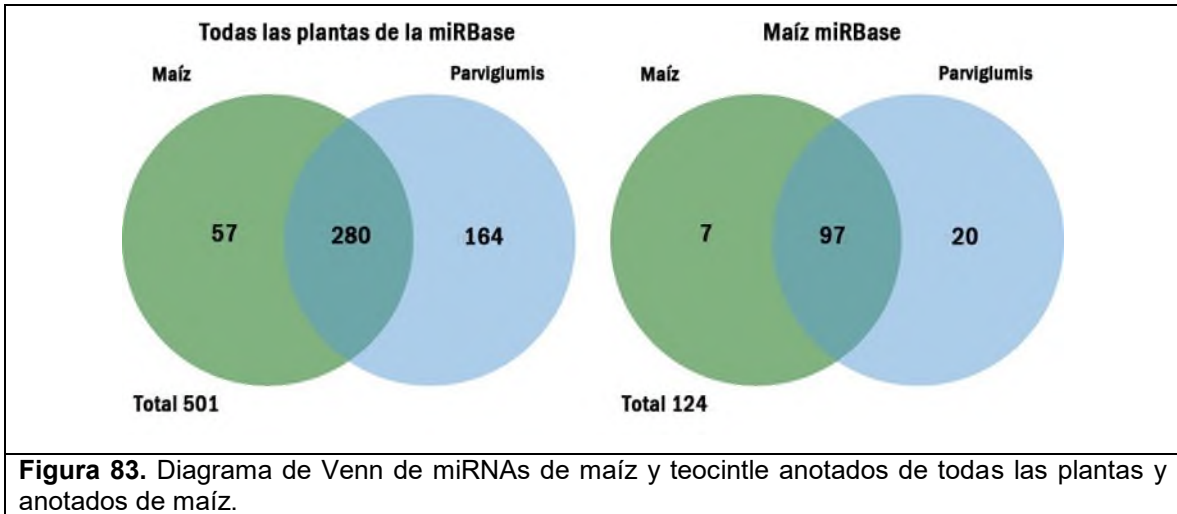
Figura 82. Diagrama de Venn para maíz y Parviglumis de miRNAs anotados en todas las plantas.

Nuestras bibliotecas de maíz solo mostraron miRNAs de monocotiledóneas estos son conocidos como miRNAs conservados. Sunkar y Jagadeeswaran (2008) reportaron miR437, miR444, miR396 únicamente en monocotiledóneas a partir de un estudio que incluyó 115 bibliotecas de diferentes plantas. Por el contrario, Zhang *et al* (2009) propusieron el miR482 de maíz el cual solo ha sido encontrado en dicotiledóneas.

Parviglumis presentó miRNAs en otras plantas, no hay reportes con los que puedan comprar nuestros resultados sin embargo podemos hacer un acercamiento a través del maíz. Los miRNAs de dicotiledóneas y otras plantas presentes en Parviglumis y no en maíz nos dan una evidencia de secuencias específicas de la especie, por lo tanto, perdidas en la otra.

6.7.4 miRNAs compartidos entre especie.

Comparamos los miRNAs de maíz y Parviglumis de las lecturas anotadas en todas las plantas y a *Zea mays* de la miRBase (Figura 83).



En los resultados usando a maíz como referencia de miRNAs encontramos 97 presentes en ambas especies, 20 nuevos solo para Parviglumis y 7 únicos para maíz. En un estudio con las mismas plantas reportaron que no hay diferencias en las secuencias maduras de las especies estudiadas sin embargo las bases que flaquean pueden ser diferentes (Zhang *et al*, 2009).

6.7.5 Normalización de las bibliotecas

Usamos dos métodos para normalizar las bibliotecas: TPM y Cuantiles-TPM (descrita como cuantiles). En la Figura 84 se muestra la distribución para las lecturas crudas, normalizadas por TPM y normalizadas por cuantiles. Las normalizaciones se aplicaron por grupo de bibliotecas para maíz, Parviglumis y malas. La distribución de las lecturas crudas baja cuando se aplica normalización TPM pero cuando se aplica la normalización cuantiles todas presentan la misma distribución.

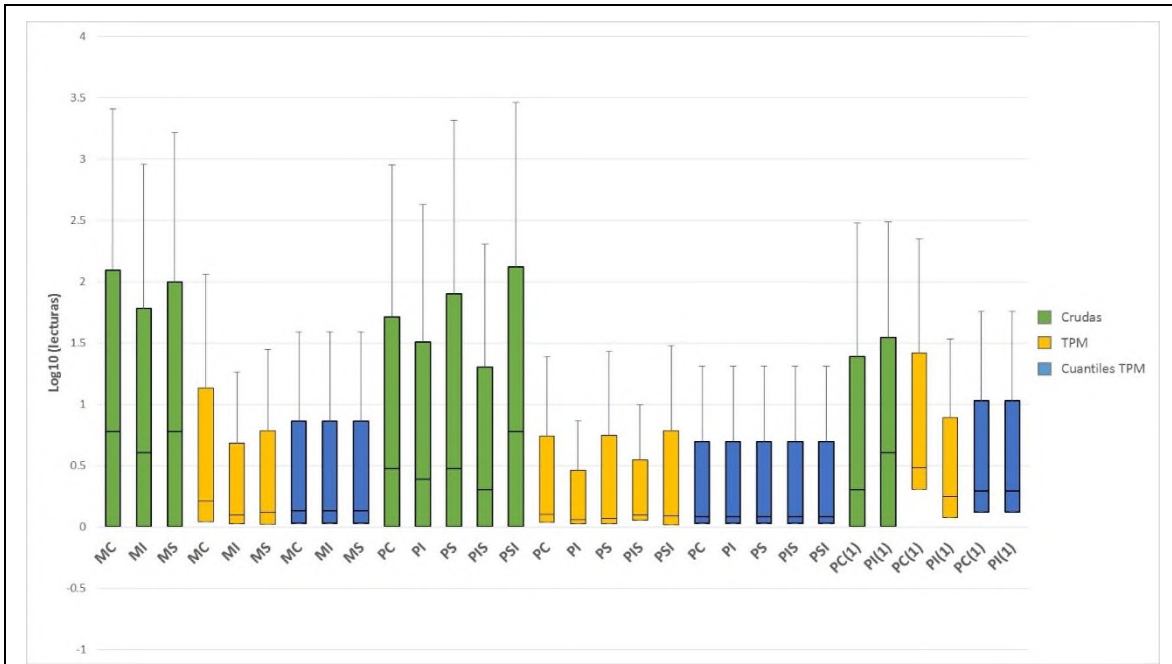


Figura 84. Gráfico de distribución de lecturas crudas y normalizadas. MC: Maíz Control; MI: Maíz Inundación; MS: Maíz Sequía; PC: Parvigliumis Control; PI: Parvigliumis Inundación; PS: Parvigliumis Sequía; PIS: Parvigliumis Inundación-Sequía; PSI: Parvigliumis Sequía-Inundación; PC(1): Parvigliumis Control-previo; PI(1): Parvigliumis Inundación-previo.

Liu *et al* (2013) (i1) y Li *et al* (2013) (1) reportan normalización de bibliotecas de maíz por TPM mientras que Laurent *et al* 2008 reportan el método de cuantiles en microarreglos para miRNAs de humanos.

En un estudio de comparación de métodos de normalización Pradervand *et al* (2009) encontraron que cuantiles tuvo mejor interpretación de datos que TPM (referido como escalate en el artículo) esto se debe a que el método es robusto. Se asume que el número de lecturas no cambio a es el mismo y eso lo podemos observar en grafico cuando se aplica este método en a las bibliotecas por especie.

6.7.6 miRNAs expresados en forma específica al tratamiento

Con la finalidad de identificar miRNAs expresados específicamente en respuesta a alguno de los tratamientos aplicados, se analizó su expresión en las bibliotecas normalizadas, quitando las lecturas con valor 0 para cada grupo de miRNA de los tratamientos. La Figura 85 muestra un diagrama de Venn para cada tipo de normalización en las bibliotecas de maíz. Solo en normalización por cuantiles se observan miRNAs específicos de tratamiento.

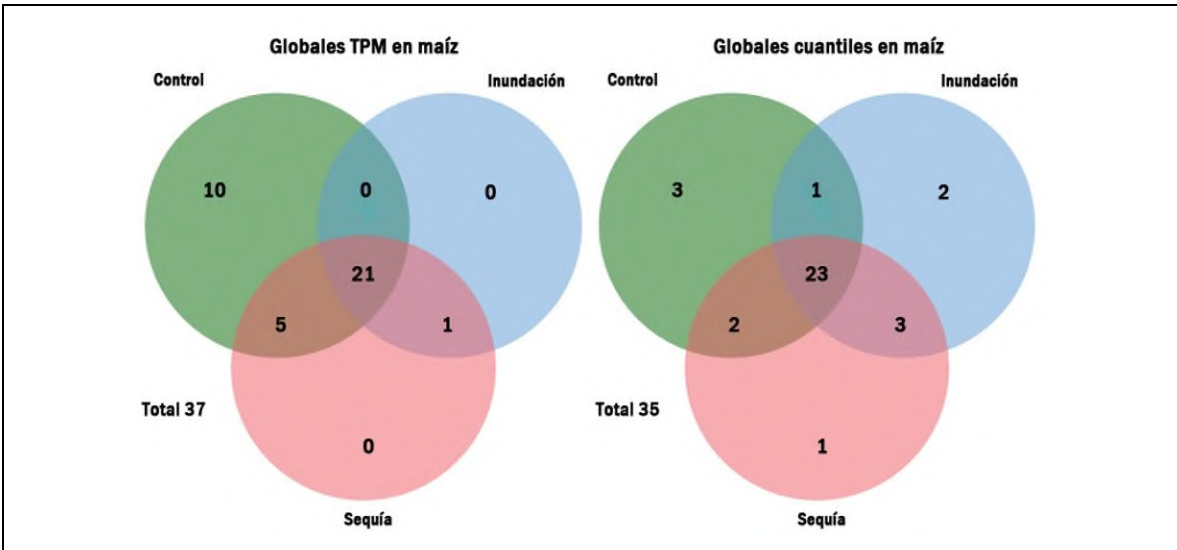


Figura 85. Diagrama de Venn de los tratamientos en las bibliotecas de maíz normalizadas por TPM y cuantiles. La normalización por TPM muestra miRNAs específicos de control, pero no para inundación o sequía. Por el contrario, la normalización de cuantiles presenta miRNAs específicos en los tres tratamientos.

En la Figura 86 se presenta el análisis de las bibliotecas de Parviglumis, considerando todos los tratamientos aplicados. El tratamiento de sequía-inundación en los dos métodos de normalización presentó la expresión de un miRNA específico. Se puede notar en la normalización por cuantiles que el tratamiento de inundación y sequía-inundación comparten un miRNA pudiendo ser un miRNA específico de inundación. De la misma manera, para sequía e inundación-sequía en TPM, 3 y cuantiles, 2 que podrían ser específicos de sequía.

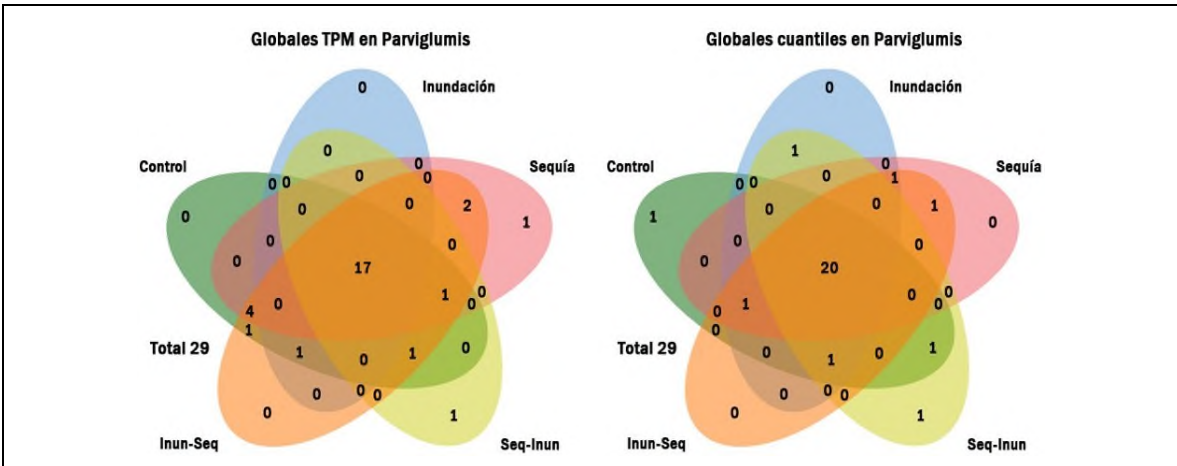
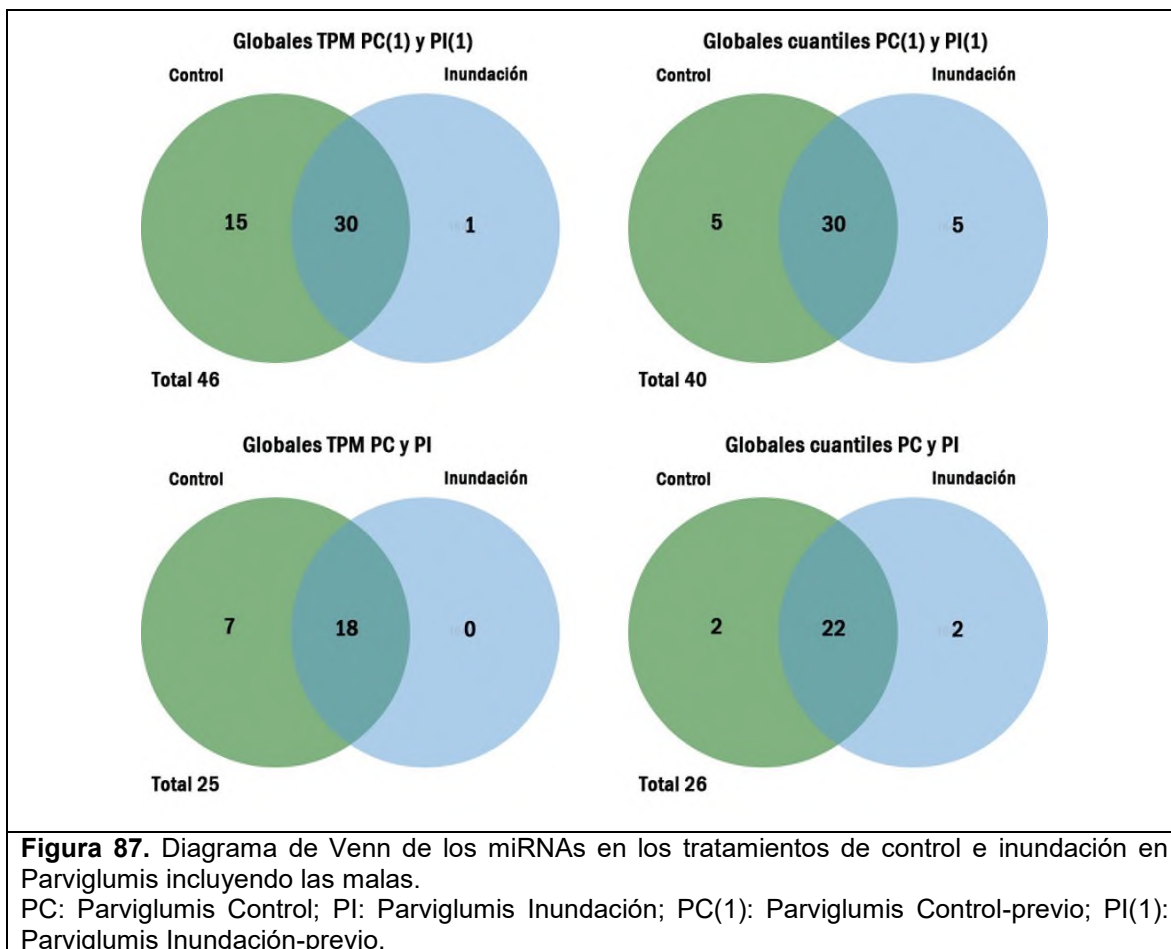


Figura 86. Diagrama de Venn para los tratamientos de Parviglumis con las lecturas normalizadas por TPM y cuantiles.

Enseguida se compararon los miRNAs de los tratamientos control e inundación de las bibliotecas Parviglumis incluyendo las malas y se observó que los miRNAs totales analizados fueron mayores en las bibliotecas malas (Figura 87). Estos resultados dan un giro a la definición de las bibliotecas malas porque pudieran no serlo al resultar con una buena representación de miRNAs, y aún a pesar de que el número de secuencias crudas obtenidas haya resultado menor, y con esto haya disminuido dramáticamente la profundidad de las bibliotecas.



6.7.7 Número de miRNAs en respuesta a los tratamientos

A partir de los valores normalizados se obtuvo la expresión relativa de cada miRNA dividiendo el valor de la abundancia del tratamiento entre la del control. Los datos fueron agrupados en miRNA inducido, sin cambio y reprimido, usando los filtros de valores mostrados en la Tabla 26.

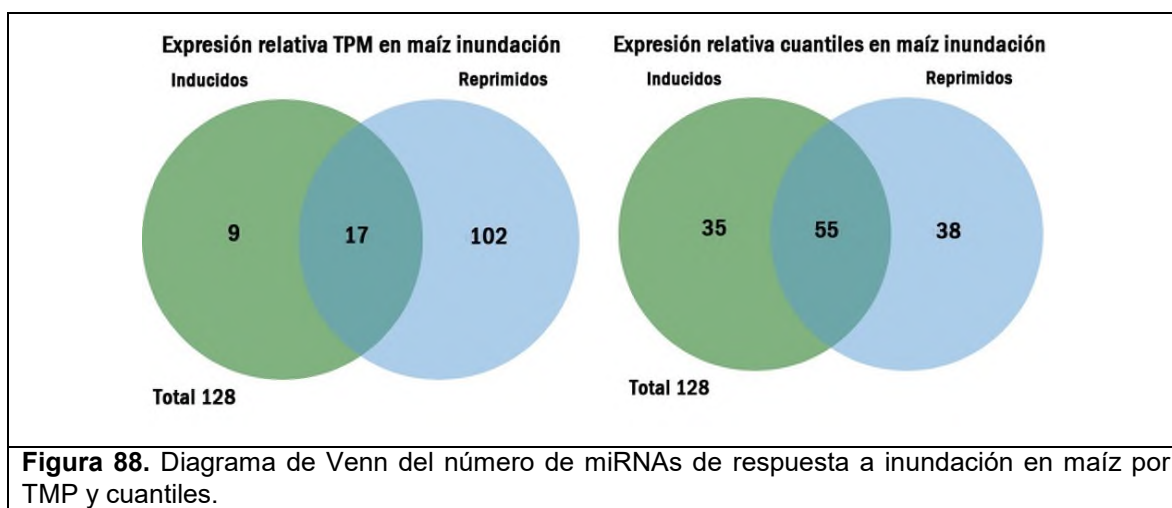
Tabla 26. Filtro de valores de expresión relativa

Expresión relativa	Valor de expresión por doblez	Filtro
Inducido	$\log_2(\text{lecturas normalizadas tratamiento} / \text{lecturas normalizadas control}) = \log_2(1.5) = 0.58$	≥ 0.58
Sin cambio	$\log_2(0.6)$ a $\log_2(1.5)$	$[-0.58 \text{ a } 0.58]$
Reprimido	$\log_2(\text{lecturas normalizadas tratamiento} / \text{lecturas normalizadas control}) = \log_2(0.6) = -0.58$	≤ -0.58

Los resultados de los filtros agruparon los miRNAs por expresión y se realizaron diagramas de Venn para representar los resultados en cada tratamiento, especie y tipo de normalización aplicado.

6.7.8 Número de miRNAs de respuesta a tratamientos individuales en maíz

Las Figuras 88 y 89 muestran diagramas de Venn con el número de miRNAs inducidos (circulo izquierdo), sin cambio (área compartida por los círculos) y reprimidos (circulo derecho). Obtuvimos que la normalización por TPM resulta con ~80% de reprimidos inundación y ~65% en sequía. En cambio, la normalización por cuantiles muestra resultados más equilibrados entre inducidos y reprimidos en los mismos tratamientos.



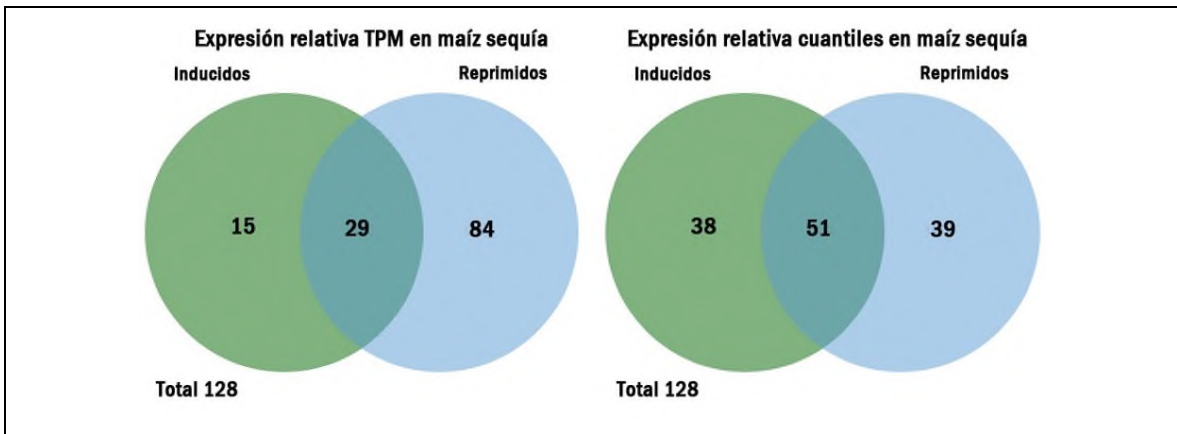


Figura 89. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a sequía en maíz por TPM y cuantiles.

6.7.9 Número de miRNAs de respuesta a tratamientos individuales en teocintle

En Parviglumis que el método por TPM se reprime ~50% de miRNAs en inundación y sequía (Figura 90). Los miRNAs de cuantiles muestran también bajo número de inducidos (Figura 91).

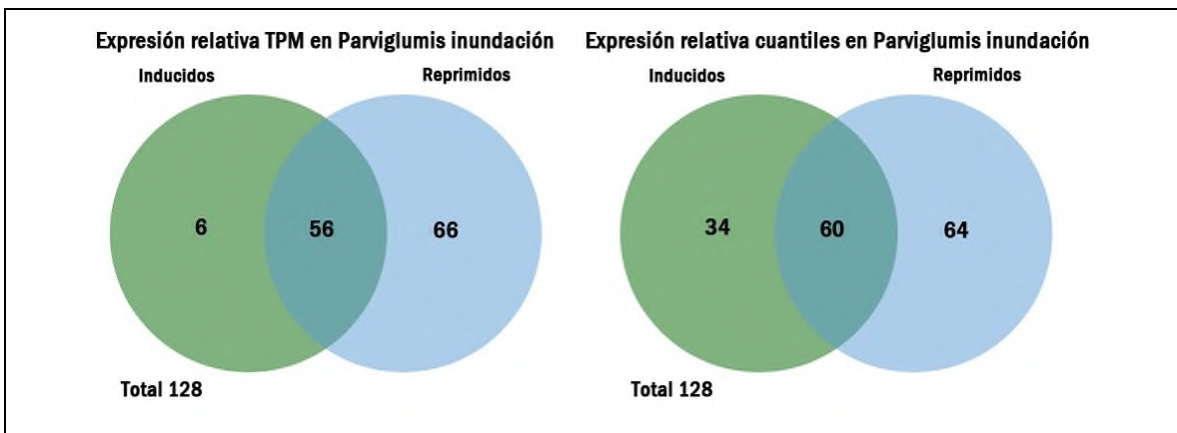
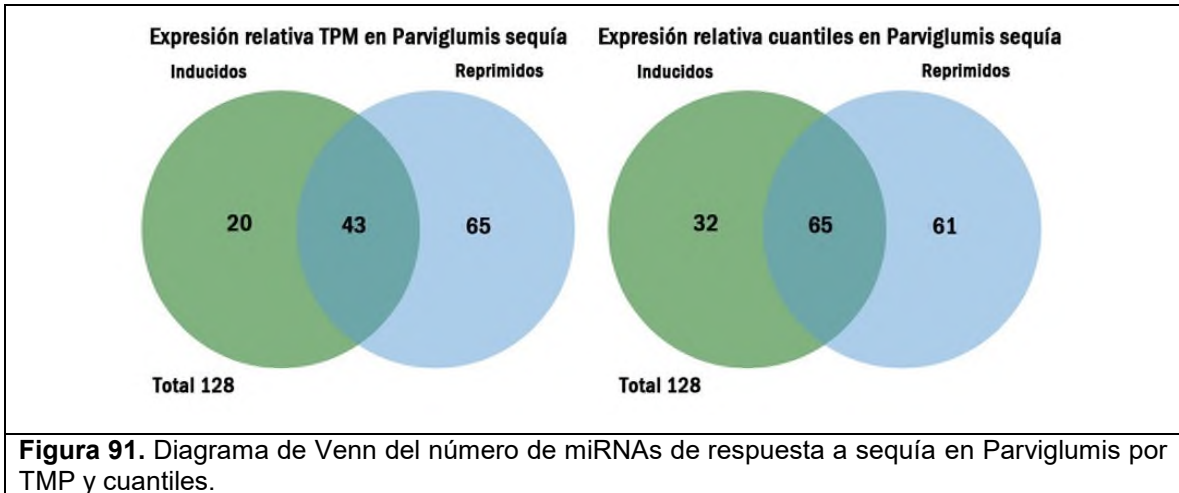
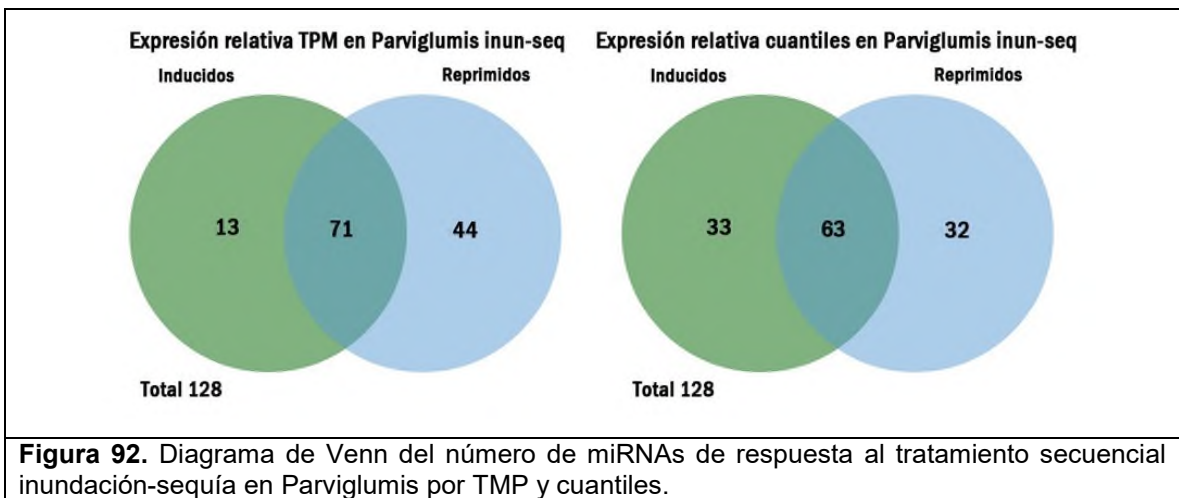


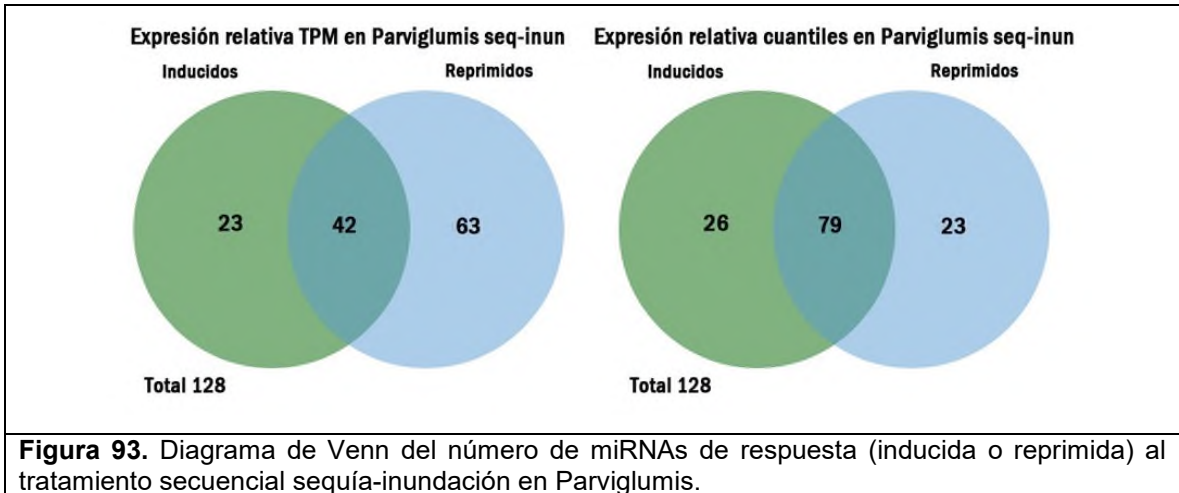
Figura 90. Diagrama de Venn del número de miRNAs de respuesta a inundación en Parviglumis por TPM y cuantiles.



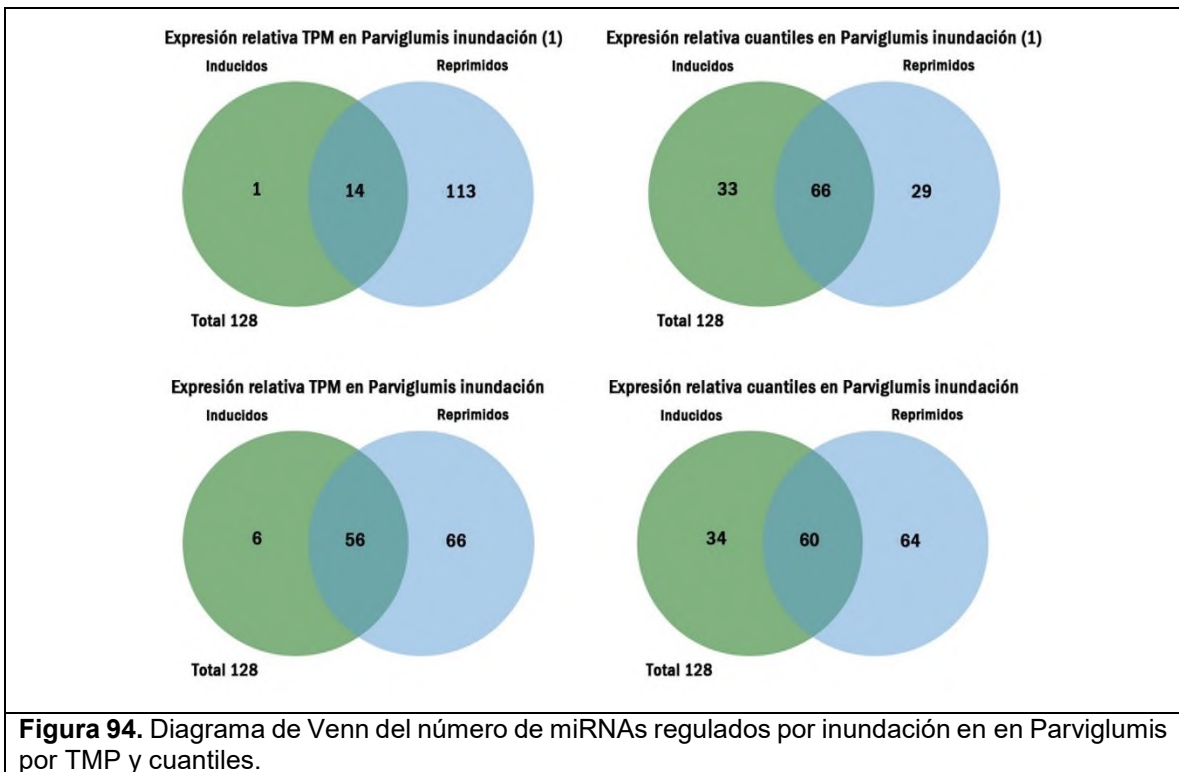
6.7.10 Número de miRNAs de respuesta a tratamientos secuenciales en teocintle

El análisis de los miRNAs regulados en tratamientos de estrés secuencial (inundación-sequía y sequía-inundación) muestra la misma tendencia que los casos de ya presentados. Por el método de cuantiles que el 50% de miRNAs no cambia su expresión en los dos tratamientos seriados (Figuras 92 y 93).





Adicionalmente comparamos la expresión de los miRNAs en las bibliotecas malas. El resultado comparado con PC y PI el cual es similar, nos da otra evidencia que podemos usar las bibliotecas de PC(1) y PI(1) como fuente de información para sostener la expresión obtenida por inundación en Parviglumis (Figura 94).



6.7.11 Análisis de expresión comparativa de miRNAs entre tratamientos.

Para mostrar la expresión comparativa de los miRNAs de respuesta al estrés, con respecto al tratamiento control, se generaron los HeatMaps. La diferencia entre los diagramas de Venn y HeatMap es que se puede visualizar a los miRNAs como elementos de gráfico manteniendo su valor de expresión relativa. En la Figura 95 se muestran las configuraciones de tres formas de representar los valores de expresión relativa: acumulación, doblez y HeatMap.

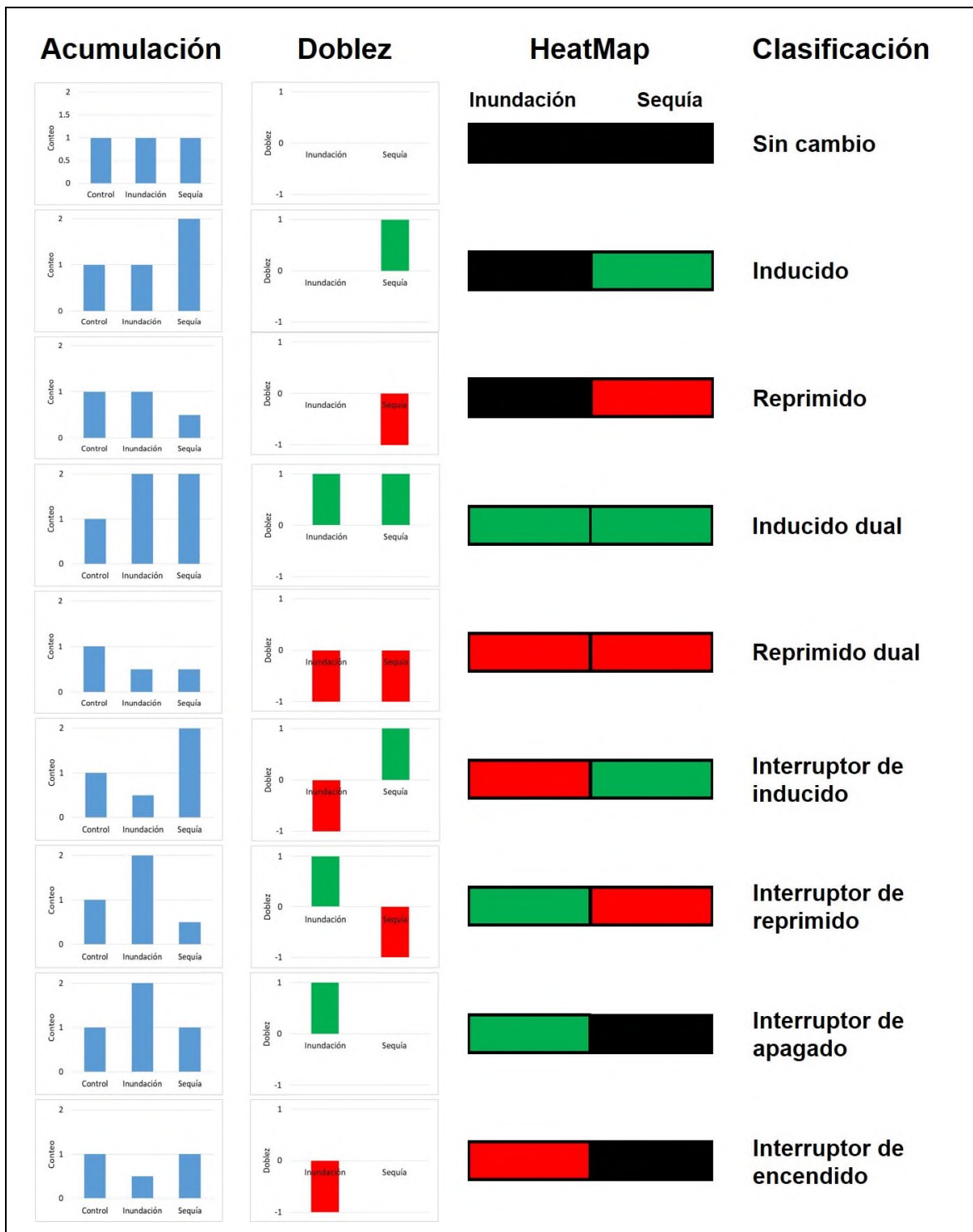


Figura 95. Representación e interpretación de los valores de expresión. La columna de acumulación representa los valores normalizados, la columna doblez son los valores de expresión relativa obtenida de la relación tratamiento-control, y la última columna son los valores de expresión relativa, representada en códigos de color en el HeatMap. En filas se encuentra la clasificación de los tipos de expresión, basados en los valores de expresión relativa.

Los heatmaps se generaron a partir de los valores de expresión relativa. Para tener una alta confianza de los miRNAs expresados relativamente se aplicaron tres filtros y se graficaron los resultados en cada aplicación:

a) Filtro de lecturas normalizadas: Primer filtro aplicado, seleccionando miRNAs con 10 lecturas por millón.

b) Filtro de lecturas por doblez: Los resultados del primer filtro se volvieron a filtrar con los valores de expresión relativa usando ≤ -0.58 (inducidos) y ≥ 0.58 (reprimidos).

c) Filtro de lecturas significativas: Este filtro se ejecutó sobre los resultados de lecturas por doblez. Solo quedaron los valores de corte mínimo igual 0.05 obtenidos de la prueba estadística Fisher (descrito en materiales y métodos 5.12).

Este procedimiento de filtrado se realizó para los dos métodos de normalización. En la Figura 96 se muestran los resultados finales de la aplicación de filtros para cada biblioteca.

El Heatmap resultante después de cada filtro se muestra en Apéndice D.

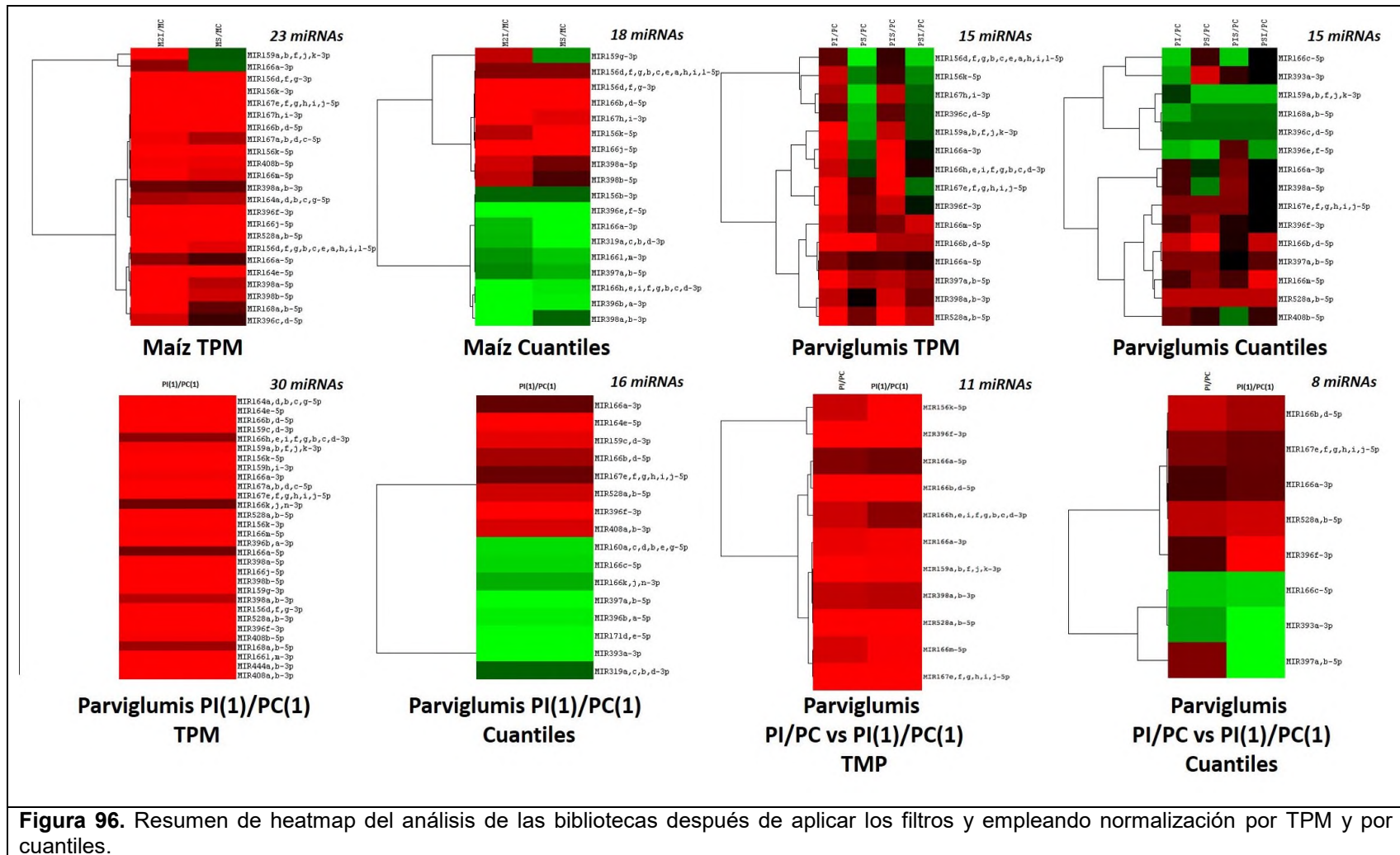


Figura 96. Resumen de heatmap del análisis de las bibliotecas después de aplicar los filtros y empleando normalización por TPM y por cuantiles.

El análisis de los resultados permitió identificar miRNAs que presentan patrones de expresión similar entre los tratamientos aplicados y aquellos que presentan patrones opuestos. En la Tabla 27 y 28 se presentan los resultados de dicho análisis.

Tabla 27. Número de miRNAs de respuesta similar u opuesta en los tratamientos aplicados. El número antes de la barra diagonal es de TPM, y el posterior es de cuantiles.

Espece	Comparación	Reprimido en ambos	Inducido en ambos	Interruptor de inducido	Interruptor de reprimido
Maíz	MI y MS	21/8	0/9	2/1	0/0
<i>Parviglumis</i>	PI y PS	8/7	0/4	7/2	0/2
	PI y PIS	15/8	0/4	0/1	0/2
	PI y PSI	7/5	0/4	8/4	0/2
	PS y PIS	8/6	0/3	7/3	0/3
	PS y PSI	6/5	6/4	2/4	1/2
	PI y PI(1)	11/5	0/2	0/1	0/0

Tabla 28. Identificación de miRNAs de respuesta similar u opuesta a los tratamientos aplicados, de acuerdo a datos normalizados por cuantiles.

miRNA	MI	MS	PI	PS	PIS	PSI	PI(1)	Interpretación
miR159g-3p	↓	↑						Opuesta
miR156d,f,g,b,c,e,a,h,i,l-5p	↓	↓						Similar
miR156d,f,g,-3p	↓	↓						Similar
miR166d,b-5p	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	Similar
miR167h,i-3p	↓	↓						Similar
mir156k-5p	↓	↓						Similar
miR166j-5p	↓	↓						Similar
miR398a-5p	↓	↓	↓	↑	↓	=		Similar(M), opuesta (P)
miR398b-5p	↓	↓						Similar
miR156b-3p	↑	↑						Similar

Continúa la Tabla 28

miR396e,f-5p	↑	↑	↑	↑	↓	↑		Similar
miR166a-3p	↑	↑	=	=	↓	=	↓	Similar
miR319a,c,b,d-3p	↑	↑						Similar
mir166l,k-3p	↑	↑						Similar
mir397a,b-5p	↑	↑	↓	↓	=	↓	↑	Similar
miR166h,e,i,f,g,b,c,d-3p	↑	↑						Similar
miR396b,a-3p	↑	↑						Similar
miR398a,b-3p	↑	↑						Similar
miR166c-5p			↑	=	↑	=	↑	Opuesta
miR393a-3p			↑	↓	=	=	↑	Opuesta
miR159a,b,f,j,k-3p			=	↑	↑	↑		Opuesta
miR168a,b-5p			↑	↑	↑	↑		Similar
miR396c,d-5p			↑	↑	↑	↑		Similar
mir167e,f,g,h,i,j-5p			↓	↓	↓	=	↓	Similar
miR396f-3p			↓	↓	=	=	↓	Similar
miR166a-5p			=	↓	=	↓		Opuesta
miR528a,b-5p			↓	↓	↓	↓	↓	Similar
miR408b-5p			↓	=	↑	=		Opuesta

6.7.12 Análisis comparativo de expresión de miRNAs entre especies

Un grupo importante de miRNAs son aquellos que se expresan diferencialmente en respuesta al de estrés en un patrón similar en las dos especies analizadas. Éstos serían miRNAs con expresión conservado en respuesta al estrés entre maíz y *Parviglumis*. En el Heatmap de la Figura 97 se muestran los valores de expresión de los tratamientos de inundación y sequía. La aplicación de los filtros se muestra en la Apéndice D.

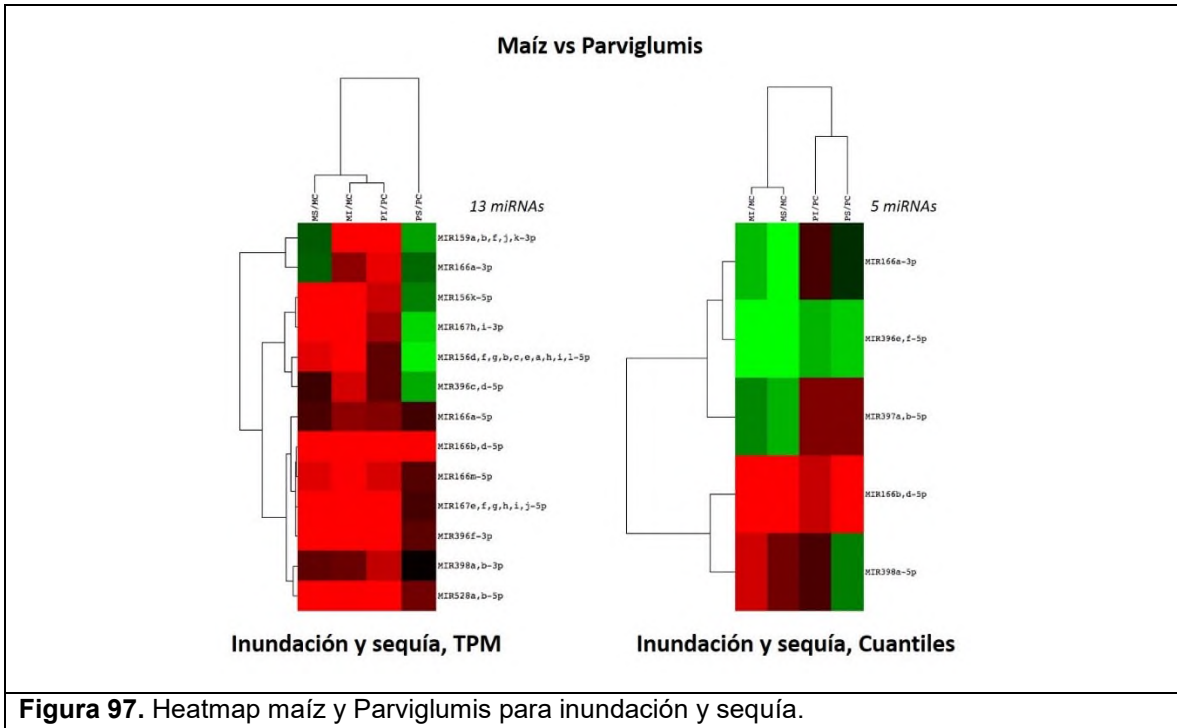


Figura 97. Heatmap maíz y Parviglumis para inundación y sequía.

La expresión de los miRNAs de maíz y Parviglumis para inundación y sequía deberían presentar el mismo patrón de expresión en alguna fila como el caso de miR166b,d-5p por TPM y cuantiles por lo tanto, es un miRNA común que se reprime por ambos estreses y cuyo patrón de expresión se conserva tanto en maíz como en Parviglumis. En cambio, miR166a-3p (cuantiles) y miR159a,b,f,j,k-3p (TPM) se comportan como interruptores que se reprimen por inundación y se inducen por sequía; el mismo perfil de interruptor se presenta en ambas especies. Adicionalmente, la normalización por cuantiles reveló que miR396e,f-5p induce su expresión en respuesta estrés de ambos tratamientos en las dos maíz y Parviglumis.

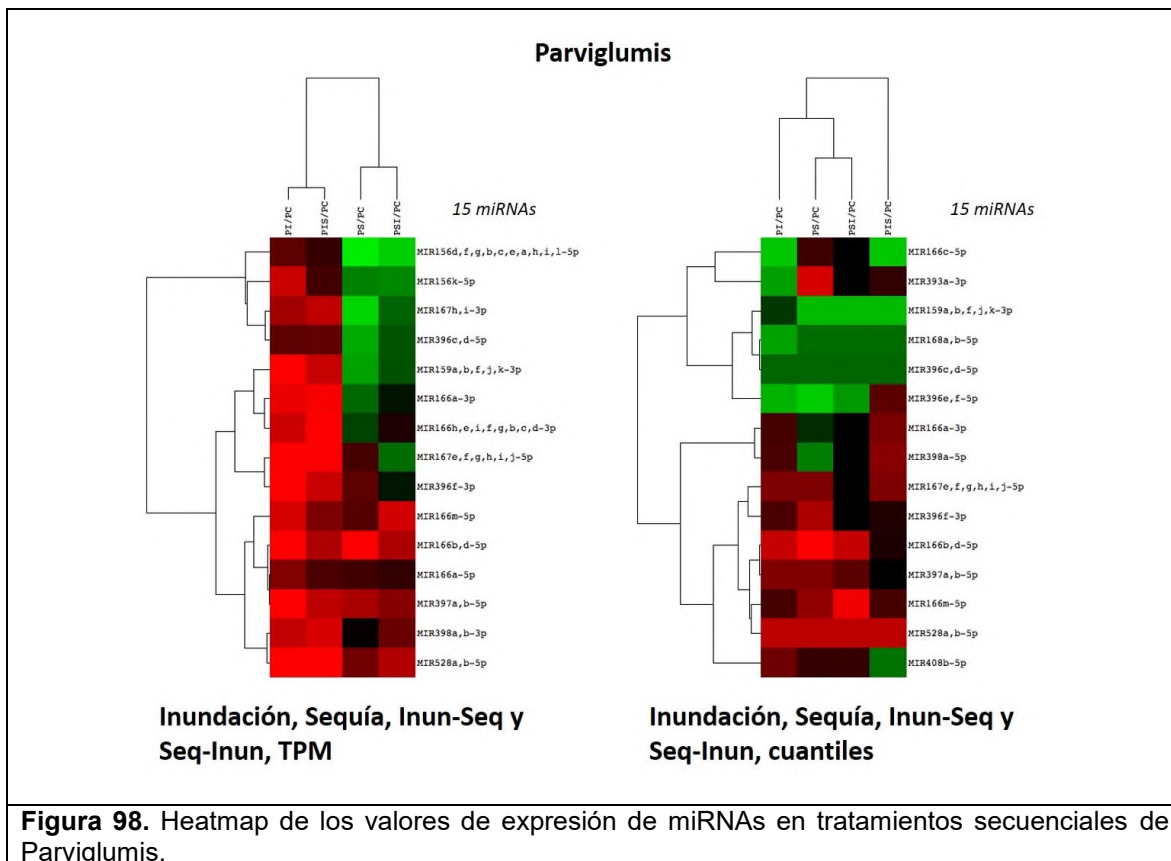
En la Tabla 29 se muestra el resumen del número de miRNAs de las dos normalizaciones después del filtro en Fisher para la identificación de miRNAs comunes entre especie y tratamiento.

Tabla 29. Número de miRNAs de regulación conservada en las especies y por tratamientos. El número antes de la barra diagonal es de TPM y después cuantiles.

Comparación	Reprimido	Inducido	Interruptor de inducido	Interruptor de reprimido
MI y PI	12/2	0/1	0/0	0/1
MI y PS	7/1	0/1	5/1	0/1

6.7.13 Análisis comparativo de expresión de miRNAs en tratamientos de estrés secuenciales en Parviglumis

Con el fin de identificar el comportamiento de los tratamientos seriados se analizaron los miRNAs de inundación, sequía, inundación-sequía y sequía-inundación agrupados en Heatmap (Figura 98). Para esto, se aplicaron los filtros previamente especificados en la sección 6.7.11. Apéndice D se muestran los miRNAs descartados en cada filtro.



Analizando la imagen previa se puede conocer que tratamiento está dominando en el seriado, esto es, saber si inundación o sequía predominan en inundación-sequía o sequía-inundación. Los miRNAs normalizados por TPM muestran que PI tiene relación con PIS y PS con PSI representado en ambos casos el tratamiento individual, esto podría indicar que el primer tratamiento es el que permanece en los seriados. Para el caso de la normalización por cuantiles, se observa en el heatmap que el tratamiento PI tiene mayor relación con PS y PSI.

En la Tabla 30 se muestra el resumen de la expresión de los miRNA para los tratamientos en Parviglumis.

Tabla 30. Resumen de la identificación de la expresión de miRNAs en los tratamientos. El número antes de la barra diagonal es de TPM y después cuantiles.

Comparación	Reprimido	Inducido	Interruptor de inducido	Interruptor de reprimido
PI y PIS	14/7	0/4	0/2	0/1
PI y PS	8/9	0/4	6/0	0/1
PI y PIS	7/8	0/3	7/1	0/2
PIS y PS	8/8	0/4	6/0	0/2
PIS y PSI	7/7	0/3	7/1	0/3
PS y PSI	0/9	5/3	2/1	1/1

Cuando se realizaron los tratamientos seriados, se estableció determinar si en estos tratamientos ocurre una reprogramación en la acumulación de los miRNA detectados de los tratamientos individuales, o se manifiesta una dominación de un tratamiento, dependiendo de si fue inicial o final. Para esto se realizó un análisis comparativo por dos métodos gráficos. El primero consistió en graficar los logaritmos (base 2) de las lecturas de los miRNA de los tratamientos seriados contra los tratamientos individuales.

Si existe un comportamiento igual de los seriados con los individuales obtendríamos una línea recta con una ecuación lineal con valor de la pendiente igual a 1. Para el segundo, se graficó la relación del dobléz ($\log_2(\text{lecturas del tratamiento serial/tratamiento individual})$). Con esto, si los valores son iguales nos daría una pendiente igual a cero. Para ambas comparaciones también se consideró el valor de coeficiente de determinación (R^2) el cual tendría una aproximación a 1 y para el dobléz sería un valor con tendencia a 0 debido a que no se presentaría relación. Para detectar si hubo un incremento o reducción (sinergia o antagonismo) se realizó una multiplicación de las lecturas de cada miRNA de los tratamientos individuales por 0.5, 2, 5 y 10. Los resultados se muestran en la Figuras 99 y 100 para TPM y cuantiles, respectivamente.

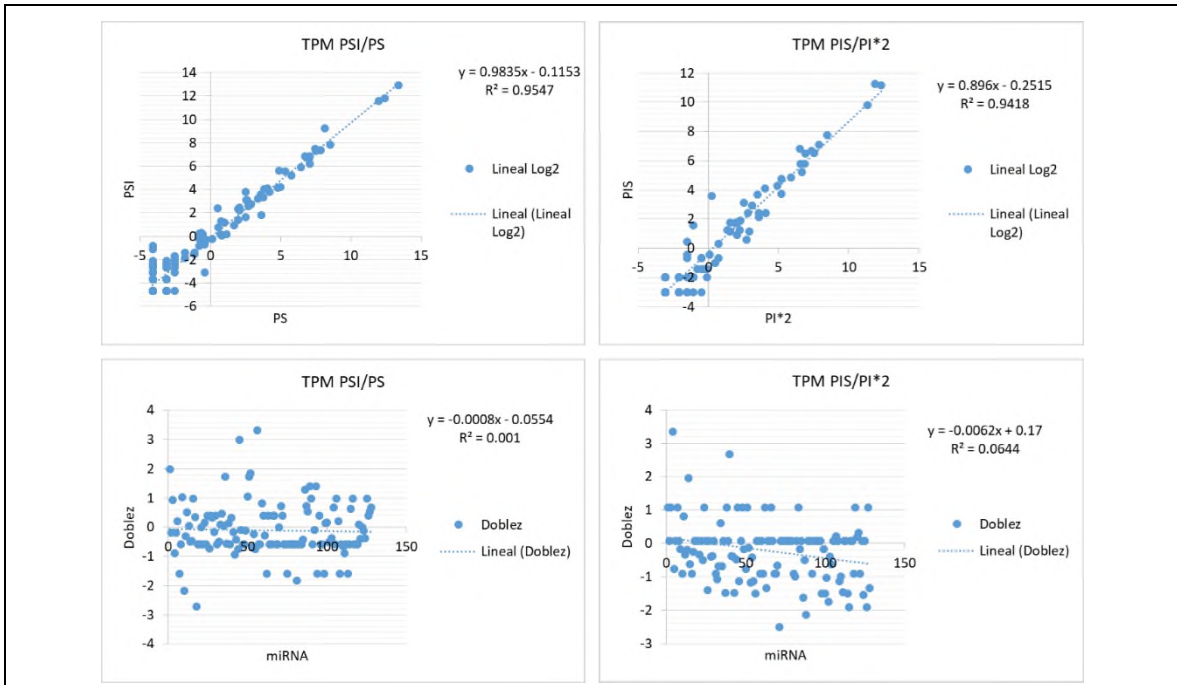


Figura 99. Comparación mediante gráficos de dispersión de los tratamientos individuales con los seriados normalizados por TPM.

En las Tablas 31 a 32 se muestran los datos de pendiente y el coeficiente de determinación de los ajustes de multiplicación de los tratamientos individuales contra los seriados.

Tabla 31. Valores de las variables de la comparación de PIS/PI*X de la gráfica de log₂.

Variables	TPM				Cuantiles			
	I*0.5	I*1	I*2	I*10	I*0.5	I*1	I*2	I*10
Pendiente (m)	0.7096	0.8433	0.9001	0.6212	0.8832	0.9645	0.9372	0.5852
Coefficiente de determinación	0.7901	0.9092	0.9363	0.5842	0.8803	0.9286	0.8686	0.4864

Tabla 32. Valores de las variables de la comparación de PIS/PI*X de la gráfica de doblez.

Variables	TPM				Cuantiles			
	I*0.5	I*1	I*2	I*10	I*0.5	I*1	I*2	I*10
Pendiente (m)	0.0191	0.0075	-0.0042	-0.0313	0.0097	-0.0019	-0.0136	0.0407
Coefficiente de determinación	-1.371	-0.353	0.0556	-1.348	-0.414	0.0178	0.0189	-1.638

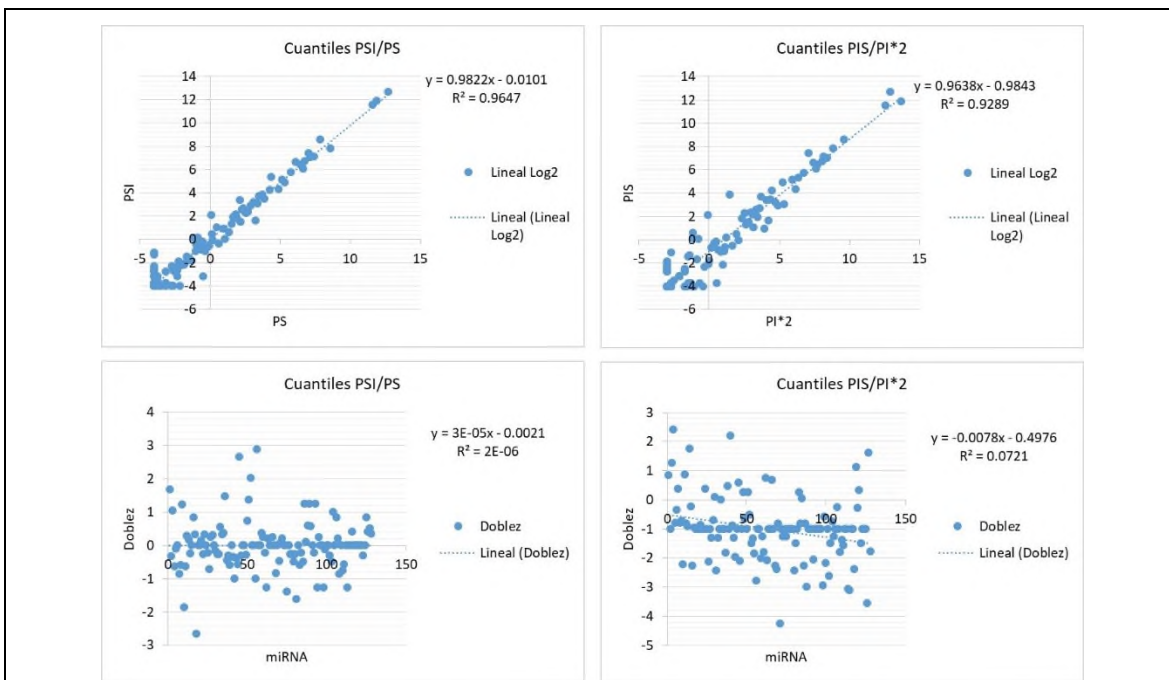


Figura 100. Comparación mediante gráficos de dispersión de los tratamientos individuales con los seriados normalizados por Cuantiles.

Tabla 33. Valores de las variables de la comparación de PSI/PS*X de la gráfica de log₂.

Variables	TPM				Cuantiles			
	S*0.5	S*1	S*2	S*10	S*0.5	S*1	S*2	S*10
Pendiente (m)	0.9175	0.9869	0.955	0.6146	0.8991	0.9825	0.9553	0.5977
Coefficiente de determinación	0.9178	0.954	0.8885	0.5132	0.9131	0.9647	0.9033	0.5081

Tabla 34. Valores de las variables de la comparación de PSI/PS*X de la gráfica de doblez.

Variables	TPM				Cuantiles			
	S*0.5	S*1	S*2	S*10	S*0.5	S*1	S*2	S*10
Pendiente (m)	0.0102	-0.0014	-0.0131	-0.402	0.0117	8e-6	-0.0117	-0.0388
Coefficiente de determinación	0.267	0.0001	-0.334	-3.43	-0.435	6e-7	-0.439	-4.83

Los valores pendiente y coeficiente de determinación elegidos para Log₂ fueron los cercanos a 1 y para doblez los valores de pendiente y coeficiente de determinación con tendencia a 0. De estos resultados, se encontró que en el tratamiento seriado inundación-sequía predomina el tratamiento de inundación en forma aditiva. Para el caso del tratamiento sequía-inundación el estrés prevaeciente fue sequía.

La correlación de las dos normalizaciones es muy parecida. Elegimos la normalización por cuantiles en base al coeficiente de determinación y valor de la pendiente con tendencia 1 en los gráficos de Lineal Log₂, y en los gráficos de Folding se eligieron aquellos cuya pendiente fue cercana a 0.

Otras configuraciones fueron establecidas como lo es la suma de sequía e inundación sobre los seriados estos graficos se muestran en las Figuras 131 y 132 de Apéndice F.

6.8 Selección del método de normalización.

Se hicieron reacciones de qPCR para amplificar miRNAs de respuesta a sequía en las muestras de maíz y Parviglumis. miR528a/b-5p, miR167e/f/g/h/i/j-5p, miR159a/b/f/j/k-3p se eligieron por su expresión variable mientras que el miR166a-3p se tomó como constitutivo de resultados previos (Pulido, 2014).

Los resultados de qPCR se compararon con los obtenidos después de la depuración de las bibliotecas. Esperabamos en la comparación una dispersión con un coeficiente de correlación (R) y coeficiente de determinación con tendencia a 1. En la Figura 101 se muestra el miR167e/f/g/h/i/j-5p que cumplió las condiciones.

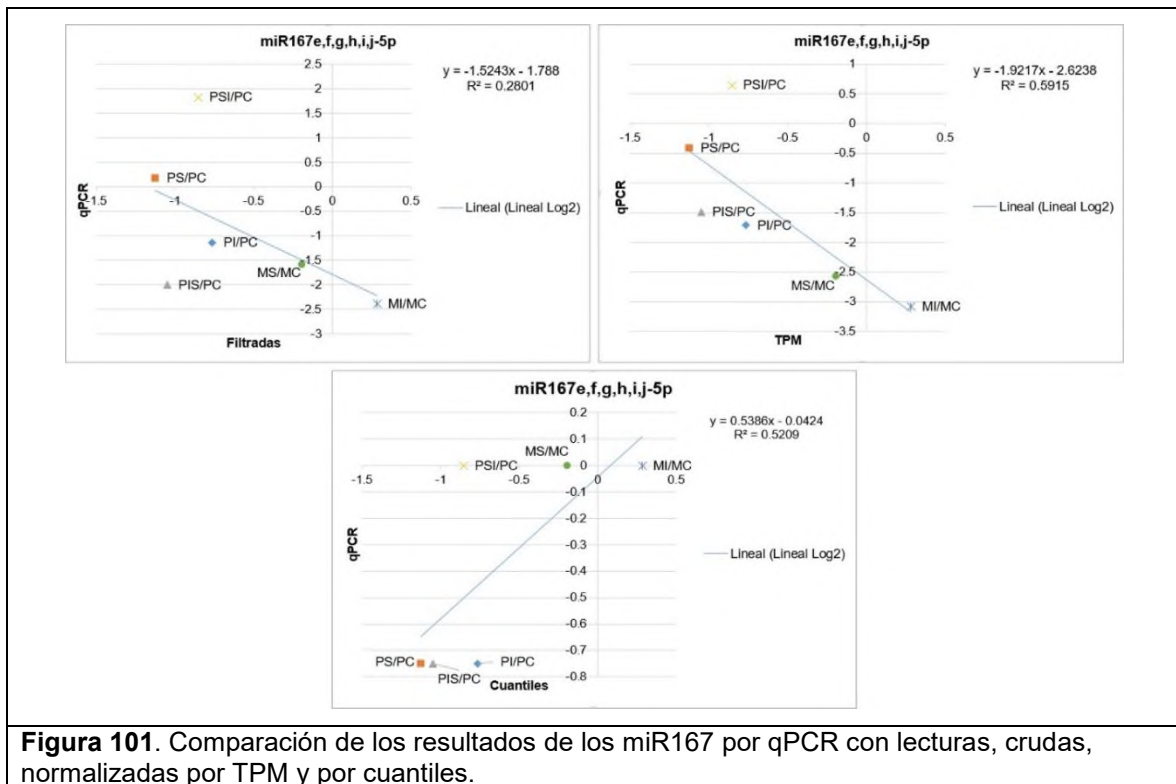


Figura 101. Comparación de los resultados de los miR167 por qPCR con lecturas, crudas, normalizadas por TPM y por cuantiles.

Tabla 35. Coeficiente de correlación y determinación del miR166 para las comparaciones con qPCR.

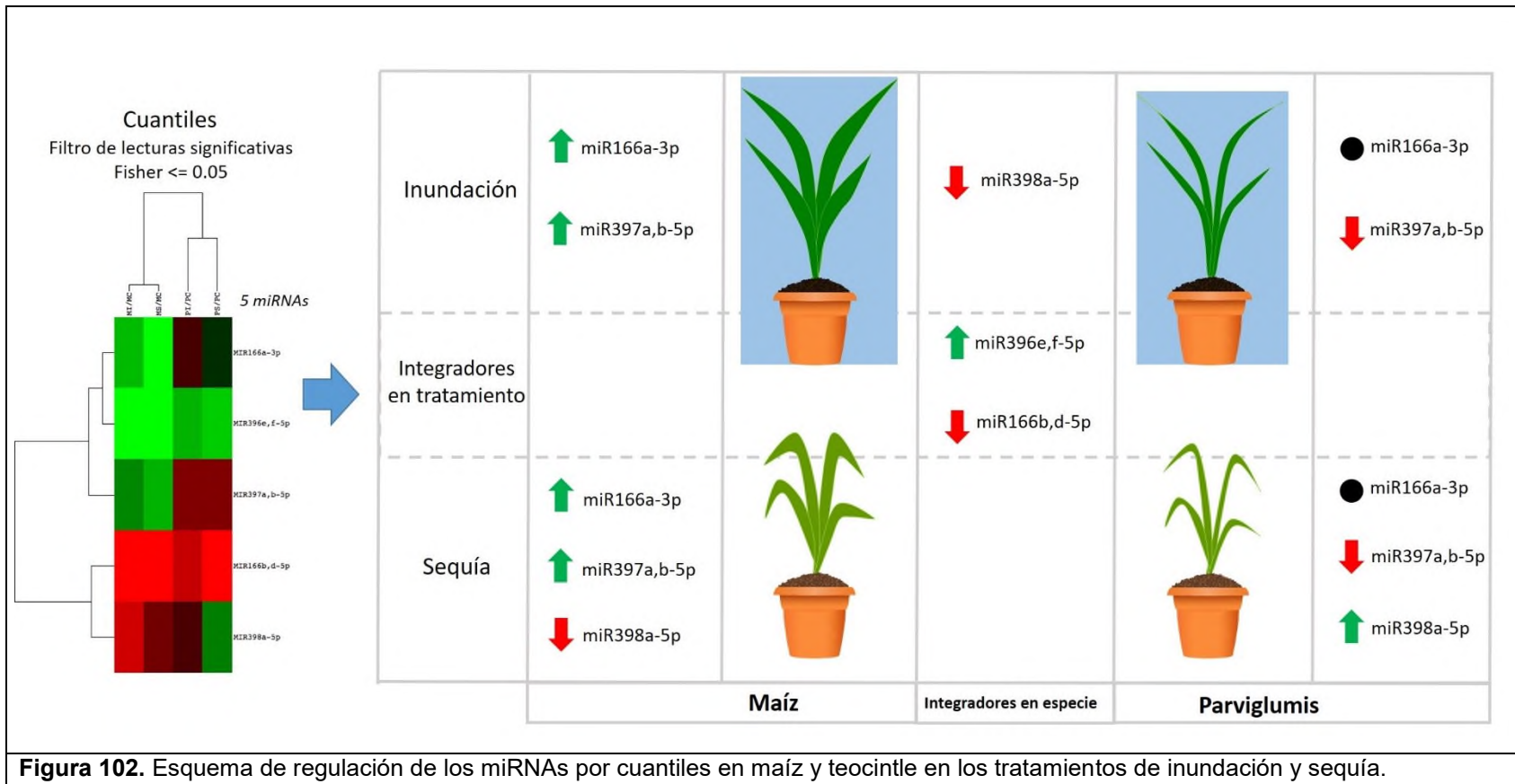
	qPCR/filtradas	qPCR/TPM	qPCR/Cuantiles
mir167 R	-0.53	-0.77	0.72
mir167 R2	0.28	0.59	0.52

Consideramos que las lecturas filtradas así como las normalizadas por TPM del miR167 así como los otros miRNAs analizados no se ajustaron a un coeficiente de correlación positiva por dos hechos:

- El MIR166a-3p no se comporta como constitutivo en los tratamientos aplicados a las especies analizadas.
- El oligonucleótido usado para amplificar el miR166a-3p podría amplificar isoformas del miR166.

6.9 Esquema de regulación de los miRNAs en inundación y sequía en *Parvoglumis* y maíz de la normalización por cuantiles

Con los análisis de expresión realizados se determinó que el método de normalización por cuantiles fue el que representó el comportamiento biológico de forma más consistente. En la Figura 101 se muestra un esquema realizado tomando en cuenta los resultados del Heatmap de cuantiles cuando se compararon los tratamientos individuales de inundación y sequía de maíz y *Parvoglumis*.



En la Figura 102 podemos notar que el miR166a-3p es un integrador del estrés por sequía y por inundación en ambas plantas, con la única diferencia de que en maíz se induce, mientras que en teocintle no registró cambio. Por lo tanto, el perfil de expresión se mantiene entre tipos de estrés, pero es distinto en función de la especie.

Previamente, Kulcheski *et al*, 2011 reportó miRNAs de soya en respuesta a estrés por sequía. Cuando comparó líneas de soya sensibles y tolerantes a la sequía, encontró que algunos miembros de la familia miR166 se reprimen en las líneas sensibles, mientras que en las tolerantes se induce su expresión. Las diferencias observadas en este trabajo podrían relacionarse a la posibilidad de que *Parvoglumis* sea una planta más tolerante al estrés que maíz y que la similitud en el patrón de expresión observado en este trabajo con respecto al patrón de miR166a-3p en soya, corresponda a la diferencia del nivel de tolerancia en las plantas analizadas.

Para dar mayor soporte a esta posibilidad, cabe mencionar que Kulcheski *et al* (2011) también reportó el perfil de expresión de miR397a,b y observó que, al igual que miR166a, induce su expresión en líneas de soya sensibles a sequía, mientras que la reprime en líneas tolerantes. En este trabajo, miR397a,b se induce en maíz en ambos estreses, mientras que en *Parvoglumis* se reprime (Figura 102), en la misma forma que lo reportado en soya. Por lo tanto, miR166a-3p y miR397a,b podrían ser miRNAs clave en la integración de la respuesta a ambos tipos de estrés y además potencialmente estar asociados a la tolerancia de *Parvoglumis*. En el trabajo de Kulcheski *et al* (2011) no se analizó el perfil de expresión de estos miRNAs en condiciones de inundación o sumersión, pero se ha reportado en *Nelumbo nucifera* la represión de miR397 en respuesta a la sumersión (Jin *et al*, 2017).

Las diferencias en los patrones de expresión de miRNAs entre dos especies relacionadas, o entre subespecies o líneas de la misma especie que han sido sometidas a los mismos tratamientos podrían deberse a diferencias en elementos de regulación, ya sea en el promotor de los miRNAs y/o en factores de transcripción necesarios para la expresión. También es probable que esto pueda deberse a diferencias de sensibilidad o percepción del estrés entre ambas plantas.

Los miRNAs miR166 controlan genes que codifican factores de transcripción tipo HD-ZIP, que están involucrados en el desarrollo de los meristemas. Por su parte, miR397a,b-5p se induce por diversos estreses abióticos como frío, salinidad y sequía (Sunkar y Zhu, 2004; Zhao *et al*, 2007), así como por estrés oxidativo inducido por la deficiencia de cobre (Li *et*

al, 2011), y ha sido asociado a la tolerancia a la sequía en *Brachypodium* (Bertolini *et al*, 2013) y en caña de azúcar (Ferreira *et al*, 2012). Los miRNAs de la familia miR397 tienen como blancos a genes que codifican lacasas, las cuales están implicadas en el metabolismo de la lignina, que podría ser crítico para el reajuste de la arquitectura de las paredes celulares en respuesta al estrés (Lu *et al*, 2013).

Otro miRNA identificado por su perfil de expresión es miR398a-5p. Este miRNA se reprime por sequía en maíz, y en contraste, se induce en *Parviglumis*. miR398 se ha identificado en diversos trabajos como un miRNA de respuesta a estrés abiótico. Por ejemplo, miR398 se reprime por ozono y estrés salino en *Arabidopsis* (Jagadeeswaran *et al*, 2009) y *M. truncatula* (Wang *et al*, 2011), aunque también se ha reportado su inducción por sequía en *M. truncatula* (Trindade *et al*, 2010). Probablemente estas diferencias se deben a diferentes formas, intensidades y duraciones de los tratamientos de sequía aplicados en cada caso.

miR398 tiene como genes blanco los que codifican proteínas superóxido dismutasas de cobre y zinc, COX y plantacianinas, implicadas en la defensa antioxidante, por lo que la represión de miR398 liberaría del control a sus genes blanco para que funcionen eficientemente en la respuesta antioxidante. El hecho de que este miRNA se reprima en maíz, pero se induzca en *Parviglumis*, aún cuando se apliquen tratamientos idénticos de estrés, controlados en forma, intensidad y duración en ambas plantas, solo se explica si las plantas internamente se encuentran en niveles de estrés oxidativo distintos. Probablemente *Parviglumis* posea mecanismos de defensa más tempranos y no alcance niveles de estrés oxidativo elevados, y por lo tanto, requiera suprimir la actividad de las enzimas antioxidantes; caso contrario a lo que podría suceder en maíz con un nivel de estrés oxidativo que podría demandar la actividad aumentada de enzimas de defensa.

Dos miRNAs identificados en este trabajo muestran perfiles de expresión que integran la respuesta a sequía e inundación, así como entre las subespecies analizadas, es decir, que presentan expresión similar en ambos tratamientos y en ambas especies. Uno de estos miRNAs es miR166b,d-5p, que a diferencia de miR166a-3p no se regula en forma diferencial en función de la especie. Es probable que estos dos miRNAs de la familia miR166 tengan por blanco genes que codifiquen elementos funcionalmente diversos en la ruta del control del crecimiento, y por lo tanto, siguen patrones de regulación distintos.

De forma similar a miR166b,d-5p, miR396 integra la respuesta a ambos estreses en las dos subespecies analizadas. miR396 se ha identificado como un miRNA reprimido en respuesta

a sequía en diversas plantas como *M. truncatula* (Wang *et al*, 2011) en las que libera de su control a sus genes blanco, los cuales codifican factores reguladores de crecimiento o Growth Regulating Factors (GRF) y con esto se promueve la proliferación celular en respuesta al estrés.

Es importante considerar que la proliferación celular, y en general, el crecimiento, son procesos finamente regulados en función de la intensidad y duración del estrés, de tal forma que en ciertos niveles de estrés, se promoverá el crecimiento (como en el caso del escape a la inundación), mientras que condiciones de estrés de otro nivel se podría observar la tendencia a reducir o estabilizar el crecimiento (como en la quiescencia).

En este trabajo, miR396 induce su expresión en ambos tratamientos y ambas plantas analizadas, lo cual indica su actividad sobre GRFs para controlar y limitar el crecimiento como respuesta conservativa al estrés hídrico. Esto es consistente con las observaciones realizadas en este trabajo, en las que se registró la disminución del crecimiento de maíz y Parviglumis en los tratamientos de estrés.

En resumen, los microRNAs identificados en este trabajo revelan que el desarrollo, el reajuste de la arquitectura celular, y la respuesta al estrés oxidativo, son los aspectos más importantes que se encuentran bajo la regulación de miRNAs respuesta a estrés por sequía o inundación, y que éstos podrían ser elementos clave para explicar la conservación y la divergencia de la tolerancia al estrés en maíz y teocintle.

7. Conclusiones

Los parámetros fisiológicos empleados para evaluar la respuesta a la sequía o la inundación no permitieron observar diferencias claras en la capacidad de tolerar el estrés entre maíz y teocintle, bajo las condiciones de experimentación.

El protocolo de construcción de bibliotecas de RNAs pequeños aplicado en este trabajo resultó útil para generar datos de secuenciación de buena calidad, para el análisis de expresión de microRNAs en maíz y teocintle.

El método de normalización de datos de secuenciación por cuantiles resultó ser el más adecuado porque presenta un equilibrio entre inducción y represión de microRNAs, que es característico en la respuesta de las plantas al estrés.

Mediante el análisis de expresión de miRNAs en plantas bajo estreses secuenciales, fue posible observar que el estrés primario mantiene el efecto predominante aún después del estrés secundario.

De acuerdo a las condiciones experimentales y resultados de este trabajo, el *Parviglumis* presenta un grupo mayor de miRNAs expresados comparando con el maíz, en el que se incluye a 103 miRNAs expresados en dicotiledóneas y 19 en otras plantas, que no incluyen al maíz.

Mediante el análisis de expresión de miRNAs, fue posible identificar a miR396e,f-5p (inducido) y a miR166b,d-5p (reprimido), como microRNAs que establecen puntos de integración comunes de la respuesta a sequía e inundación en las dos especies estudiadas, por lo que la hipótesis se acepta.

Adicionalmente, miR166a-3p y miR397a,b-5p (inducidos) son integradores de la respuesta a inundación y sequía en maíz, mientras que la represión de miR397a,b-5p conecta la respuesta a ambos estreses en teocintle.

8. Perspectivas

Continuar con la caracterización fisiológica del maíz y del teocintle para la identificación de parámetros (p.ej. formación de aerénquima) que permitan evaluar su capacidad de tolerar el estrés por sequía o inundación, y con ello analizar sus diferencias.

Realizar el análisis de expresión detallado de los microRNAs identificados en este trabajo en puntos clave de los tratamientos de estrés secuencial, para identificar posibles puntos de encendido/apagado, de reprogramación, o de mantenimiento de la respuesta molecular, a lo largo de los tratamientos, en el contexto de la regulación mediada por miRNAs.

Recuperar información de miRNAs que presentaron perfiles de expresión interesantes para los fines de este trabajo, pero que fueron eliminados por alguno de los filtros aplicados, de tal forma que se pueda ampliar el modelo de respuesta al estrés y se logre la identificación de otros miRNAs integradores.

Analizar las poblaciones de RNAs pequeños que no pertenecen al grupo de los miRNAs, para la búsqueda de otros elementos reguladores de RNA que pudieran jugar un papel clave como integradores de la respuesta molecular a los dos tipos de estrés, así como para analizar su conservación en maíz y en teocintle.

Continuar con el estudio de los miRNAs no anotados de maíz y *Parviglumis* realizando un estudio validación mediante abundancia, energía libre y complementado con degradomas para proponer nuevos miRNAs de estrés hídrico conservados en monocotiledóneas o comunes en otras especies.

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 & 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.
- Albert PS, Gao Z, Danilova TV, Birchler JA (2010) Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogenet Genome Res* 129(1-3):6-16.
- Arenas-Huertero C, Pérez B, Rabanal F, Blanco-Melo D, De la Rosa C, Estrada-Navarrete G, Sanchez F, Covarrubias AA, Reyes JL (2009) Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant Molecular Biology* 10:1007.
- Bailey-Serres J, Lee SC, Brinton E (2012) Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 160, 1698–1709.
- Bailey-Serres J, Voesenek LA (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* 59:313-39.
- Barciszewska-Pacak M, Milanowska K, Knop K, Bielewicz D, Nuc P, Plewka P, Pacak AM, Vazquez F, Karlowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z (2015) Arabidopsis microRNA expression regulation in a wide range of abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 6:410.
- Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu Z, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu J-K, Renyi L.(2011) Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology* 11: 127.
- Barrera-Figueroa BE, Wu Z, Liu R (2013) Abiotic stress-associated microRNAs in plants: discovery, expression analysis, and evolution. *Front Biol*, 8(2): 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 Science* 15, 413-428.
- Bertolini E, Verelst W, Horner DS, Gianfranceschi L, Piccolo V, Inzé D, Pé ME, Mica E (2013) Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular Plant* 6: 423-443.
- Bian S, Jiang Y (2009) Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of kentucky blue grass in response to drought stress and recovery. *Sci. Hort.* 120:264–270.
- Blum A (1996) Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Reg* 20:135-148.
- Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 431–434.
- Bohnert HJ , Sheveleva E (1998) Plant stress adaptations-making metabolism move. *Plant Biology* 1:267–274.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones (eds), p 1160, American Society of Plant Physiologists.

- Bray EA (2002) Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Environ* 25(2):153-161.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185-90.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res*, 105: 1-14.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:11715–11720.
- Chang WW, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JKM (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiology* 122: 295–318
- Chapman KD (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci* 11:419–426.
- Chen JH, Jiang HW, Hsieh EJ, Chen HY, Chien CT, Hsieh HL, Lin TP (2012). Drought and salt stress tolerance of an Arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiology*, 158(1): 340-351.
- Chen X. (2004) A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* 303(5666):2022-2025.
- Christianson JA, Llewellyn DJ, Dennis ES, Wilson IW (2010) Global gene expression responses to waterlogging in roots and leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Physiology* 51: 21-37.
- Cushman JC, Bohnert HJ (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3(2):117-124.
- Dalmay T (2006) Short RNAs in environmental adaptation. *Proc. of The Royal Soc*, 273: 1579-1585.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779–795
- Doebley JF (1990) Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ Bot* 44 (3 supplement): 6-27.
- Doebley J (2004) The genetics of maize evolution. *Annu Rev Genet* 38: 37-59
- Dolferus R, Peacock WJ, Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. *Plant Physiol* 105: 1075-1078.
- Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9970–9975
- Ehleringer JR, Cooper TA (1992). On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. *Plant Cell and Environment* 15, 301-306.
- Eldem V, Okay S (2012) Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turk J Agric For* 37:1-21.

Fereira TH, Gentile A, Vilela RD, Lacerda Costa GG, Dias LI; Endres L, Menossi M (2012) MicroRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum spp.*). PLoS ONE 7: e46703.

Flores-Maya S, Olivares Carrillo JL, Flores-Crespo LI, Rivera-Aguilar V (2005) Estudio citogenético del maíz híbrido simple H-311 (*Zea mays ssp. mays*), teocintle chalqueño (*Zea mays ssp. mexicana*) y un híbrido F1 (*Zea mays ssp. mays x Zea Mays ssp. mexicana*). Núm.20, pp.47-72, ISSN 1405-2768; México.

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

Kaya MD, Okçub G, Ataka M, Çikilic Y, Kolsarıcıa Ö (2006) Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Eur. J. Agron. 24: 291–295.

Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. Trends Plant Sci 6: 262–267.

Kulcheski FR, de Oliveira LFV, Molina LG, Almerão MP, Rodrigues FA, Marcolino J, Barbosa JF, Stolf-Moreira R, Nepomuceno AL, Marcelino-Guimarães FC, Abdelnoor RV, Nascimento LC, Carazzolle MF, Pereira GAG, Margis R (2011) Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses 12:307

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.

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. The Plant Cell 14:1605-1619.

Lu S, Sun Y H, Chiang V L (2008) Stress-responsive microRNAs in Populus. Plant J, 55: 131–151.

Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(10):3691-3696.

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. Genes Dev. 16: 1616-1626.

Sunkar R, Zhu J K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. Plant Cell, 16(8): 2001–2019.

Taiz L, Zeiger E (2006) Plant Physiology, 4th Ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts.

Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Feveireiro MP, Santos DM (2010) MiR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in Medicago truncatula. Planta 231: 705-716.

Wang M, Wang Q, Zhang B (2013) Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum L.*). Gene 530: 26–32.

Zhou L, Liu Y, Liu Z, Kong D, Duan M, Luo L (2010) Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. J. Exp. Bot. 61: 4157-4168.

SAGARPA, 2017. Atlas agroalimentario 2017. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017

SIAP. 2004. Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>.

FAO, 2014 Irrigation areas, irrigated crops, environment. <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/didyouknow/index3.stm>

INEGI, 2014. Encuesta Nacional Agropecuaria. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/proyectos/encagro/ena/2014/doc/ena2014_pres.pdf

SAGARPA, 2012. México: el sector agropecuario ante el desafío del cambio climático. <http://www.sagarpa.gob.mx/programas2/evaluacionesExternas/Lists/Otros%20Estudios/Attachments/37/Cambio%20Climatico.pdf>

SAGARPA (2011), Reporte informativo sobre los efectos de la sequía en México. Subsecretaría de Desarrollo Rural de la Secretaría de Agricultura. www.siap.gob.mx diciembre de 2011).

Gurevitch J, Scheiner SM, Fox GA. 2006. The ecology of plants, 2nd edn. Sunderland, MA, USA: Sinauer.

Knight H, Knight MR(2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. TRENDS in Plant Science Vol.6 No.6

MacDonald, AJS, Davies WJ (1996). Keeping in touch - responses of the whole-plant to deficits in water and nitrogen supply. In: Advances in Botanical Research, Vol. 22, 1996, p. 229-300.

Blum A (1996). Crop responses to drought and the interpretation to adaptation. Plant Growth Regulation 20, 135-148

Turner NC (1986). Crop water deficits: A decade of progress. Adv. Agron. 39, 1-51.

Levitt J (1972). Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.

Ludlow MM. (1989). Strategies of response to water stress. In: KreebKH, RichterH, MinckleyTM, eds. Structural and functional responses to environmental stress. The Hague, the Netherlands: SPB Academic, 269–281.

Ehleringbr JR, Cooper TA (1992). On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. Plant, Cell and Environment (1992) 15, 301-306

Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE (2000). Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. Volume 5, Issue 11, p482–488, 1 November 2000

Morgan JM (1984). Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. Vol. 35:299-319

Franks SJ (2011). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. Volume 190, Issue 1. April 2011. Pages 249–257

Verslues PE, Juenger TE (2011). Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. Curr Opin Plant Biol. 2011 Jun;14(3):240-5

Mahajan S, Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch. Biochem. Biophys. 444, 139–158.

Xu Z, Zhou G, Shimizu H (2010). Plant responses to drought and rewatering. Plant Signal Behav. 2010 Jun; 5(6): 649–654.

Hussain M, Malik MA, Farooq M, Ashraf MY, Cheema MA (2008). Improving Drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower, J. Agron. Crop Sci. 194, 193–199.

- Randy RD (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants; *Plant Physiol.* 107 1049–1054
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways; *Curr. Opin Plant Biol.* 3 217–223
- Wahid, A., and E. Rasul, 2005: Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit. In: M. Pessaraki ed. *Handbook of Photosynthesis*, 2nd edn. pp. 479–497. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Fu J, Huang B (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress, *Environ. Exp. Bot.* 45, 105–114.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *J. Plant Physiol.* 161, 1189–1202.
- Niyogi KK (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches, *Annu. Rev. Plant Phys.* 50, 333–359.
- Foyer CH, Mullineaux P (1994). *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. Boca Raton, CRC Press
- Tripathy JN, Zhang J, Robin S, Nguyen TT, Nguyen HT (2000). QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress, *Theor. Appl. Genet.* 100, 1197–1202.
- Manikavelu A, Nadarajan N, Ganesh SK, Gnanamalar RP, Babu RC (2006). Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration, *Plant Growth Regul.* 50, 121–138.
- Samarah, NH (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agron. Sustain. Dev.* 25, 145–149. doi: 10.1051/agro:2004064
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.*, 105: 1-14.
- Wardlaw IF, Willenbrink J (2000). Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytol.* 148, 413–422. 10.1046/j.1469-8137.2000.00777.x
- Fox GA (1990). Drought and the evolution of flowering time in desert annuals. *American Journal of Botany* 77: 1508–1518.
- Ludwig F, Rosenthal DM, Johnston JA, Kane N, Gross BL, Lexer C, Dudley S, Rieseberg LH, Donovan LA (2004). Selection on leaf ecophysiological traits in a desert hybrid *Helianthus* species and early generation hybrids. *Evolution* 58: 2682–2692.
- Sherrard ME, Maherali H (2006). The adaptive significance of drought escape in *Avena barbata*, an annual grass. *Evolution* 60, 2478–2489. 10.1554/06-150.1
- Wesseling J (1974). Crop growth and wet soils. In *Drainage for Agriculture*. Ed. J. van Schilfo gaarde. Am. Soc. Agron., Madison, Wisconsin. pp 7-37.
- Mielke MS, Schaffer B (2010). Photosynthetic and growth responses of *Eugenia uniflora* L. seedlings to soil flooding and light intensity. *Environ.*
- Onuegbu BA (1997). Screening for flooding tolerance of some ornamental plants. *Nig J Crop, Soil Forestry*, 1997; 3: 29-35.

Scott HD, DeAngulo J, Wood LS, Pitts DJ (1990). Influence of temporary flooding at three growth stages of soyabean on a clay. *J Plant Nutr*, 1990; 13(8): 1045-1071.

Peña-Castro JM, van-Zanten M, Lee SC, Patel MR, Fukao T, Voesenek LACJ and Bailey-Serres J (2011) Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence-tolerance mechanism. *The Plant Journal* 67:434-446.

Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 21, 3123–3134. doi: 10.1101/gad.1595107

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, Article number: 27686

Laubinger S, Zeller G, Henz SR, Sachsenberg T, Widmer CK, Naouar N, Vuylsteke M, Schölkopf B, Ratsch G, Weigel D (2008). At-TAX: a whole genome tiling array resource for developmental expression analysis and transcript identification in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 2008;9(7):R112. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-r112. Epub 2008 Jul 9.

Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97.

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

Novina CD, Sharp PA (2004). The RNAi revolution. *Nature.* 2004 Jul 8;430(6996):161-4.

10. Anexos y apéndices

10.1 Anexo 1: preparación de geles, amortiguadores o buffers, medios de cultivo, y otras soluciones

AGUA DEPC

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

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

SOLUCIÓN DE BROMURO DE ETIDIO PARA TINCIÓN

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

Agregar el bromuro de etidio al agua.

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

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

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

AMORTIGUADOR TBE 10X

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

TRIZMA base en 100 mL de agua DEPC, después agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente. Agregar EDTA y aforar a 1000 mL, dejar en agitación toda la noche y esterilizar al día siguiente 15 lb/pulg² por 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

GEL DE ACRILAMIDA AL 15 % DESNATURALIZANTE (100 mL)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	10 mL
Acrilamida 40% (19:1 bis)	37.5 mL
Urea	48 gr
Agua DEPC	Hasta 100 mL
APS 10%	120 μ L
TEMED	35 μ L

Pesar la urea y agregarla en un frasco de vidrio, continuar con la acrilamida y la solución de TBE 10X. Disolver en un horno de microondas, atemperar y aforar hasta 100 mL. Separar en alícuotas de 35 mL. Adicionar el APS y luego el TEMED (17919, Thermo Scientific) segundos antes de adicionar el gel en los cristales.

GEL DE ACRILAMIDA 10 % DESNATURALIZANTE (20 mL)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	2 mL
Acrilamida 40% (19:1 bis)	5 mL
Urea	9.6 gr
Agua DEPC	Hasta 20 mL
APS 10%	35 μ L
TEMED	3.5 μ L

Pesar la urea y agregarla en un frasco de vidrio, continuar con la acrilamida y la solución de TBE 10X. Disolver en un horno de microondas, atemperar y aforar hasta 100 mL. Separar en alícuotas de 5 mL. Adicionar el APS y luego el TEMED (17919, Thermo Scientific) segundos antes de adicionar el gel en los cristales.

GEL DE ACRILAMIDA NATIVO AL 6% (5 mL)

COMPONENTE	VOLUMEN
TBE 10X	500 μ L
Acrilamida 40% (19:1 bis)	750 μ L
Agua desionizada estéril	Hasta 5 mL
APS 10%	35 μ L
TEMED	3.5 μ L

Pesar la urea y agregarla en un frasco de vidrio, continuar con la acrilamida y la solución de TBE 10X. Disolver en un horno de microondas, atemperar y aforar hasta 100 mL. Adicionar el APS y luego el TEMED (17919, Thermo Scientific) segundos antes de adicionar el gel en los cristales.

ACETATO DE SODIO 3 M pH 5.2 (200 mL)

Pesar 49.22 g de NaOAc grado biología molecular (mw 82.03), Disolver en 100 mL de agua destilada estéril. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y aforar a un volumen de 200 mL con agua destilada estéril. Mezclar bien, esterilizar 15 lb/pulg² por 15 minutos y almacenar a 4 °C.

MOPS 10X

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

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

AMORTIGUADOR DE CARGA PARA RNA 5X

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

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

SOLUCION I

Componente	VOLUMEN
Tris HCl	125 μ L
EDTA	100 μ L
Agua desionizada	4775 μ L

Adicionar el EDTA al agua desionizada y disolver. Proceder a agregar el Tris Ácido Clorhídrico. Almacenar a 4 °C.

SOLUCION II

Componente	VOLUMEN
NaOH 10 Normal	100 μ L
SDS 5%	1000 μ L
Agua desionizada	3900 μ L

Se adiciona el NaOH al agua y al final el SDS.

SOLUCION III

Componente	VOLUMEN
Acetato de Potasio 5 M	3000 μ L
Acido Glacial Acético	575 μ L
Agua desionizada	1425 μ L

Disolver el acetato de potasio en el agua, posteriormente agregar al ácido acético glacial. Almacenar a 4 °C.

MEDIO LB SOLIDO CON AMPICILINA (600 mL)

COMPONENTES	CANTIDAD
Triptona	6 gr
Extracto de levadura	3 gr
NaCl	6 gr
Agar	9 gr

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

Permitir enfriar hasta soportar con la mano y agregar en campana de flujo laminar 600 μ L de ampicilina 100 μ g/ μ L, mezclar y vaciar en cajas Petri.

MEDIO LB LÍQUIDO CON AMPICILINA (200 mL)

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

Mezclar los componentes en 150 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 M, afora a 200 mL, esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 minutos, permitir enfriar hasta soportar con la mano y agregar en campana de flujo laminar 200 μ L de ampicilina 100 μ g/ μ L.

X-GAL

Disolver 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido en 2 mL de N,N-dimetilformamida.

Cubrir con aluminio y almacenar a -20 °C

EDTA 0.5 M (100 mL)

Pesar 14.612 gr de EDTA y disolver en 80 mL de agua tratada con DEPC ajustar el pH a 8.0 con NaOH 1 M, aforar a 100 mL con agua con DEPC finalmente esterilizar 15 lb/pulg² por 15 minutos.

NaCl 0.4 M

COMPONENTES	VOLUMEN
NaCl	0.46752 gr
Agua DEPC	20 mL

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

10.2 Anexo 2: oligonucleótidos y adaptadores.

LINKER1 (IDT)

5'-rAppCTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/-3'

Adaptador ILLUMINA5 (RA5)

5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC 3'

Oligonucleótido RT

5'-ATTGATGGTGCCTACAG-3'

Primer Illumina 5' PCR

5'-ATGATACGGCGACCACCGACAGGTTCTACAGTCCGA-3'

Oligonucleótido BRIDGE

5'-CCTTGGCACCCGAGAATTCCAGATTGATGGTGCCTACAG-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, Index 1

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, Index 2

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, Index 3

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, Index 4

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

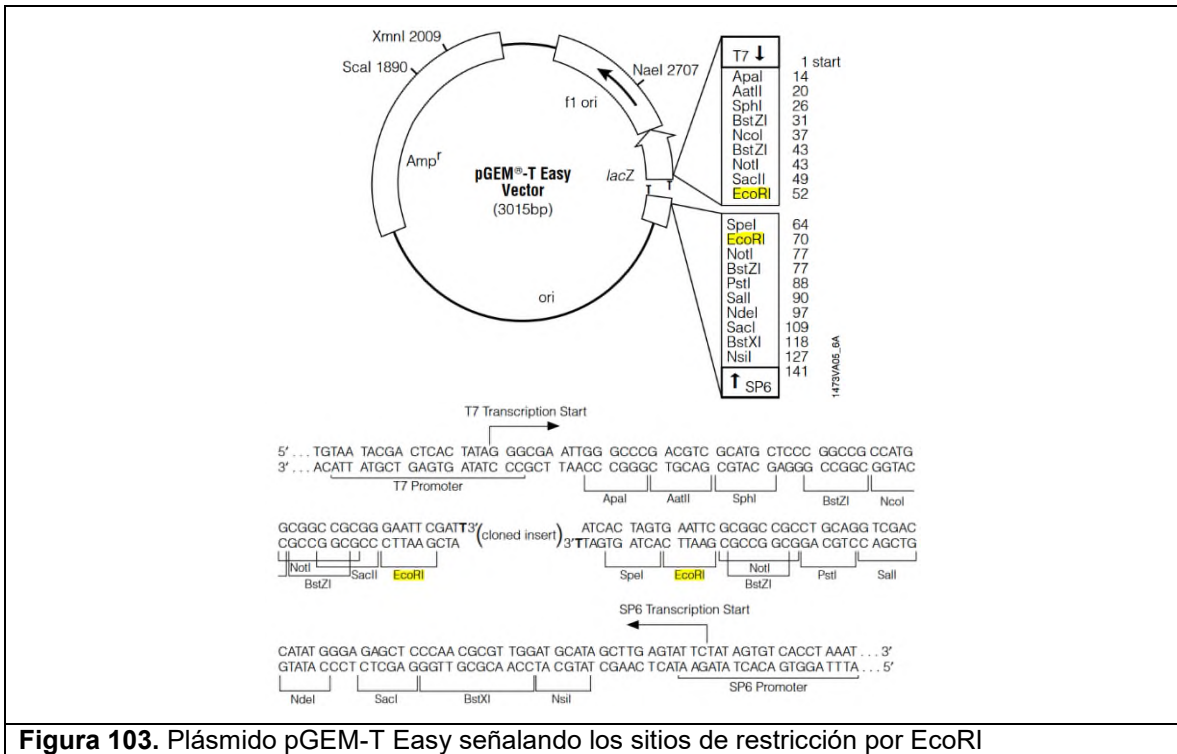
Oligonucleótido reverso Illumina, Index 5

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

Oligonucleótido reverso Illumina, Index 7

5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAA
TTC-3'

10.3 Anexo 3: plásmido pGEM-T Easy.



10.7 Apéndice A: porcentaje de lecturas mapeadas en el genoma nuclear de maíz.

Tabla 36. Porcentaje de lecturas mapeadas en el genoma nuclear de maíz para maíz control, Parviglumis control y Parviglumis control –previo (1).

Región	MC %	PC %	PC(1) %
Cromosoma 1	14.7	13.4	12.3
Cromosoma 2	11.5	11.7	11.0
Cromosoma 3	10.7	10.3	10.6
Cromosoma 4	10.5	10.9	9.8
Cromosoma 5	10.1	10.5	9.9
Cromosoma 6	9.3	10.9	12.4
Cromosoma 7	8.1	8.1	7.4
Cromosoma 8	9.2	8.4	10.8
Cromosoma 9	7.8	7.8	7.1
Cromosoma 10	7.2	6.9	6.9
No mapeadas	0.8	1.2	1.7

10.4 Apéndice B: Distribución de tamaños y lecturas anotadas en maíz y plantas de la miRBase.

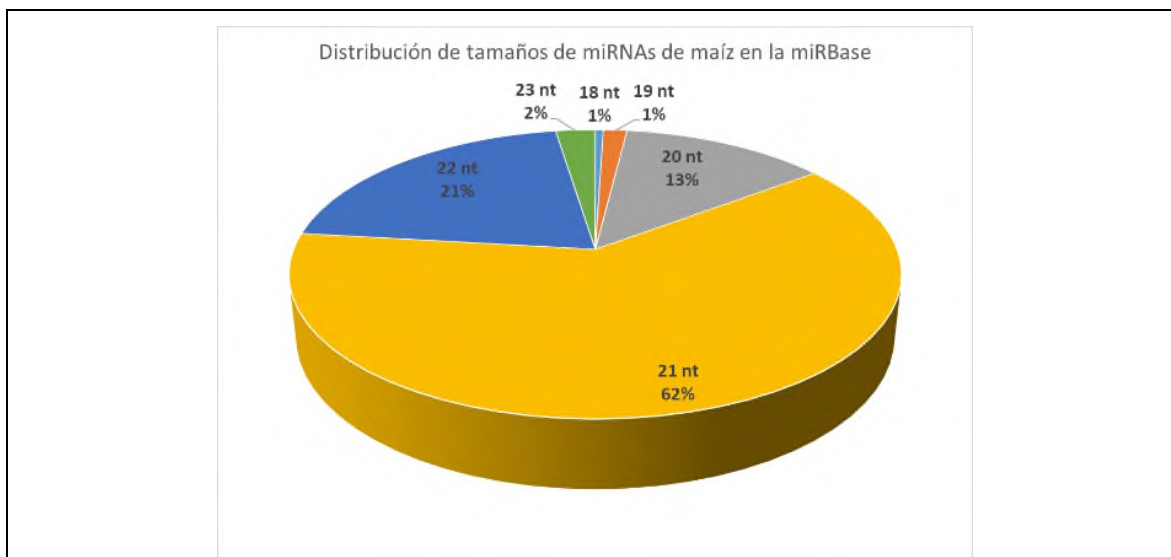


Figura 104. Distribución de tamaños de secuencias de maíz en la base de datos de la miRBase.

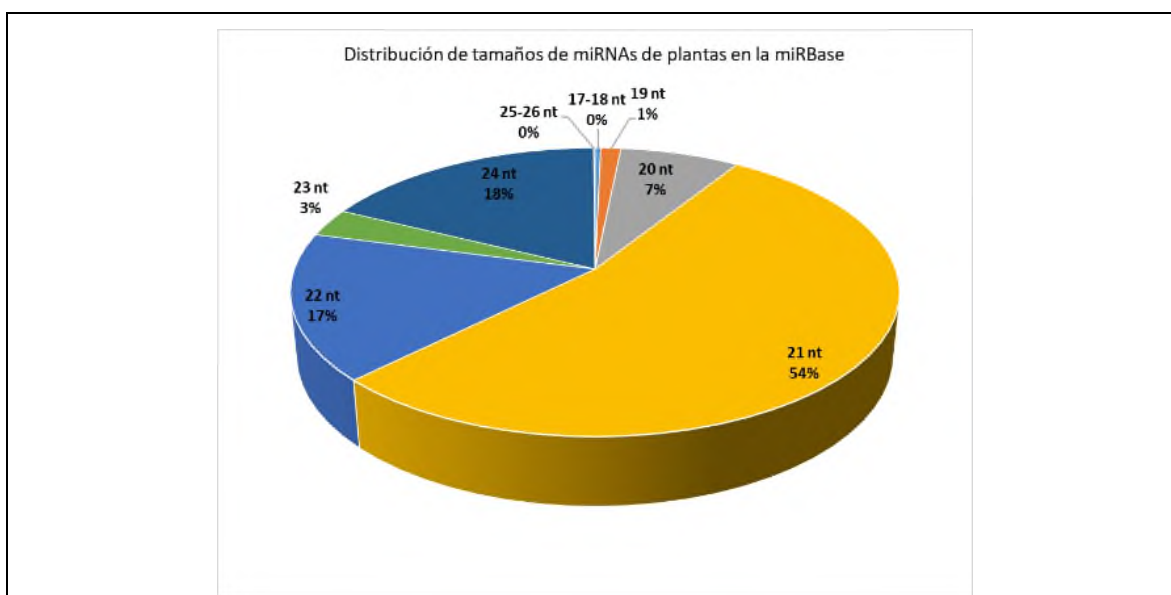


Figura 105. Distribución de tamaños de secuencias de plantas en la base de datos de la miRBase.

10.5 Apéndice C: gráficos de depuración de las bibliotecas.

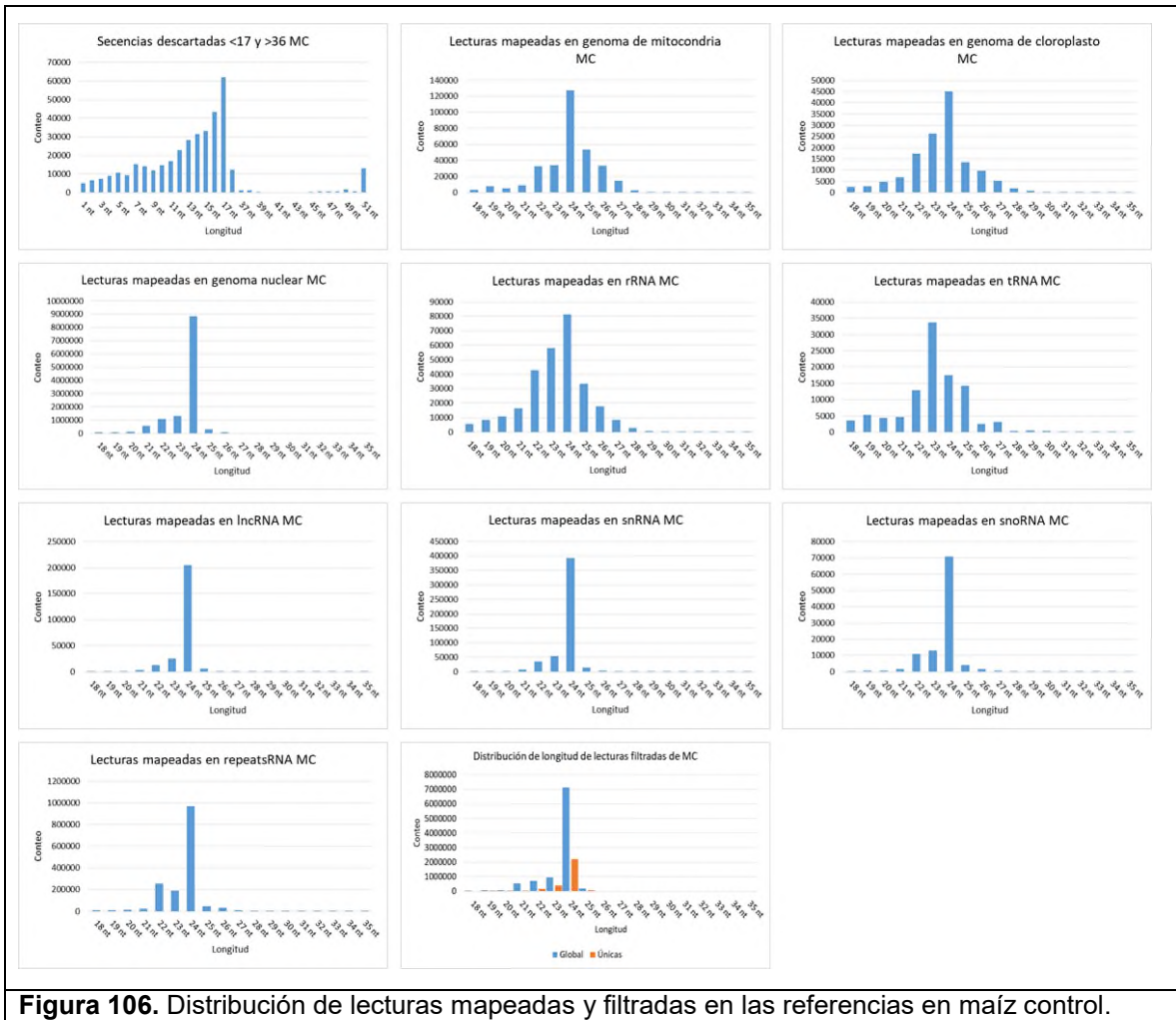


Figura 106. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz control.

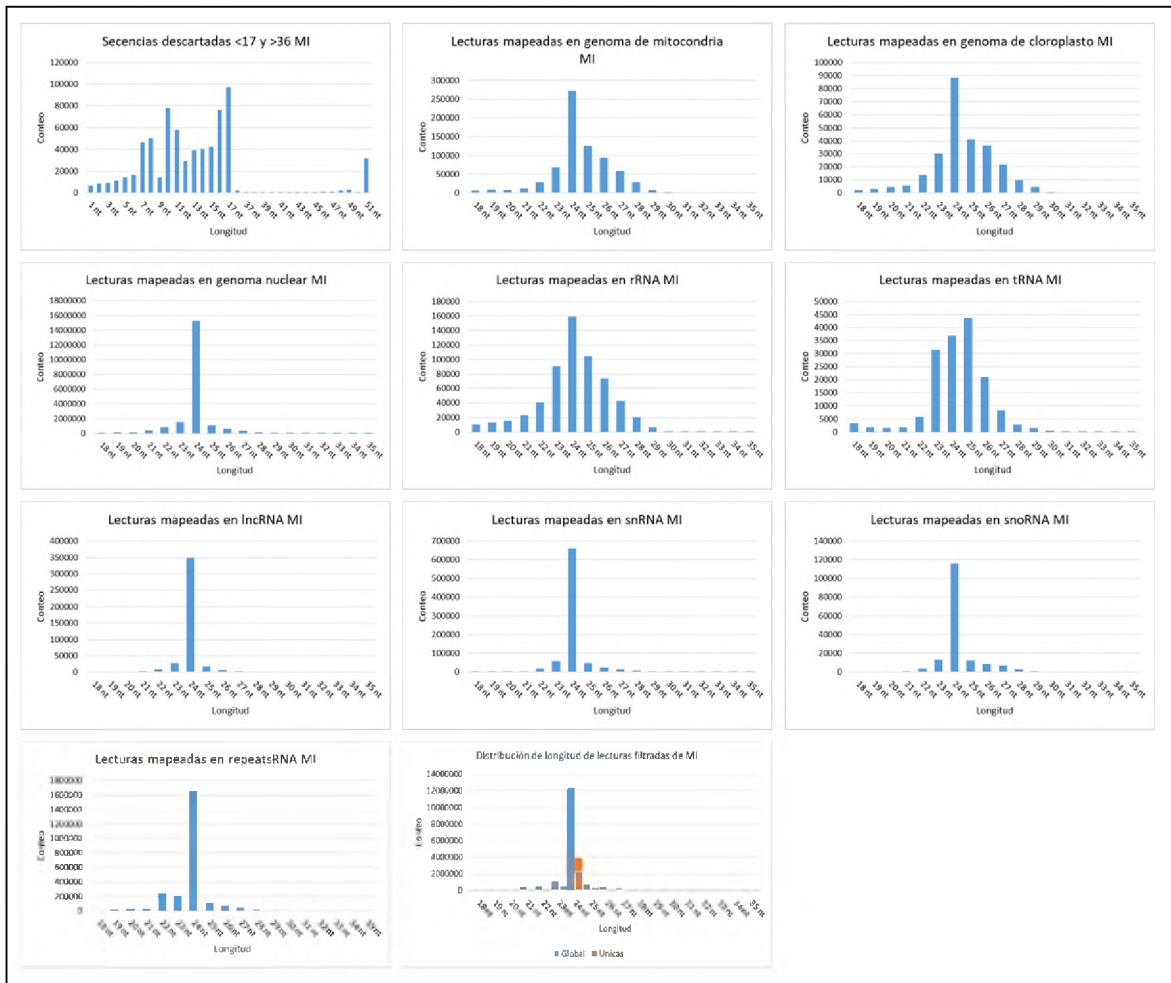


Figura 107. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz inundación.

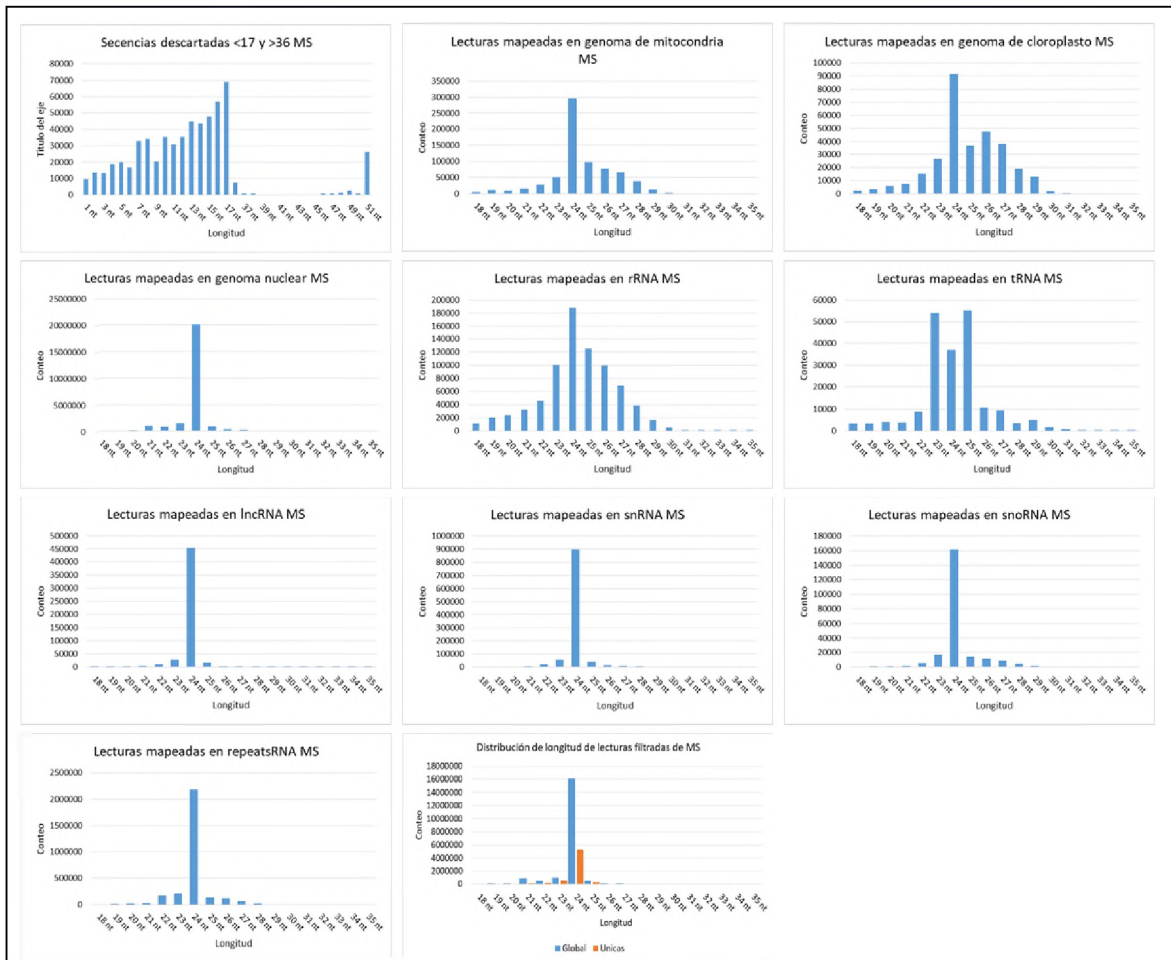


Figura 108. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en maíz sequía.

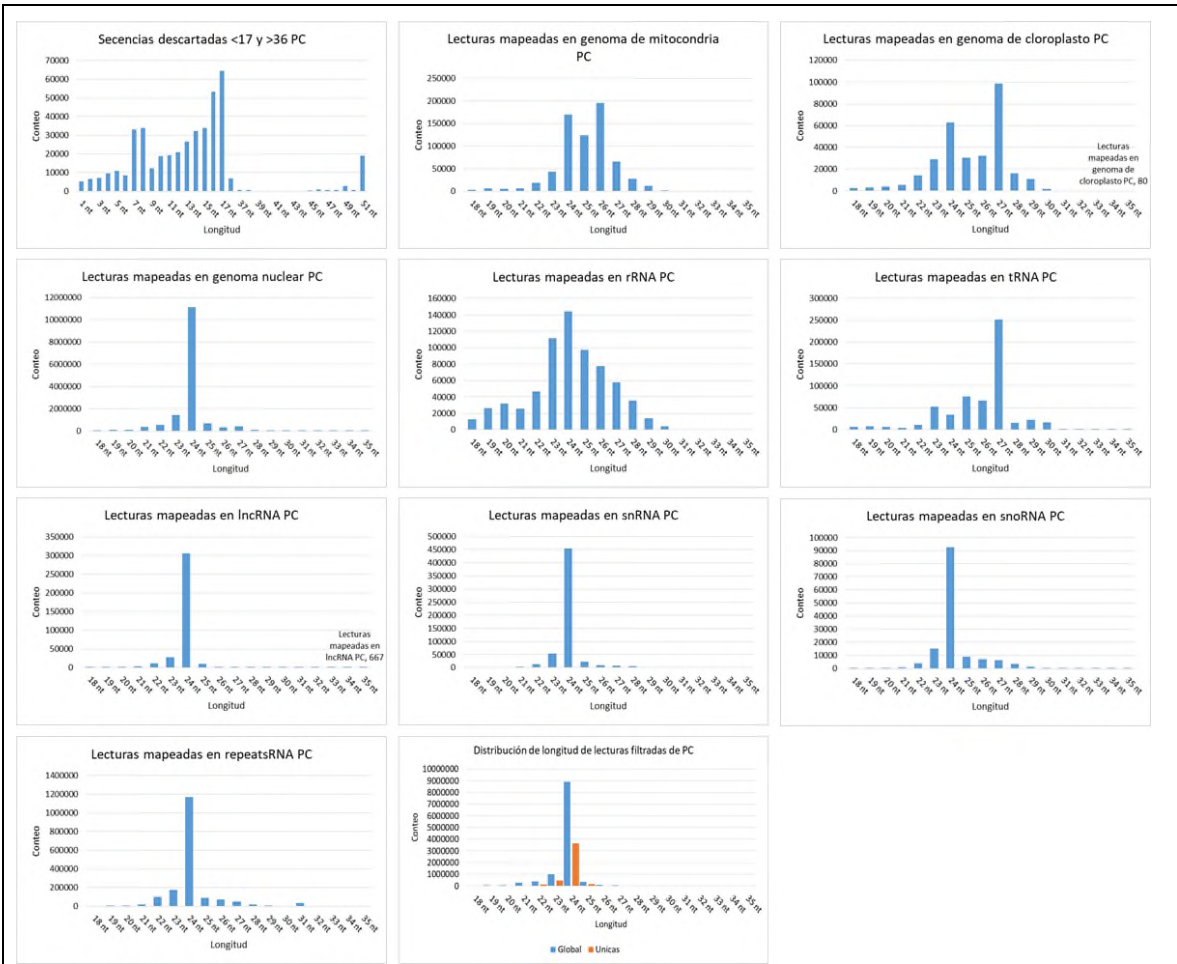


Figura 109. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis control.

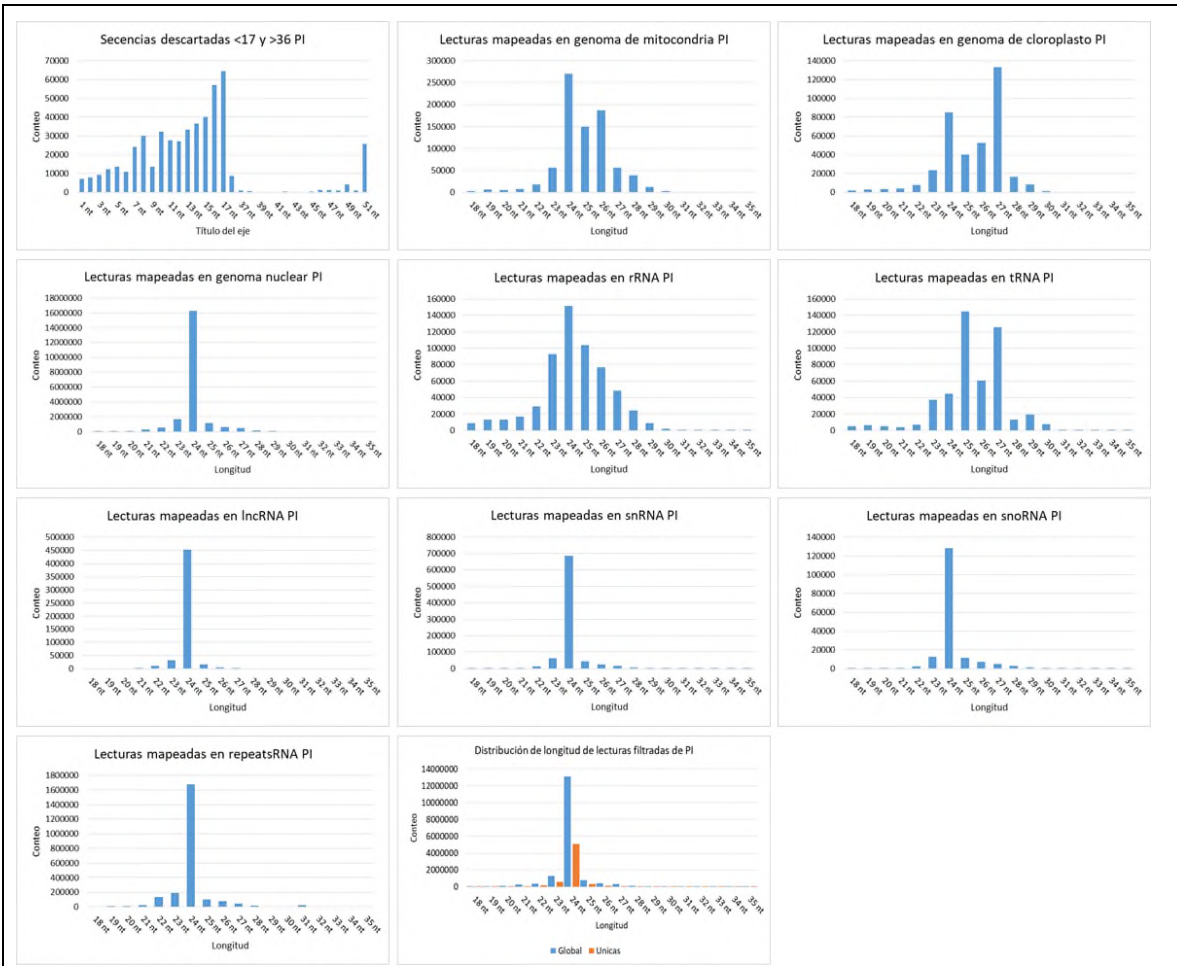


Figura 110. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglimis inundación.

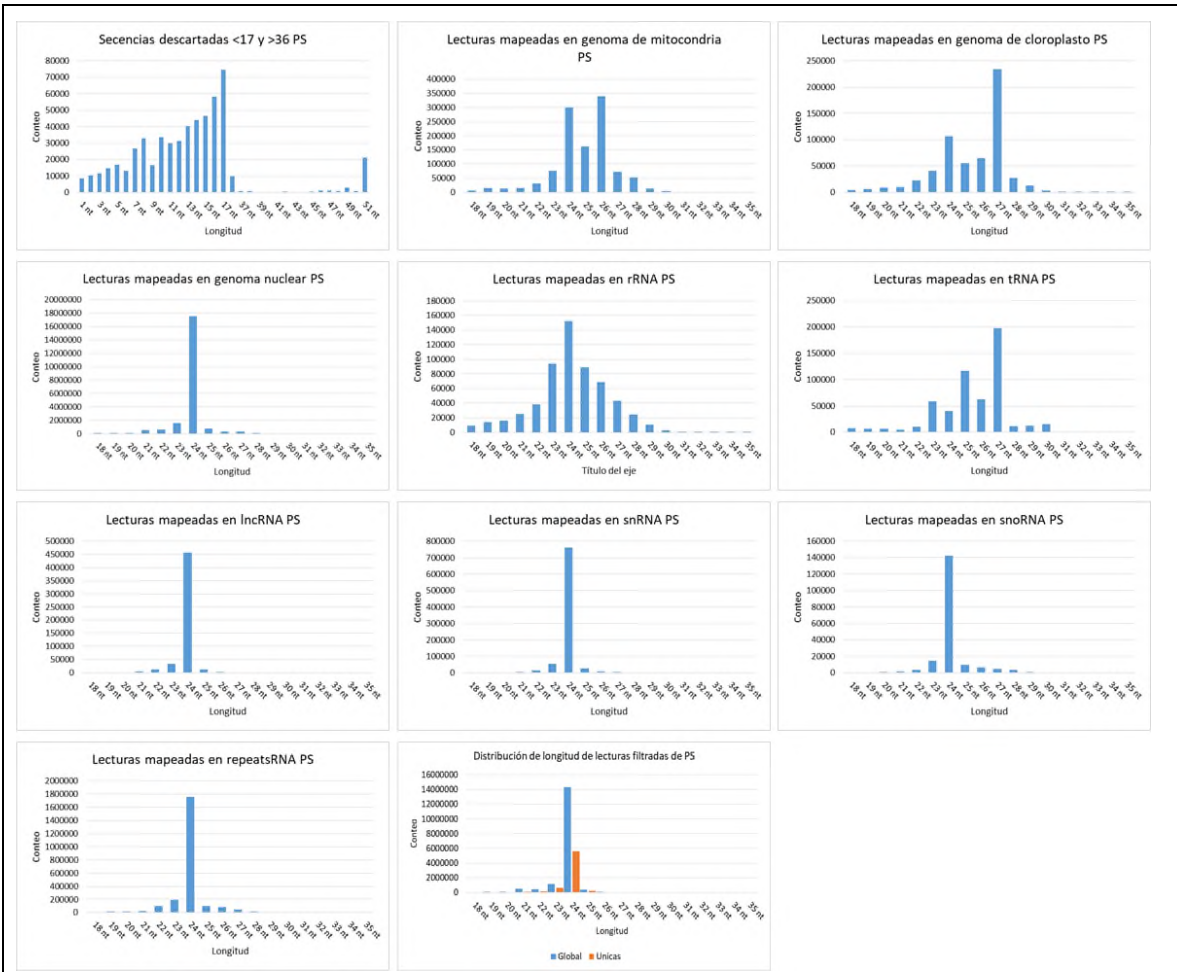


Figura 111. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en *Parviglumis sequia*.

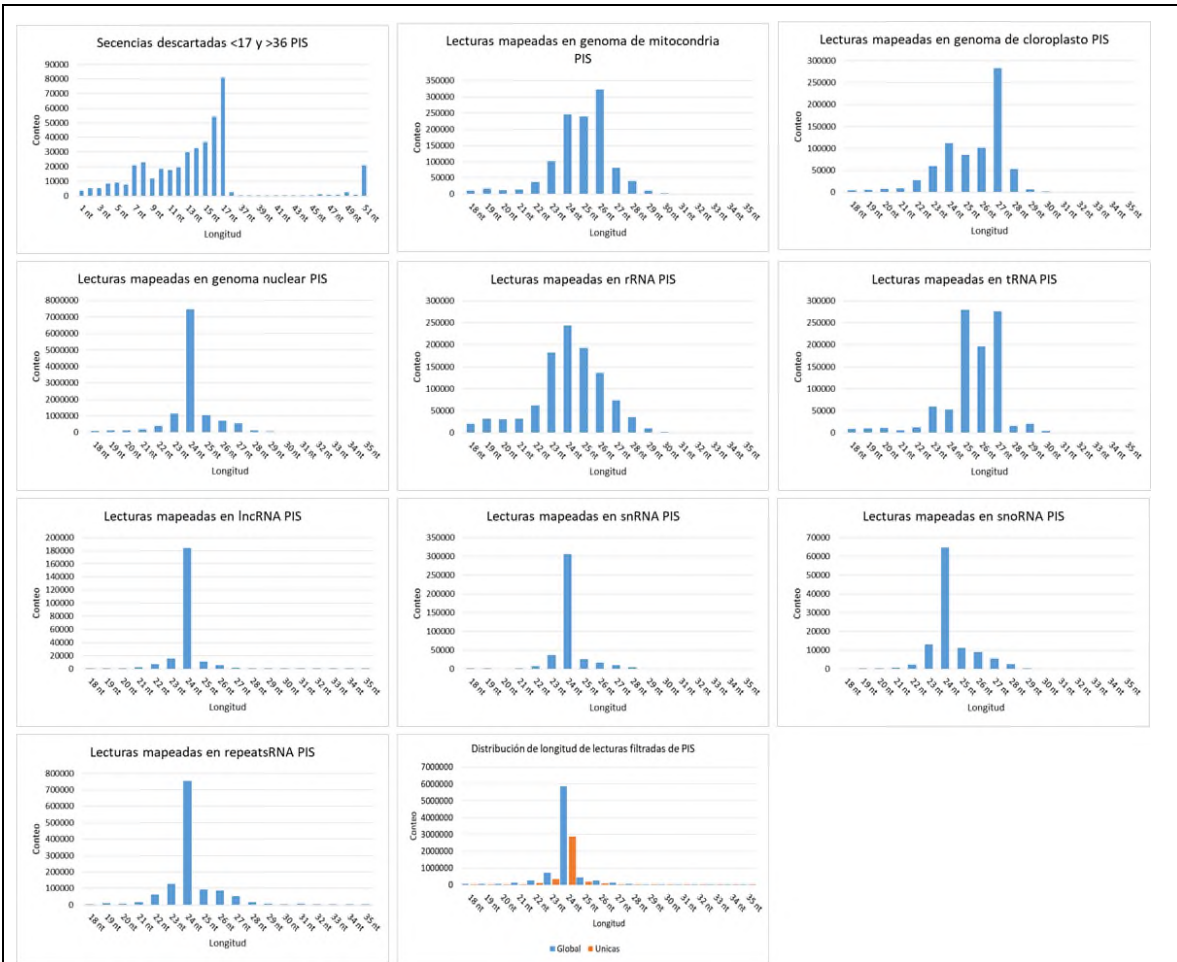


Figura 112. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis inundación-sequía.

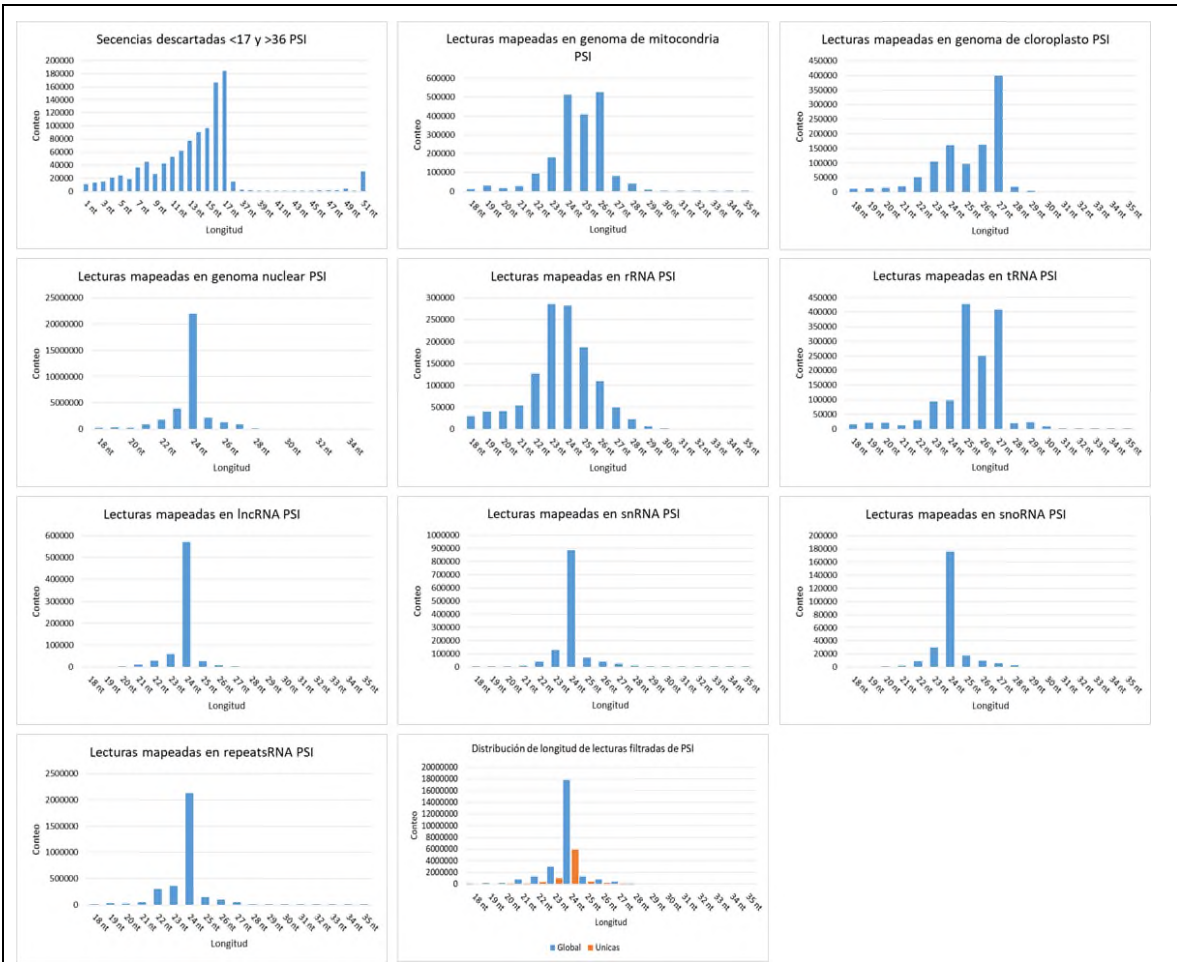


Figura 113. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis sequía-inundación.

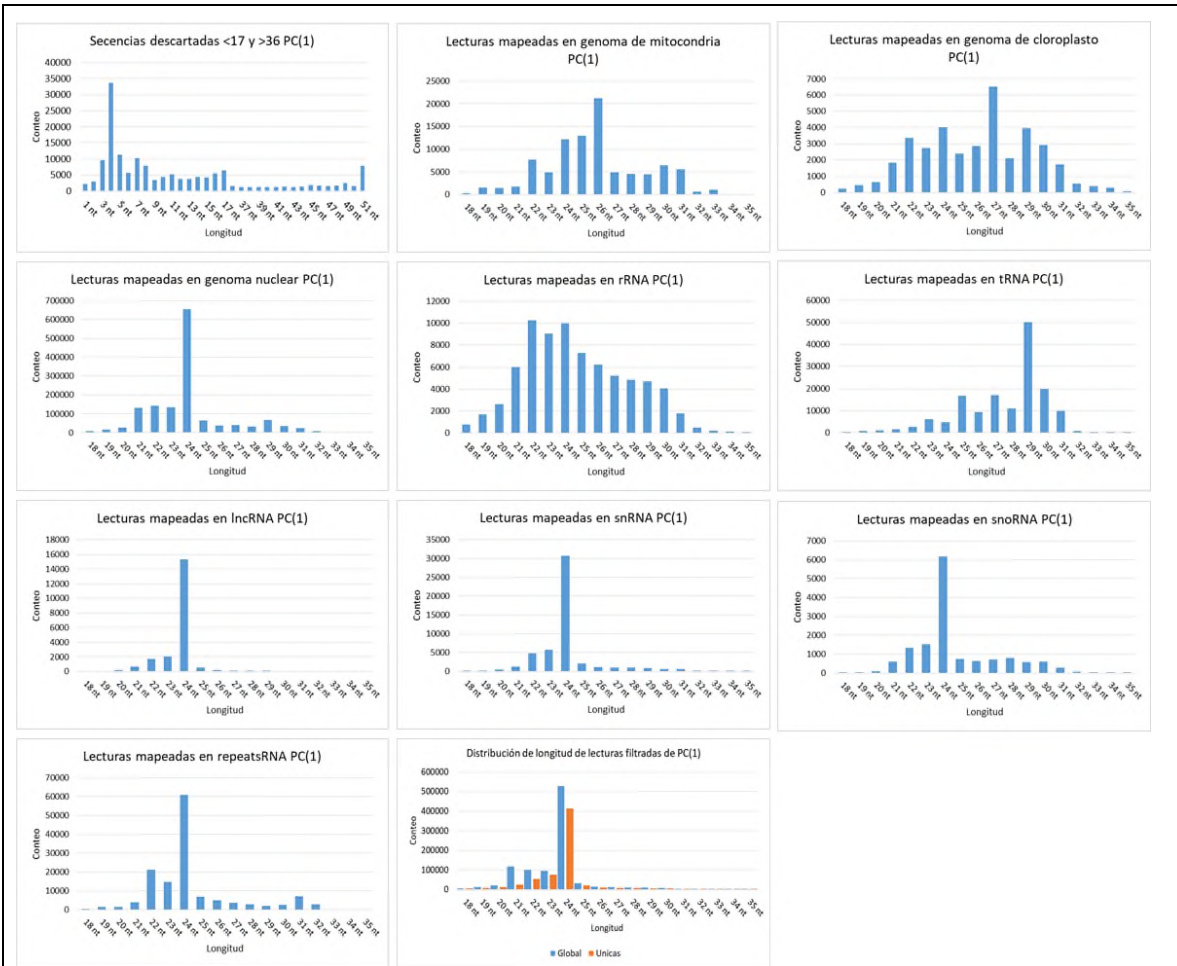


Figura 114. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis control-previo.

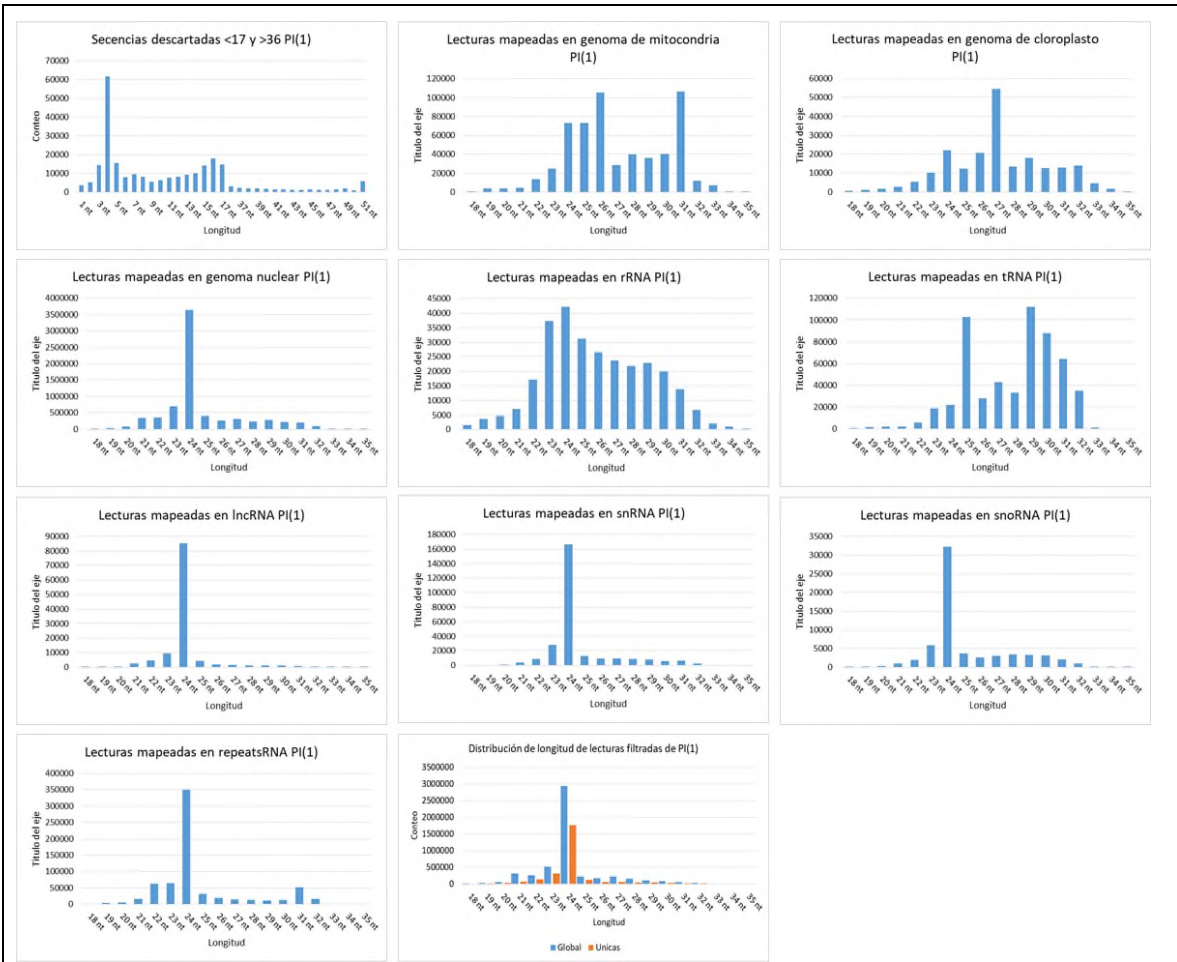


Figura 115. Distribución de lecturas mapeadas y filtradas en las referencias en Parviglumis inundación-previo.

10.6 Apéndice D: expresión relativa en Heatmaps.

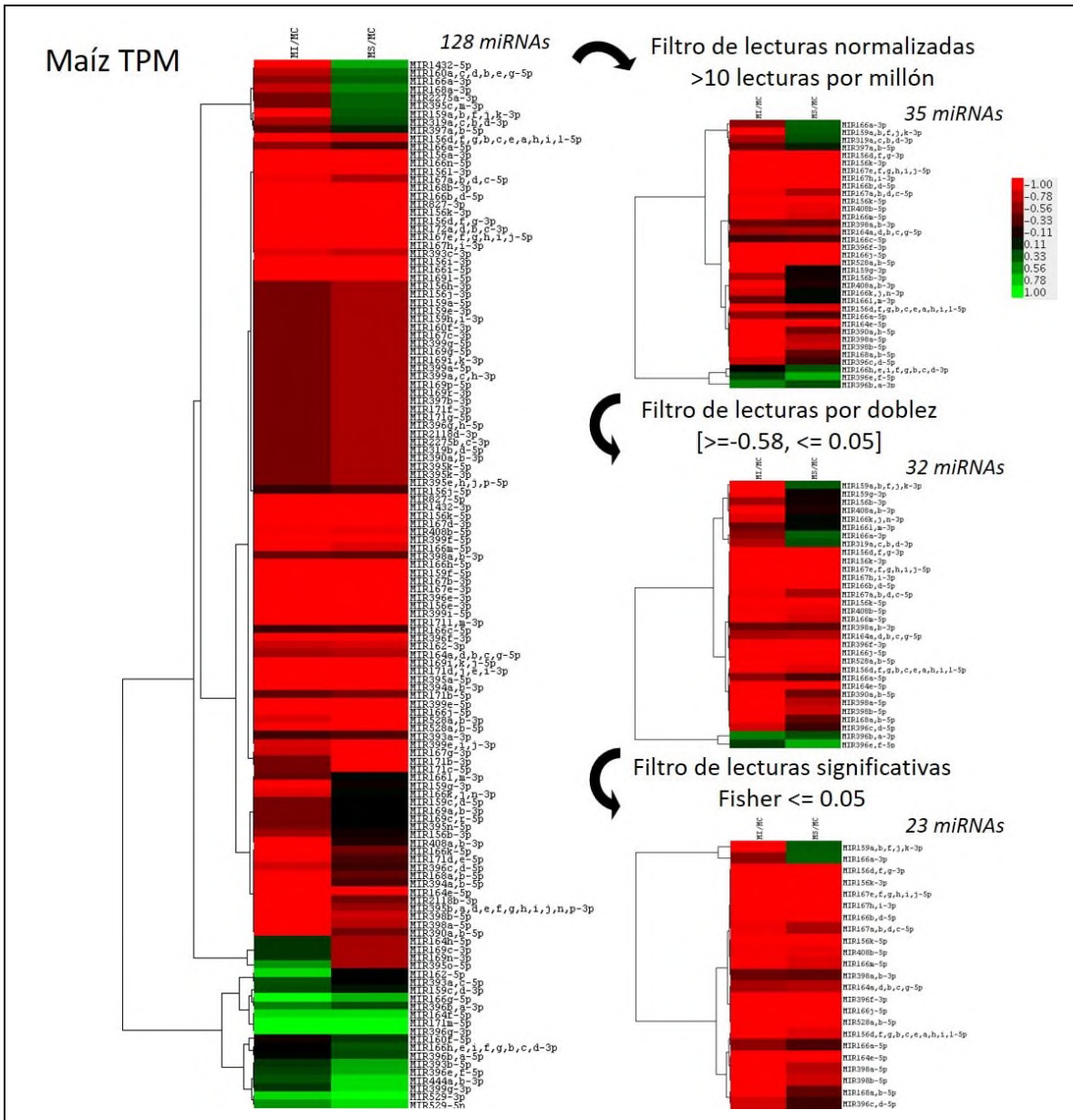


Figura 116. Heatmap de los valores de expresión de maíz en inundación (MI/MC) y sequía (MS/MC), y efecto de la aplicación de filtros a datos normalizados por TPM. Inicialmente había 128 miRNAs. El primer filtro dejó 35 miRNAs, el filtro por doblez dejó 32 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 23 elementos.

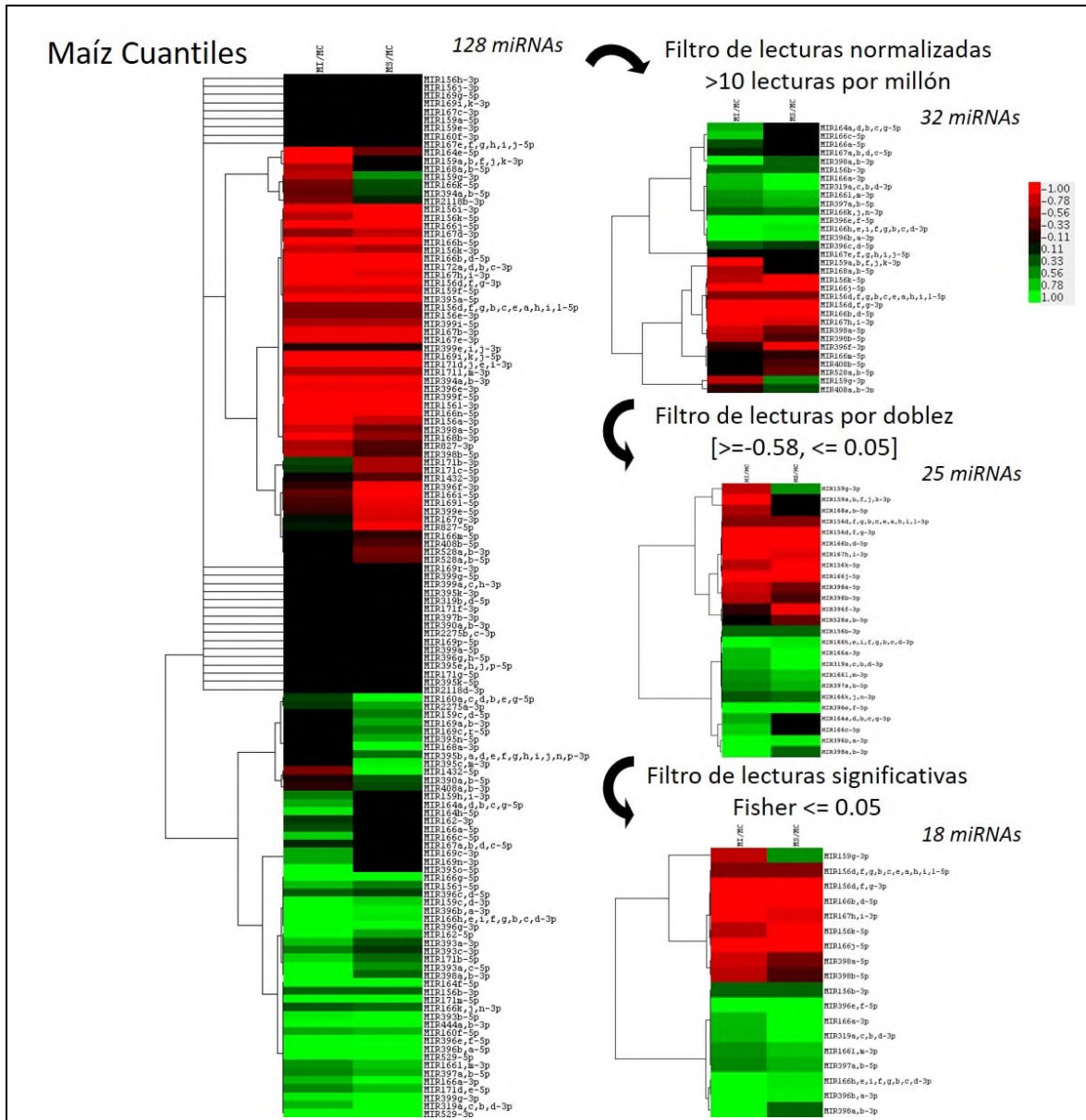


Figura 117. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en maíz normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 32 miRNAs, el filtro por doblez dejó 25 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 18 elementos.

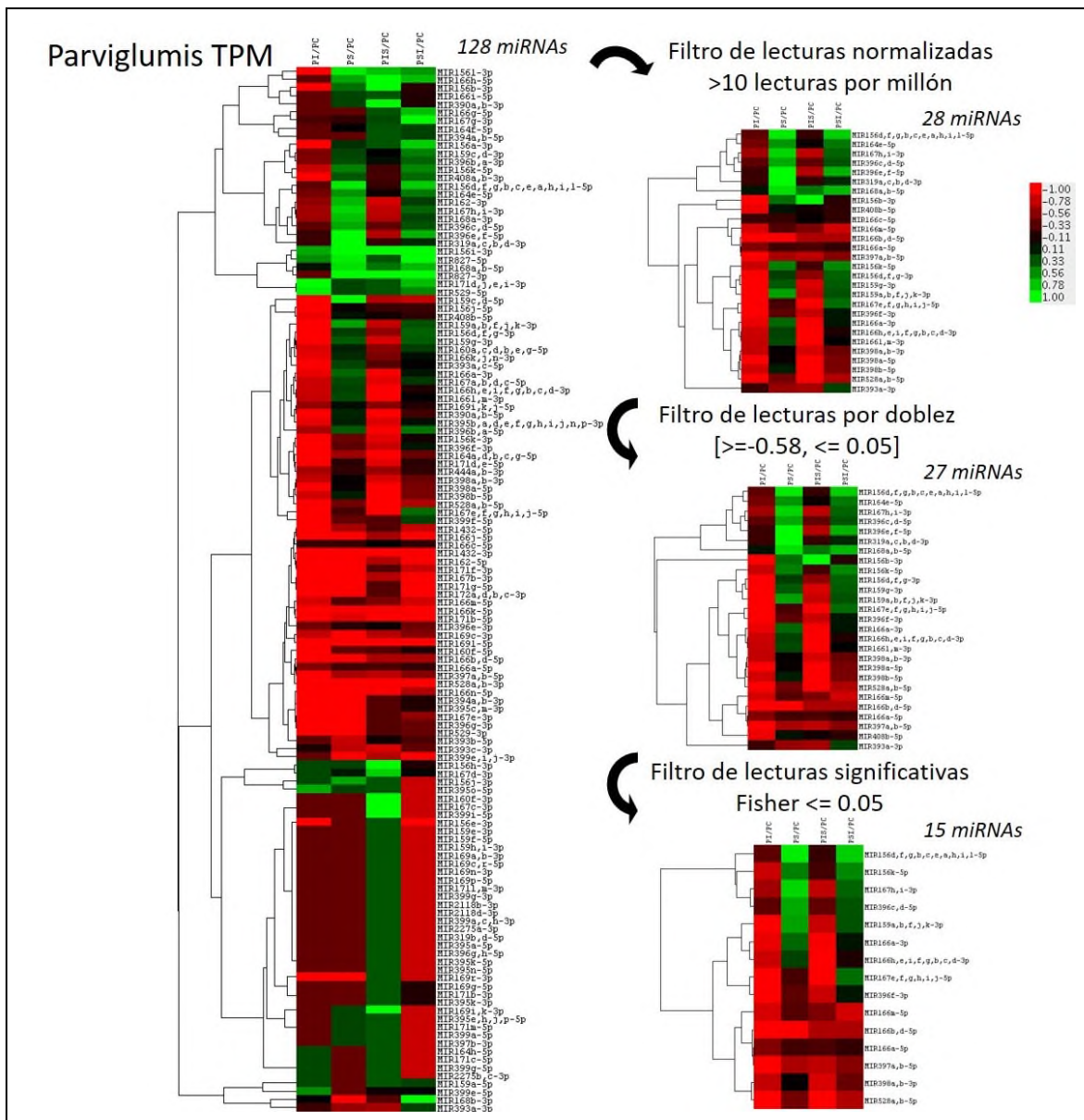


Figura 118. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis normalizados por TPM. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 28 miRNAs, el filtro por doblez dejó 27 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 15 elementos.

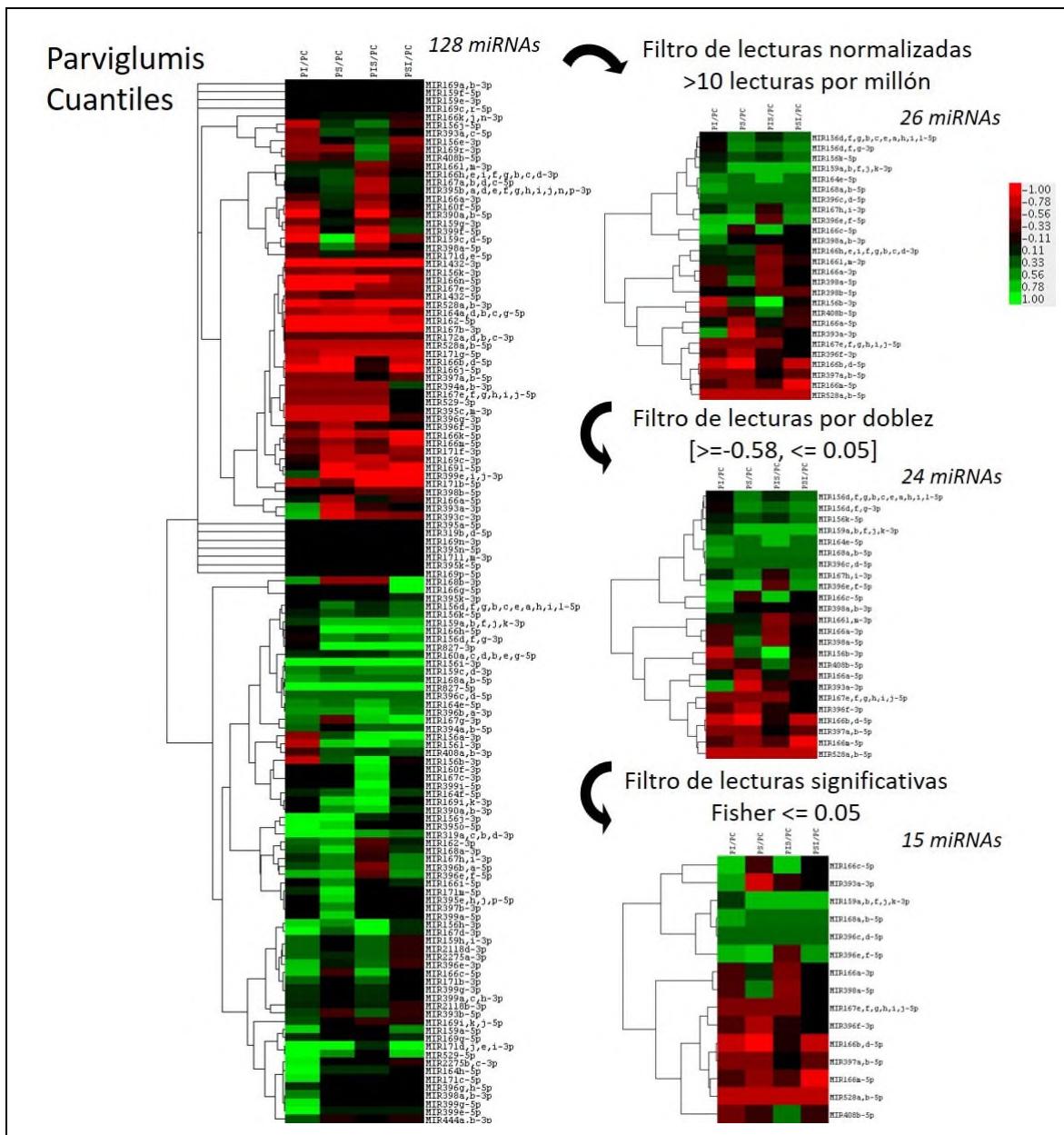


Figura 119. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 26 miRNAs, el filtro por doblez dejó 24 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 15 elementos.

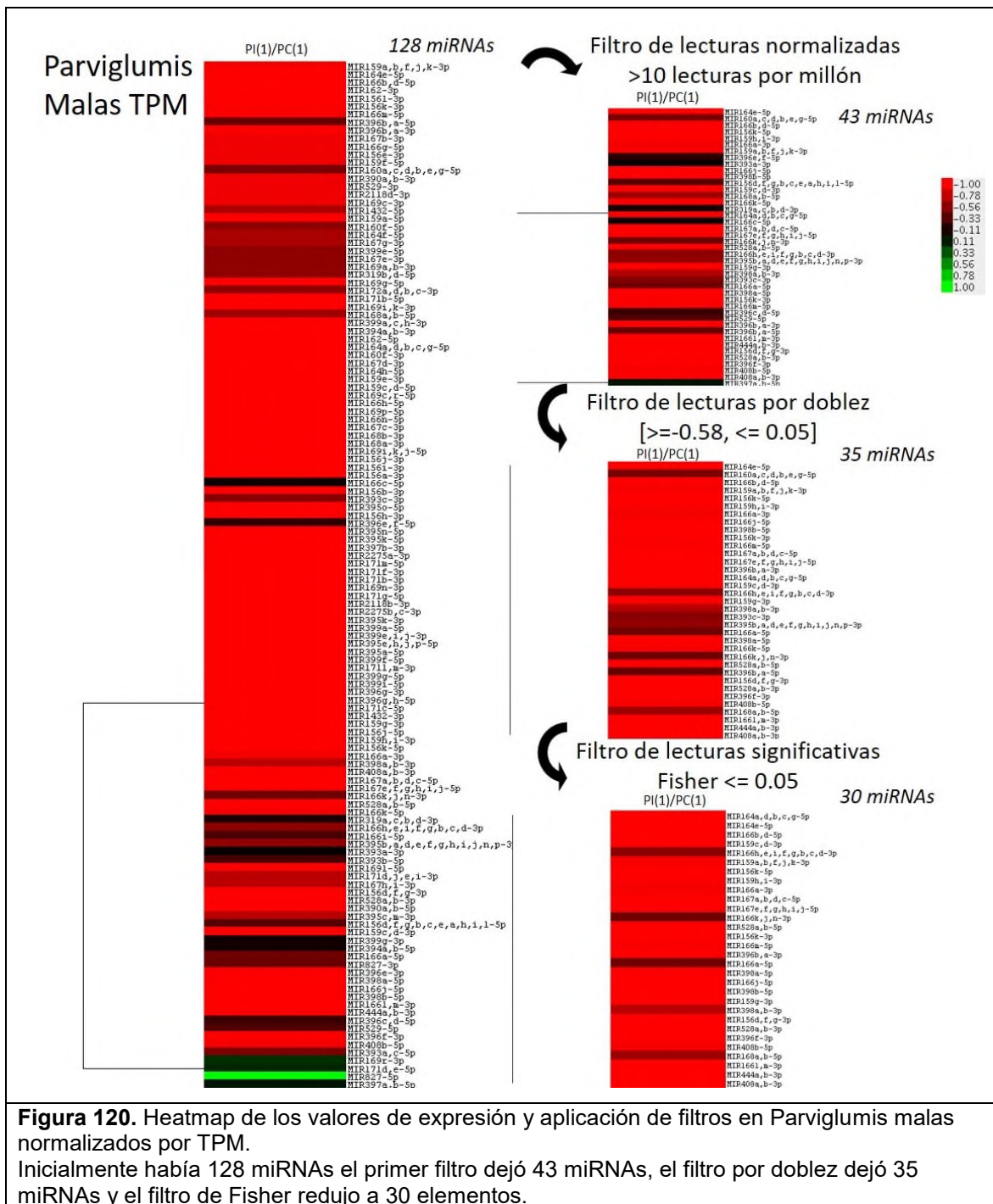


Figura 120. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis malas normalizados por TPM. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 43 miRNAs, el filtro por doblez dejó 35 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 30 elementos.

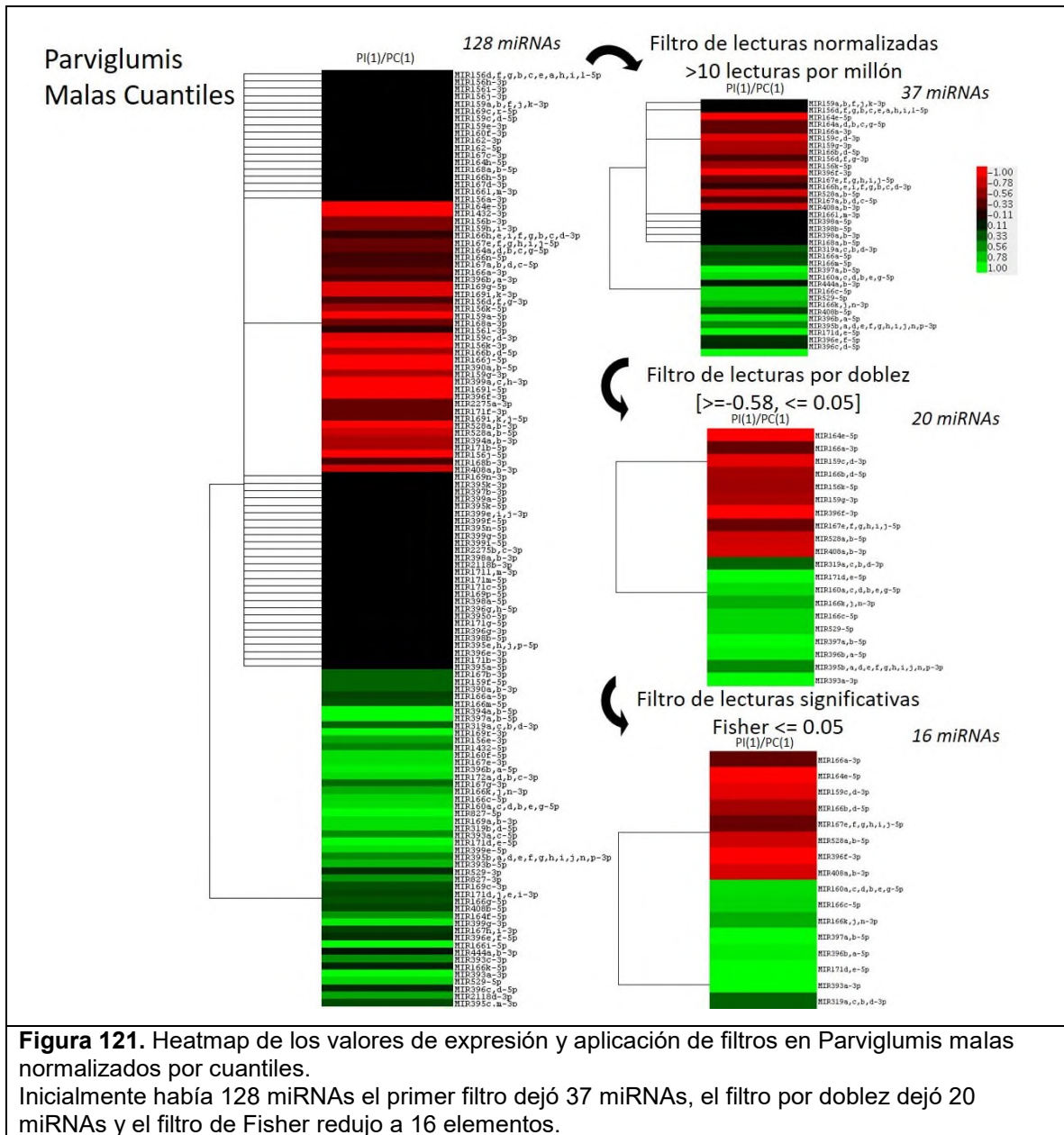


Figura 121. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis malas normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 37 miRNAs, el filtro por doblez dejó 20 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 16 elementos.

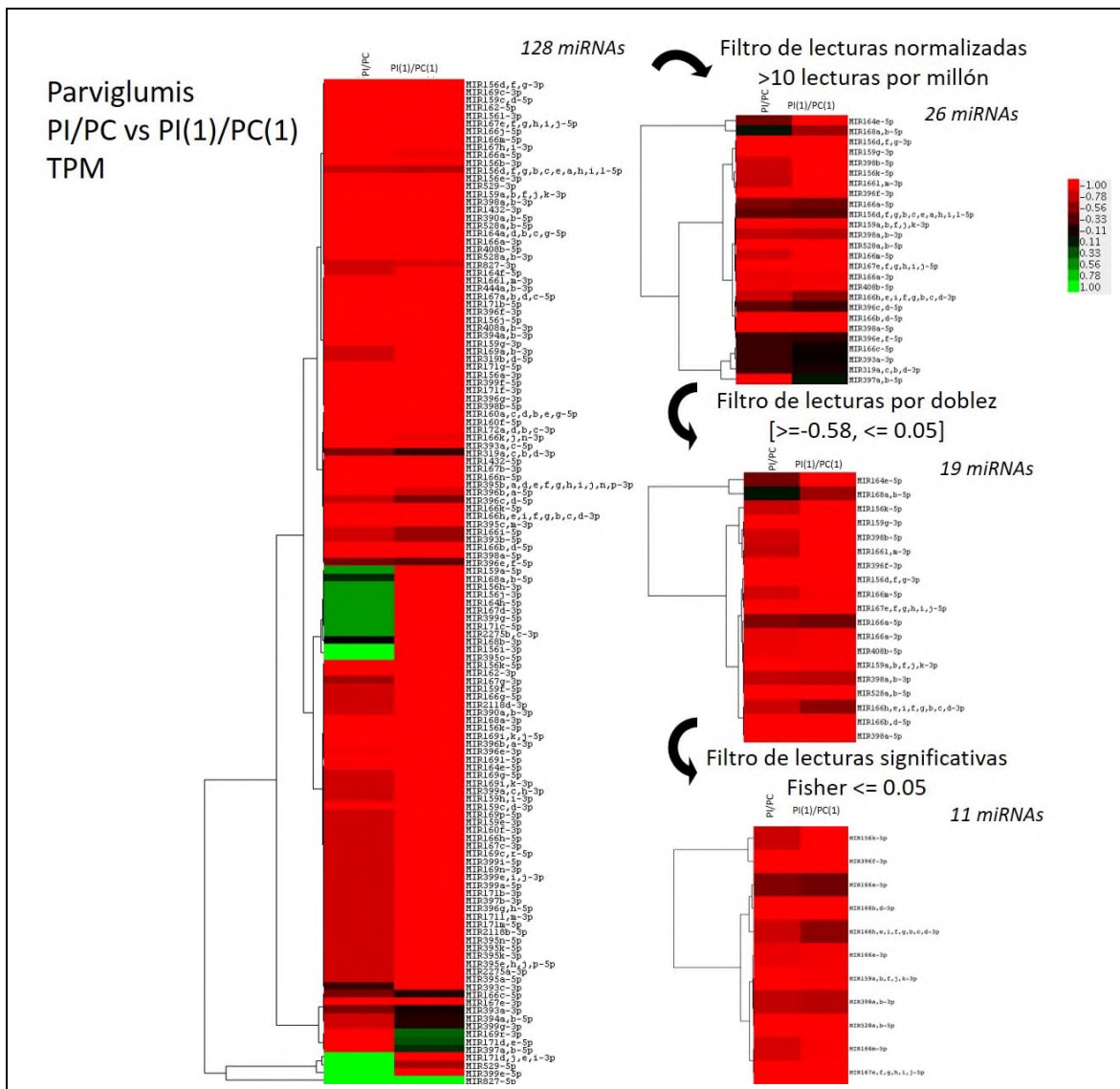


Figura 122. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis PC/PI y PC(1)/PI(1) normalizados por TPM.

Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 26 miRNAs, el filtro por doblez dejó 19 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 11 elementos.

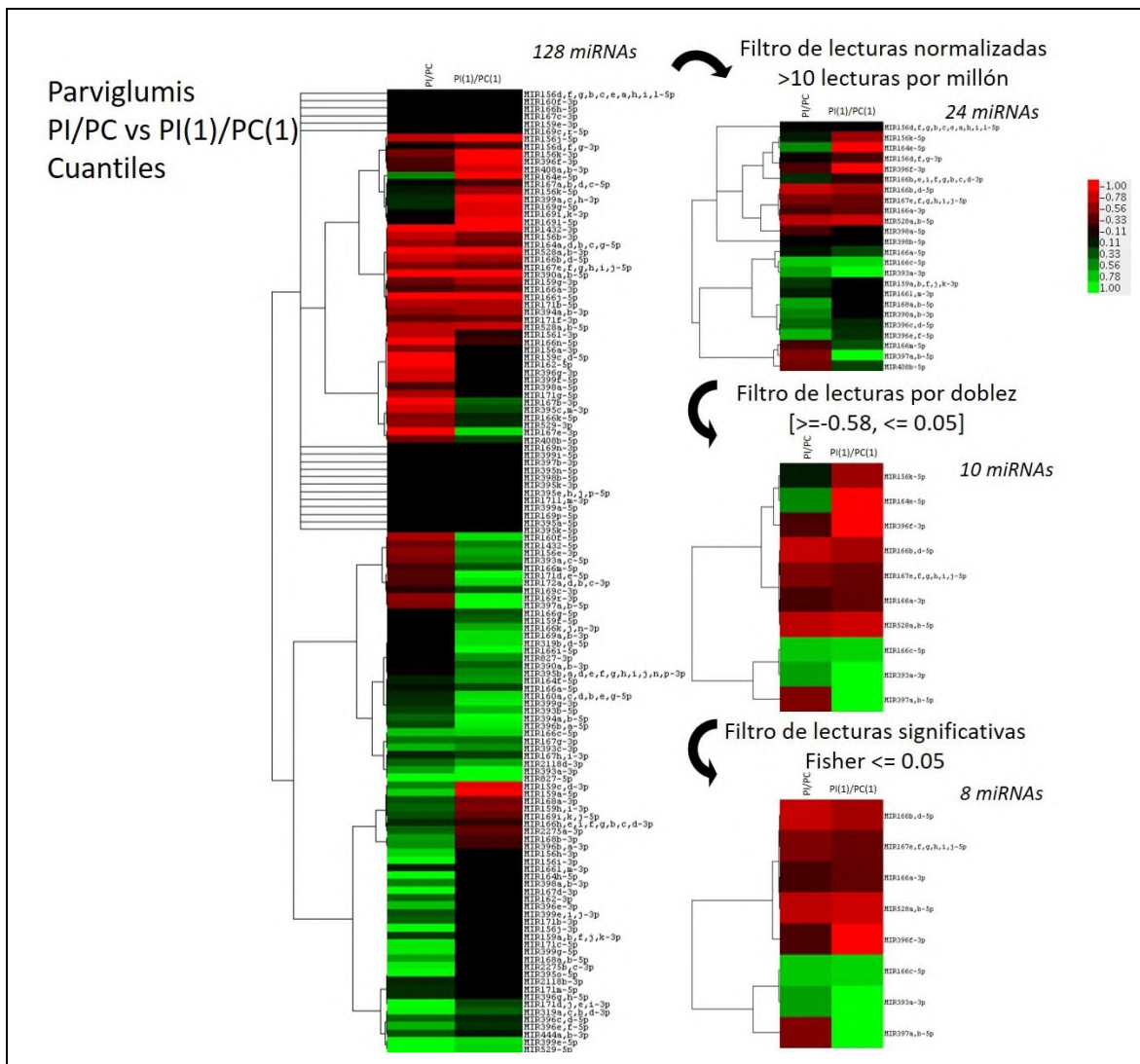


Figura 123. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parvoglumis PC/PI y PC(1)/PI(1) normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 24 miRNAs, el filtro por doblez dejó 10 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 8 elementos.

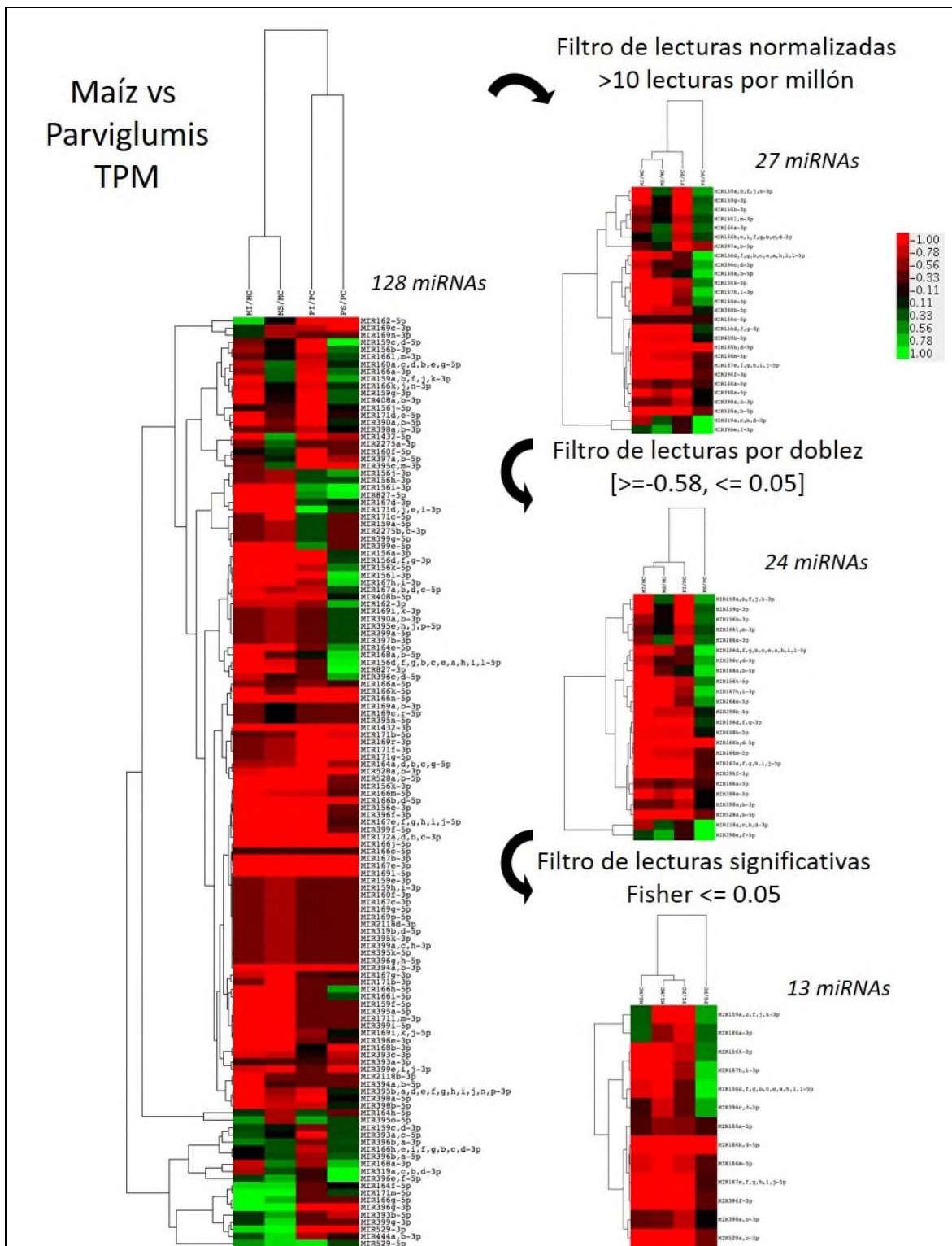


Figura 124. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parvigliumis y maíz normalizados por TPM. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 27 miRNAs, el filtro por doblez dejó 24 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 13 elementos.

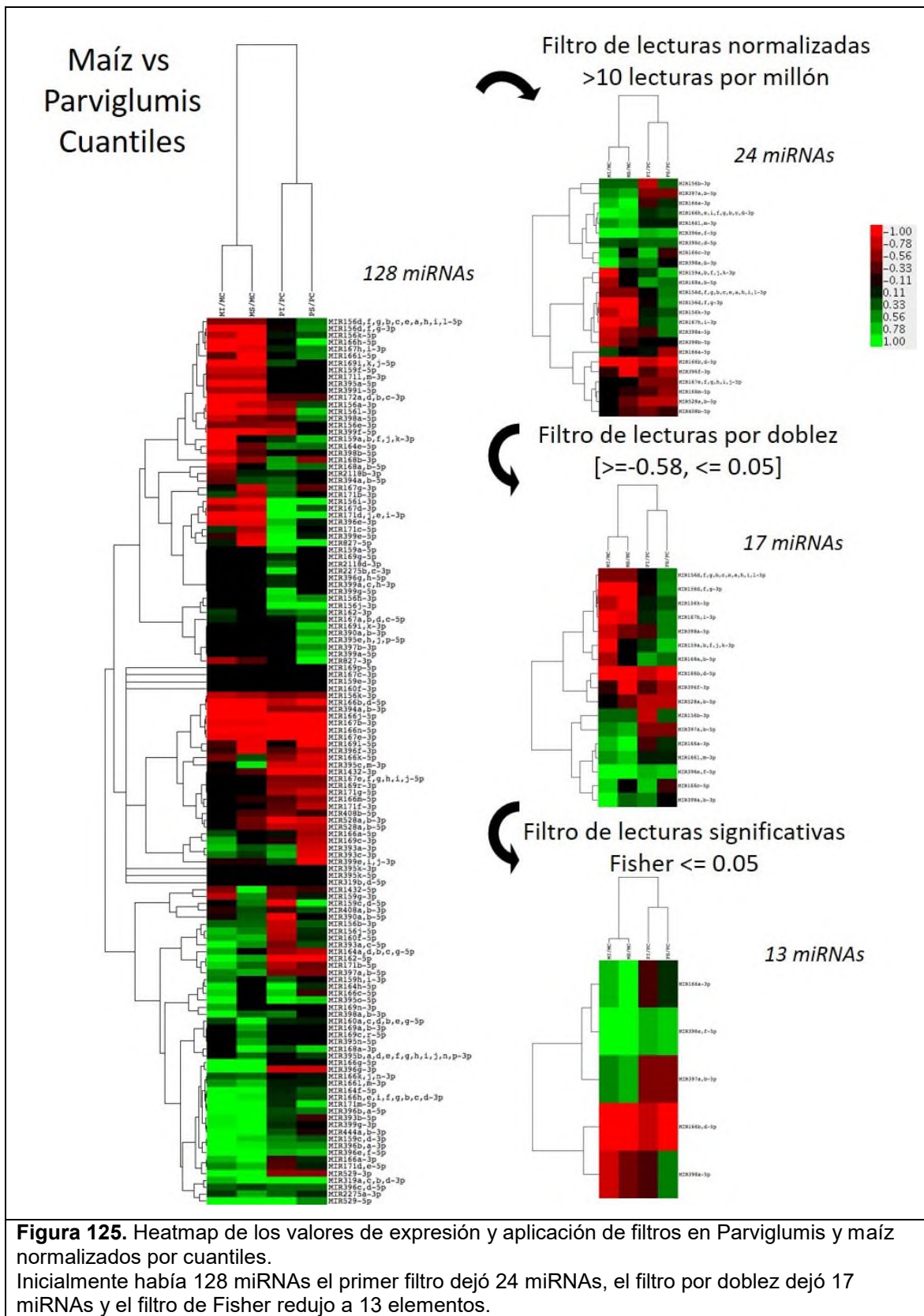


Figura 125. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis y maíz normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 24 miRNAs, el filtro por doblez dejó 17 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 13 elementos.

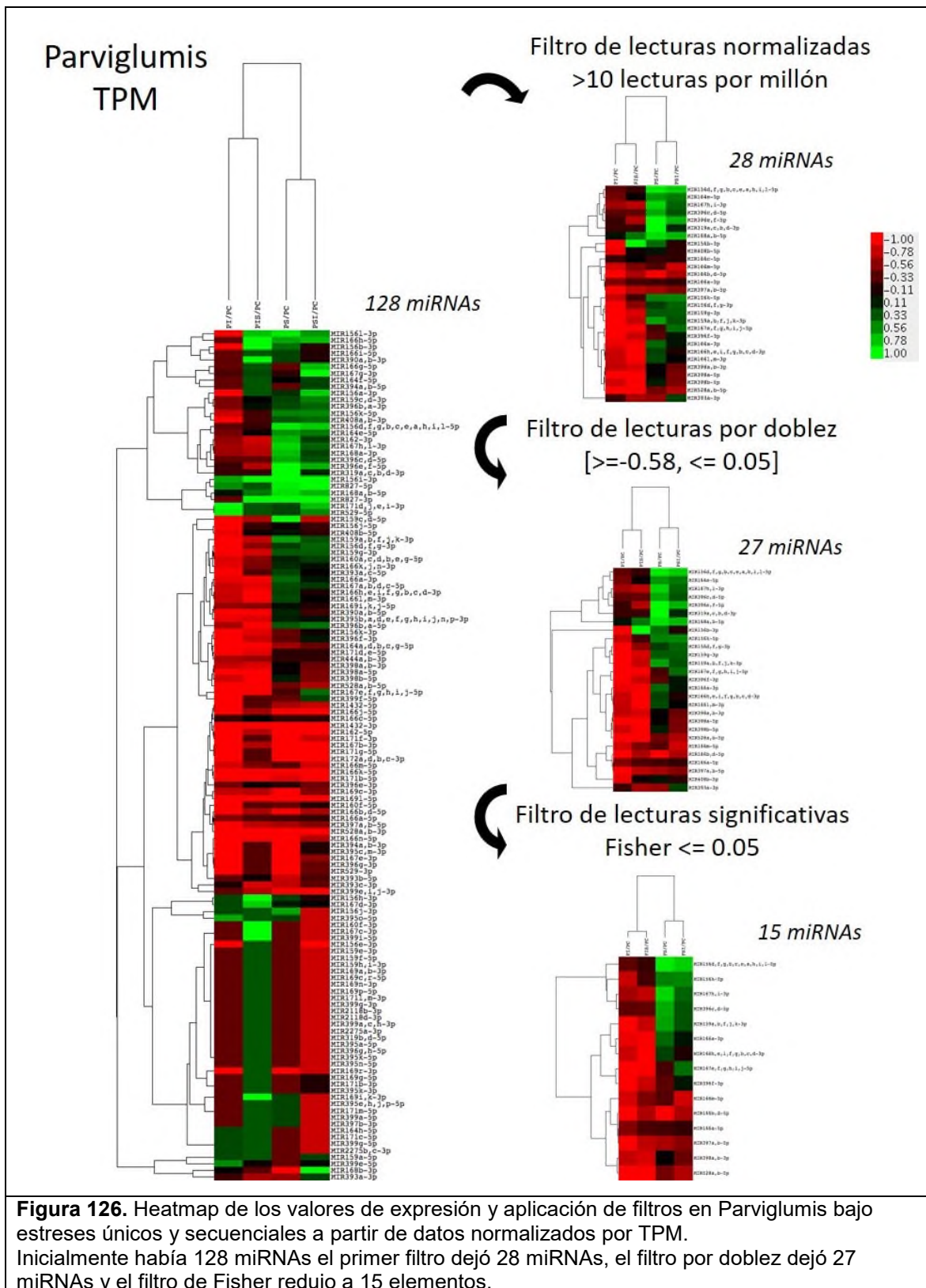


Figura 126. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en *Parvigitumis* bajo estreses únicos y secuenciales a partir de datos normalizados por TPM. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 28 miRNAs, el filtro por doblez dejó 27 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 15 elementos.

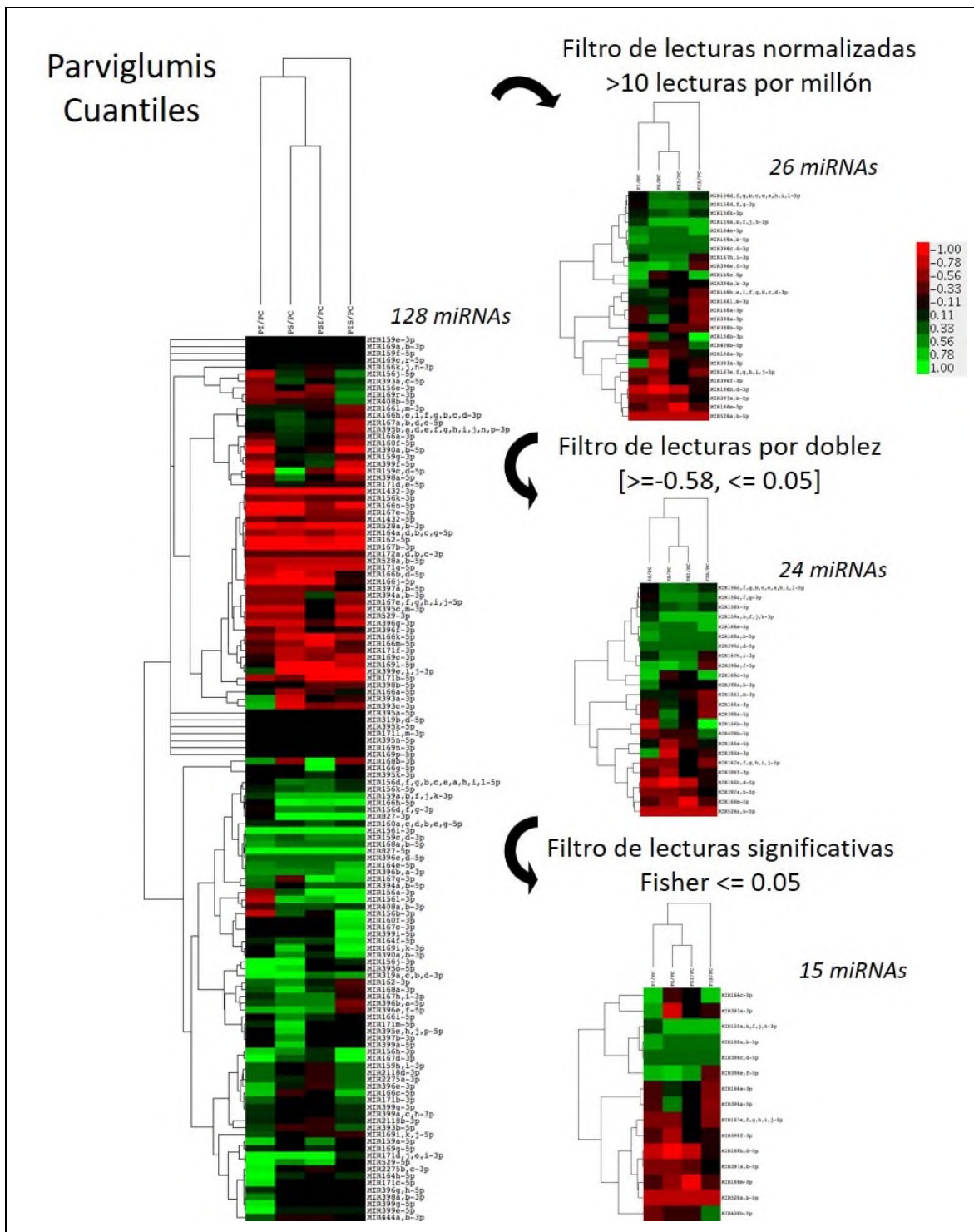


Figura 127. Heatmap de los valores de expresión y aplicación de filtros en Parviglumis bajo estreses únicos y secuenciales a partir de datos normalizados por cuantiles. Inicialmente había 128 miRNAs el primer filtro dejó 26 miRNAs, el filtro por doblez dejó 24 miRNAs y el filtro de Fisher redujo a 15 elementos.

10.7 Apéndice E: Análisis de restricción con EcoRI de las bibliotecas de Parviglumis control, sequía, sequía-inundación y maíz control e inundación.

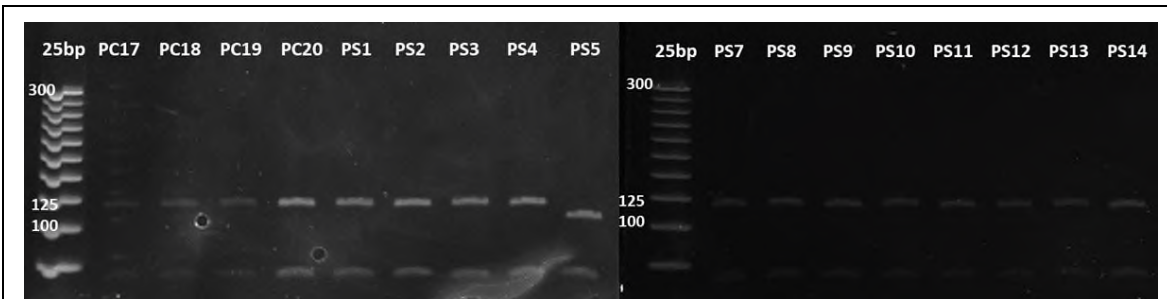


Figura 128. Productos de digestión de las bibliotecas de Parviglumis control (PC) y Parviglumis Sequía (PS) usando EcoRI. Las construcciones con inserto de 20 nt son las que presentan dos productos de digetion de 125 y 75 nt. Las vacías presentan una banda menor a 125 nt y la otra mayor a 75 nt.

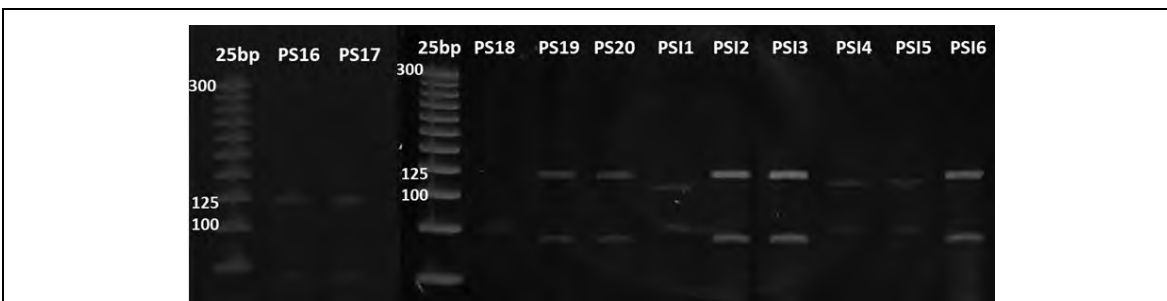


Figura 129. Productos de digestión de las bibliotecas Parviglumis Sequía (PS) y Parviglumis Sequía-Inundación (PSI) usando EcoRI. Las construcciones con inserto de 20 nt son las que presentan dos productos de digetion de 125 y 75 nt. Las vacías presentan una banda menor a 125 nt y la otra mayor a 75 nt.

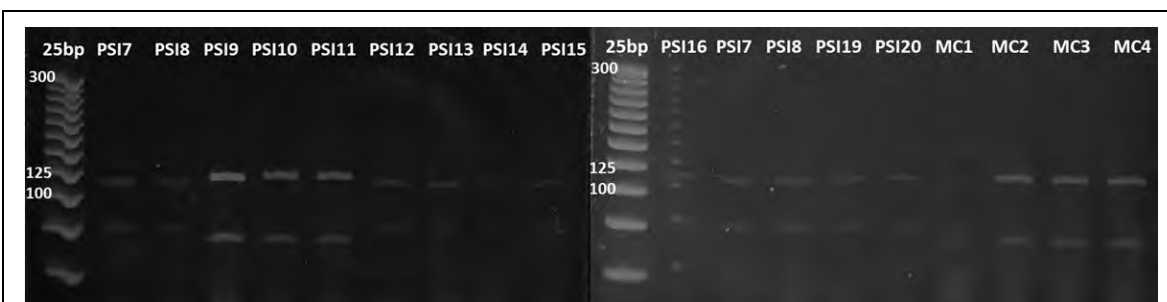


Figura 130. Productos de digestión de las bibliotecas Parviglumis Sequía-Inundación (PSI) y maíz control (MC) usando EcoRI. Las construcciones con inserto de 20 nt son las que presentan dos productos de digetion de 125 y 75 nt. Las vacías presentan una banda menor a 125 nt y la otra mayor a 75 nt.

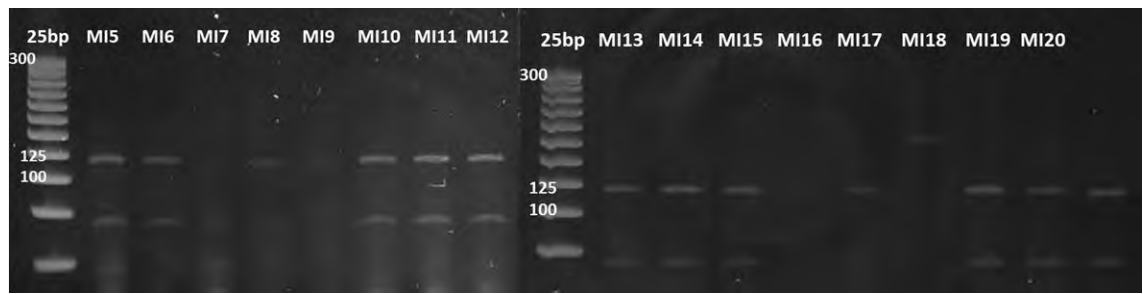


Figura 131. Productos de digestión de las bibliotecas Maíz control (MC) y Maíz Inundación (MI) usando EcoRI.

Las construcciones con inserto de 20 nt son las que presentan dos productos de digetion de 125 y 75 nt. Las vacías presentan una banda menor a 125 nt y la otra mayor a 75 nt.

10.8 Apéndice F: Comparación de gráficos de dispersión para identificar el tratamiento dominante en los seriados.

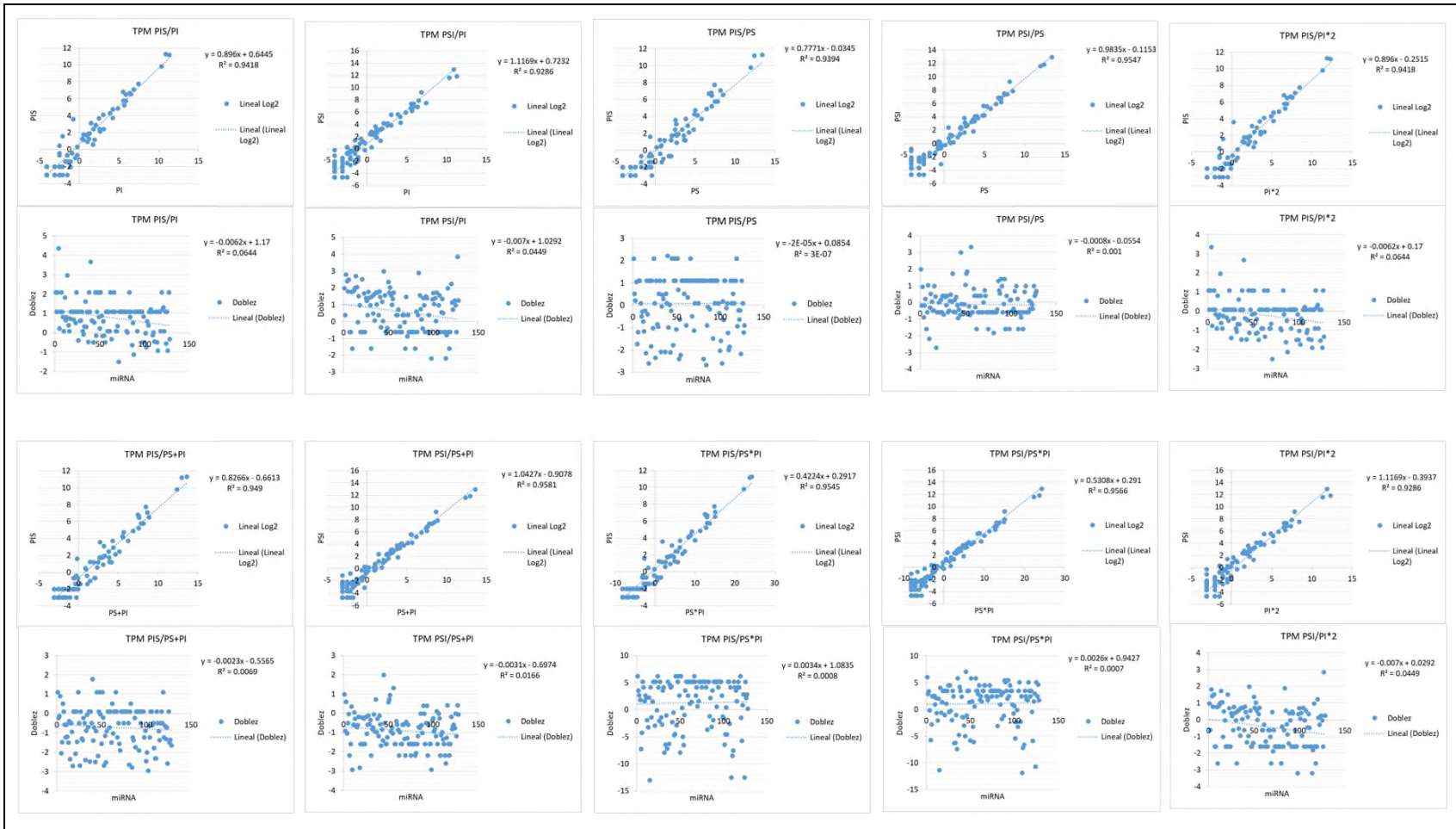


Figura 131. Comparación de gráficos de dispersión para identificar el tratamiento dominante en los seriados. Se graficaron contra los tratamientos individuales, de forma aditiva y multiplicativa.

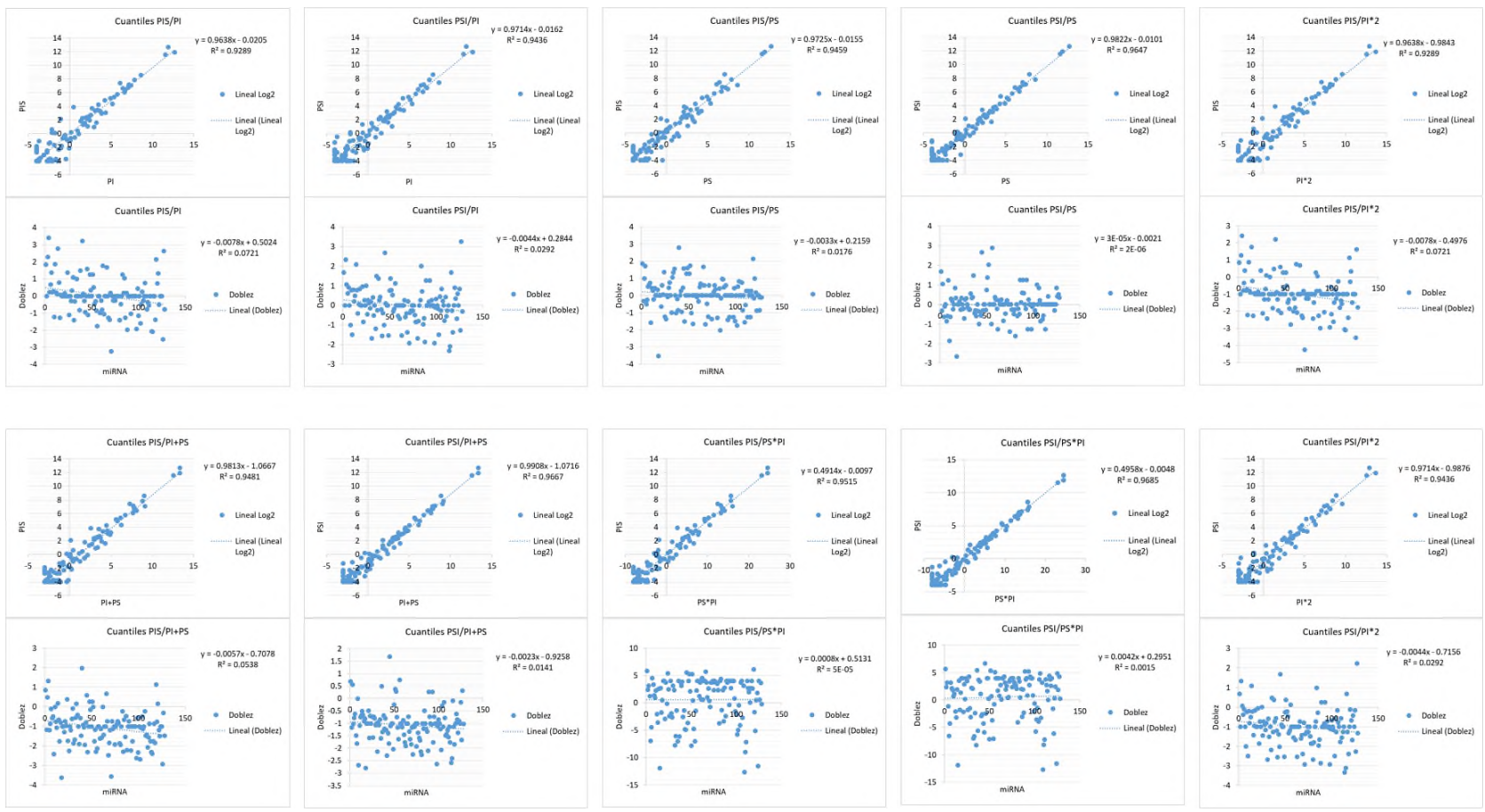


Figura 132. Comparación de gráficos de dispersión para identificar el tratamiento dominante en los seriados. Se graficaron contra los tratamientos individuales, de forma aditiva y multiplicativa.