

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Análisis de expresión de microRNAs en *Brachypodium distachyon* bajo estrés hídrico mediante tres estrategias de PCR cuantitativa

TESIS

Que para obtener el título de

Ingeniero en Biotecnología

Presenta

Alyn Flores Herrerías

Asesora:

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Co-Asesor:

Dr. Julián Mario Peña Castro

Tuxtepec, Oax., Enero de 2016.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 17 de Diciembre del 2015 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada *Análisis de expresión de microRNAs en Brochypodium distachyon* bajo estrés hídrico mediante tres estrategias de PCR cuantitativa presentado por la alumna Alyn Flores Herreras, con número de matrícula 10090008, aspirante al grado de Licenciatura.

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

Tuxtepec, Oax., a 18 de Diciembre del 2015.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor-Investigador

Co-miembro de Tesis

Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor-Investigador

Presidente

Dr. José Abail Zavaleta
Profesor-Investigador

Secretario

Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor-Investigador

Vocal

Dra. Alma Kochil Avila Alejandre
Profesor-Investigador

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, y la codirección del Dr. Julián Mario Peña Castro, con el apoyo de los proyectos CONACyT Ciencia Básica 2010/152643 y 2011/169619

Parte de este trabajo fue presentado en el 1er SIMPOSIUM NACIONAL DE GENOMICA ESTRUCTURAL, COMPARATIVA y FUNCIONAL con el nombre: “Evaluation of methods for quantitative analysis of microRNAs in *Brachypodium distachyon* under water stress” en el Centro de Investigación en Dinámica Celular en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, realizado el 6 y 7 de Agosto del 2015.

Contenido

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Importancia del agua en la distribución y fisiología de las plantas	5
2.2 La agricultura y la sequía.....	6
2.3 Los factores ambientales y su impacto en las plantas.....	9
2.4 Respuestas al estrés hídrico en plantas	10
2.5 Los miRNAs y su importancia en las plantas	12
2.6 Los miRNAs en la floración y en la respuesta al estrés hídrico	15
2.7 Métodos de análisis de la expresión de miRNAs	17
2.8 Cuantificación de miRNAs por qPCR	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1 Objetivos específicos	23
6. METODOLOGIA	24
6.1 Establecimiento de plantas y tratamientos de estrés.....	24
6.1.1 Material vegetal	24
6.1.2 Desinfección de semillas de <i>B. distachyon</i>	24
6.1.3 Generación y propagación de planta de <i>B. distachyon</i>	25
6.1.4 Tratamientos de estrés	25
6.1.5 Medición de parámetros de desarrollo, contenido de agua y fluorescencia de clorofila.....	29
6.1.6 Recolección del tejido vegetativo	30
6.2 Extracción de RNA total.....	30
6.2.1 Tratamiento con DNasa	31
6.3 Ensayos para evaluar las estrategias de PCR cuantitativa	32
6.3.1 Retrotranscripción.....	33
6.3.2 PCR cuantitativa	34

6.3.3 Evaluación de la sensibilidad de los métodos.....	35
6.3.4 Evaluación del intervalo dinámico	35
6.4 Ensayos de expresión de los miRNAs miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200 por PCR cuantitativa	37
6.5 Análisis estadístico de datos	37
7. RESULTADOS	39
7.1 Inducción de estrés y medición de parámetros fisiológicos	39
7.2 Extracción de RNA.....	45
7.2.1 Tratamiento con DNasa	46
7.3 Evaluación de las estrategias de los métodos para PCR cuantitativa	47
7.3.1 PCR cuantitativa y evaluación de la sensibilidad de los métodos	47
7.3.2 Evaluación del intervalo dinámico	55
7.4 Análisis de expresión de los miRNAs 156, 159, 172, 528 y 5200 por PCR cuantitativa.....	56
8. DISCUSION	61
9. CONCLUSIONES	64
10. PERSPECTIVAS.....	65
11. REFERENCIAS.....	66
12. APÉNDICE.....	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Respuestas de las plantas al estrés hídrico a largo y corto plazo.....	10
Tabla 2. Diseño experimental para los tratamientos.....	25
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos diseñados.....	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aumento de las extracciones de agua para la agricultura en el año 2030, en porcentajes.	7
Figura 2. Catástrofes agrícolas 1995-2003 por eventos climáticos extremos.....	7
Figura 3. Biogénesis de los miRNAs y mecanismos de acción.....	12
Figura 4. Funciones de los miRNAs en diferentes etapas del desarrollo de las plantas, desde la fase juvenil hasta el desarrollo de flores, en la planta modelo <i>A. thaliana</i>	15
Figura 5. Métodos para la cuantificación de RNA.....	19
Figura 6. Planeación de los tratamientos de estrés hídrico y las colectas.	27
Figura 7. Simulación de estrés en inundación en tina traslucida para las plántulas de <i>B. distachyon</i>	27
Figura 8. Representación de los métodos de PCR cuantitativa de miRNAs y su adaptación para el empleo de sonda TaqMan universal	37
Figura 9. Plantas de <i>B. distachyon</i> . Bd21, en condiciones normales y estrés por sequía.....	38
Figura 10. Contenido relativo de agua en hojas en condiciones de estrés por sequía y control en plantas de <i>B. distachyon</i> . Media $\pm$ DS.	39
Figura 11. Plántulas de <i>B. distachyon</i> en sumersión.....	39
Figura 12. Fluorescencia de clorofila en las plántulas de <i>B. distachyon</i> . Media $\pm$ DS.....	40
Figura 13. Flores por tratamiento en días después del estrés (DDE), en las plántulas de <i>B. distachyon</i>	42
Figura 14. Tratamientos antes y después del estrés, hasta llegar a la floración, en días después de la germinación (DDG) en <i>B. distachyon</i> : control, sequía-inundación, sequía-control, inundación, sequía, inundación-control.....	43
Figura 15. Gel de agarosa desnaturalizante al 1%, extracciones de ARN con TRIZOL en cada tratamiento.....	45

Figura 16. Gel de agarosa para verificar la integridad y pureza de las muestras después de ser tratadas con DNAsas.....	46
Figura 17. Rango dinámico y sensibilidad de los métodos para el análisis cuantitativo.....	47
Figura 18. Evaluación de técnicas de análisis de expresión de primers sintéticos en Gel de acrilamida al 6%.....	49
Figura 19. Valores de Cq para los métodos SL y SPT con sus diferentes diluciones. Comparando los dos métodos con la distribución de t. de Student con significancia $t < 0.05$	49
Figura 20. Valores de Cq para los métodos SL y SPT con sus diferentes diluciones. Comparando cada método con sus concentraciones y análisis de Media $\pm$ DS.	50
Figura 21. Graficas de qPCR de los métodos SL y SPT con concentraciones de 10 μ M hasta 0.0001 μ M y negativo.....	51
Figura 22. Evaluación de los métodos, valores en Cq con sus respectivas graficas de qPCR: A) Stem-loop, B) S-Poly (T) y C) Linker1 con concentración de 2.5 μ g y 1 μ g. Análisis de Media $\pm$ DS.	52
Figura 23. Expresión de sensibilidad de SL y SPT mediante el uso de primersMIX.....	54
Figura 24. Rango dinámico y sensibilidad de SL para miR156 y miR159.....	55
Figura 25. Expresión de los miRNAS en respuesta al estrés en los diferentes tratamientos con análisis de Media $\pm$ DS.	57
Figura 26. Expresión de los miRNAS 156, 159, 166 y 528, en respuesta a los estreses por sequía.....	58
Figura 27. Expresión de los miRNAs 156, 159, 166 y 528, en respuesta al estrés por inundación.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Acido Abscísico
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
GA	Acido giberelico
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
AGO	Argonauta
AP2	Apetala 2
Bd21	<i>Brachypodium distachyon</i> ecotipo 21
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
cm	centímetros
DCL1	Dicer Like 1
DEPC	Dietilpirocarbonato
°C	Grados centígrados
CRA	Contenido Relativo de Agua
FAM	6-carboxifluoresceína
g	Gramos
h	Horas
ha	Hectáreas
IABkFQ	Bloqueador (quencher) Iowa Black
Kg	Kilogramo
L	Litros
m	Metros
miRNA	MicroRNA
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros

min	Minutos
M	Molar
nM	Nanomolar
N	Normal
Ct	Número de ciclos para alcanzar el valor de fluorescencia umbral
qPCR	Reaccion en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
siRNAs	RNAs pequeños de interferencia
SPL9	Promotor Squamosa tipo 9
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional
Ps	Peso seco
Pt	Peso turgente
Pf	Peso fresco
T	Temperatura
TGS	Silenciamiento génico transcripcional
Ton	Toneladas
V	Volt

RESUMEN

En los últimos años, la agricultura mexicana ha sido afectada por eventos climáticos adversos, principalmente en la forma de sequías e inundaciones, que han ocasionado mala calidad, baja productividad o pérdidas totales en los cultivos. Naturalmente, las plantas responden al estrés hídrico a través de diferentes estrategias que implican cambios en la expresión de los genes. En muchos casos, dichos cambios están regulados por pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs (miRNAs). Los microRNAs pueden controlar la expresión de familias genéticas completas, por lo que son candidatos ideales para el control de rutas moleculares integrales en estrategias de mejoramiento de la tolerancia al estrés. Para explorar el potencial de los microRNAs, es necesario contar con herramientas de análisis de expresión adecuadas. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar los métodos disponibles para el análisis de expresión, y seleccionar el mejor para analizar la expresión de miRNAs clave en la respuesta al estrés hídrico. Para esto, se evaluó la sensibilidad e intervalo dinámico de tres métodos de análisis de expresión de miRNAs por PCR cuantitativa (qPCR): 1) Método stem-loop, 2) Método S-Poli(T), y 3) Método de ligación de adaptador. De acuerdo a los resultados, el método stem-loop y el S-Poli(T) presentaron características similares, aunque el primero mostró mayor sensibilidad y un amplio intervalo dinámico. Sin embargo, ambos métodos tienden a saturarse a concentraciones de RNA elevadas. El método de ligación de adaptador no logró detectar a los miRNAs bajo estudio. También, se aplicó el método stem-loop para analizar la expresión de los miRNAs, miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200, en plantas de *Brachypodium distachyon* expuestas a eventos de estrés por sequía e inundación. Los resultados mostraron que miR156 y miR528 alteraron su expresión en respuesta a la sequía y al tratamiento de sequía seguido por inundación. Además, estos miRNAs se indujeron durante la recuperación en plantas que sufrieron inundación. Los resultados de este trabajo proporcionan información acerca de la importancia de los microRNAs analizados y permiten ampliar el conocimiento de la respuesta a condiciones adversas que ocurren en forma consecutiva en el ambiente natural.

1. INTRODUCCIÓN

México posee una amplia diversidad de climas, lo que permite el cultivo de un gran número de especies en su territorio (INEGI, 2009). El cultivo de plantas monocotiledóneas, cuyos granos son una fuente importante de alimentos, está distribuido a lo largo y ancho del territorio mexicano. Por ejemplo, actualmente se dedican más de 7 millones de hectáreas al cultivo del maíz, una planta monocotiledónea fundamental en la alimentación en México (FAO, 2012), pero se cree que en los próximos años ocurrirá una reducción de estas tierras (Olivera-Villaroel *et al.*, 2013).

El maíz y otras plantas monocotiledóneas que son fuente de alimento se enfrentan a eventos severos de sequía e inundaciones en los sitios donde se cultivan. Cabe mencionar que la sequía es la causa más importante de pérdidas en la agricultura en México, dadas sus condiciones climáticas y la alteración del ciclo de precipitaciones como consecuencia del cambio climático. Además de la sequía, México es zona de huracanes, por lo que las inundaciones ocupan el segundo lugar como causa de pérdidas económicas debidas a factores ambientales adversos (Agroasemex, 2006).

Cuando se altera la disponibilidad del agua, ya sea en eventos de sequía o inundación, los procesos naturales y el rendimiento de las plantas se ven afectados causando pérdidas significativas en la agricultura, la calidad de vida y la economía de quienes dependen de esta actividad. (FAO, 2012). Para atenuar el impacto del desequilibrio hídrico, se espera que surjan nuevas estrategias tendientes a mejorar el uso de las tierras y el agua, así como el desarrollo de cultivos tolerantes a los diferentes estreses hídricos.

Se sabe que las plantas responden al estrés hídrico a través de estrategias que implican cambios en la expresión de los genes, y es probable que pueda existir un punto de respuesta cruzada entre la sequía y la inundación, como se demostró con el gen SUB1A, que codifica un factor de transcripción que responde ante el etileno, que es el responsable de la tolerancia a las inundaciones en cultivos de arroz (Fukao *et al.*, 2011) y recientemente se ha propuesto que podría mediar también la tolerancia a la sequía (Fukao y Xiong, 2013).

Se ha reportado que los cambios en la expresión de los genes pueden estar regulados por la actividad de pequeñas moléculas de RNA, llamadas miRNAs. Estas moléculas participan en procesos importantes como el desarrollo y la respuesta a los estímulos ambientales en todos los organismos eucariotas. En las plantas se han identificado varios miRNAs que participan en la respuesta al estrés por sequía (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011). También, se ha reportado que los miRNAs participan en la respuesta a la sumersión en *Brachypodium distachyon*, condición a la que se someten las plantas cuando la inundación las cubre totalmente. La sumersión activa la respuesta mediada por miRNAs para reprimir directamente el proceso de floración, como parte de la estrategia de quiescencia en plantas (Jeong *et al.*, 2013).

Las evidencias experimentales apuntan a los miRNAs como probables mediadores de la respuesta cruzada a ambos tipos de estrés hídrico. Para probarlo, es necesario emplear herramientas moleculares de análisis, que sean eficientes y permitan la identificación de los principales reguladores en las rutas complejas de respuesta a la sequía y a la inundación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del agua en la distribución y fisiología de las plantas

El agua juega un papel muy importante en el ciclo de vida de las plantas. Aproximadamente más del 97% del agua es absorbido por las raíces, transportándolas por las plantas y evaporándolas por la superficie de las hojas, en un fenómeno conocido como transpiración. El 2% del agua es suministrada para el crecimiento o consumida en los eventos bioquímicos de la fotosíntesis, y el 1% se emplea en otros procesos metabólicos (Chaumont *et al.*, 2012). En la pared celular de las plantas ocurren sucesos de gran impacto relacionados con el agua. La pared celular permite presiones hidrostáticas dentro de las células de la planta, la cual es esencial para muchos eventos fisiológicos, como la apertura de estomas, el crecimiento de las células y procesos de transporte a través de las membranas (Wheeler *et al.*, 2008). Las presiones hidrostáticas son además importantes para mantener la estructura celular y dar fuerza a los tejidos vegetales.

El desequilibrio en la disponibilidad de agua no sólo es causado por fenómenos externos; los procesos biológicos naturales pueden por sí mismos ocasionarlo. Por ejemplo, la fotosíntesis, que es indispensable para extraer el dióxido de carbono de la atmósfera, expone a la pérdida de agua. La captación y el transporte de agua también puede provocar pérdidas hacia la atmósfera, resultando en déficit hídrico que impacta diversos procesos celulares que dependen del agua (Bartlett *et al.*, 2012).

Con respecto a los procesos fisiológicos que son afectados por la disponibilidad de agua en las plantas, se sabe que, a causa de las pérdidas de agua hacia la atmósfera por transpiración, las plantas son difícilmente rehidratadas en su totalidad. Cuando existen periodos de sequía, las plantas sufren déficit de agua que tiene como consecuencia una reducción en su crecimiento, en la fotosíntesis, raíces y células de expansión, que son de las más afectadas por los eventos de limitación de agua. Si bien, muchas plantas bajo condiciones de estrés hídrico inhiben el crecimiento y la expansión de las hojas, tienden a estimular la elongación en las raíces. No obstante las plantas no pueden alterar la disponibilidad de agua en el suelo (Goldstein *et al.*, 1991).

El mantenimiento de un equilibrio adecuado de agua en las plantas depende en gran medida de los mecanismos de transporte - desde y -hacia el medio ambiente, así como de la estructura y composición del suelo. Los suelos arcillosos, por ejemplo, poseen grandes superficies y pequeños canales entre las partículas. No obstante, cuando un suelo está muy mojado por la lluvia o por irrigación, el agua se filtra bajando por gravedad a través de los espacios que existen entre las partículas. Después de algunos días de lluvia, los suelos arcillosos pueden contener 40% de agua, mientras que en suelos arenosos se retienen solo un 15% de agua después de estar mojados (Taiz *et al.*, 2015). En cuanto a los mecanismos de transporte, se conocen tres tipos: difusión, flujo de masa y ósmosis. Estos mecanismos son importantes para el movimiento del agua y sustancias a corta distancia o entre células, y a larga distancia para mover el agua a través del tallo y atravesar paredes celulares, o en respuesta a fuerzas de gradientes osmóticos y de presión (Araya, 2007).

2.2 La agricultura y la sequía

La agricultura es una actividad de gran importancia practicada a nivel mundial, debido a que es la base del desarrollo de autosuficiencia y riqueza en alimentos de las sociedades. En México, del territorio total de 198 millones de hectáreas, 145 millones se dedican a la actividad agropecuaria (SAGARPA, 2007). La agricultura es también la actividad más practicada en las poblaciones rurales, donde representa en mayor porcentaje la obtención del ingreso familiar (SAGARPA, 2004).

El agua está muy relacionada con el desarrollo de la agricultura; es, de hecho, uno de los elementos indispensables para la producción agrícola. Muchos de los cultivos agrícolas en el mundo se desarrollan con el régimen de agua de temporal, es decir, que dependen del agua de la lluvia.

Desafortunadamente, el cambio climático ha alterado el equilibrio del ciclo del agua, causando escasez de agua o sequía e inundaciones. Ambas condiciones, la sequía y la inundación, tienen impacto negativo en la producción de alimentos al ser dos riesgos naturales para la agricultura que afectan no sólo a la población y su economía, sino también a las áreas cultivadas, dejándolas en mal estado (FAO, 2012).

Actualmente la humanidad se plantea el reto de reducir la pobreza a la vez que aumenta la población. Sin embargo, el aumento de población dará lugar a una mayor demanda de alimentos, que deberán producirse en un ambiente cada vez más adverso. Esto requerirá que aumente la extracción de agua para riego de campos agrícolas que padecen sequía, con los altos costos económicos que esto conlleva. Las predicciones indican que durante los próximos 20 años la producción agrícola tenderá a aumentar debido a la necesidad de alimentar a la población creciente, por lo que se espera que aumente la extracción de agua para el 2030 a más del 100 % en seis países, y moderadamente (50-100 %) en otros 27 países (Fig. 1). Los aumentos serán inferiores al 20 % en 41 países como se observa en la Fig. 1 (FAO, 2012.)

La sequía se extiende por nuestro país y atenta contra el abasto de alimentos al provocar pérdidas de millones de hectáreas (ha) dedicadas a los principales cultivos como el maíz y el frijol. Así, México es considerado en Latinoamérica como el país que posee menor disposición de agua, por las malas acciones que se realizan, como es la sobreexplotación de los mantos acuíferos, la contaminación y su desperdicio (IMTA 2009).

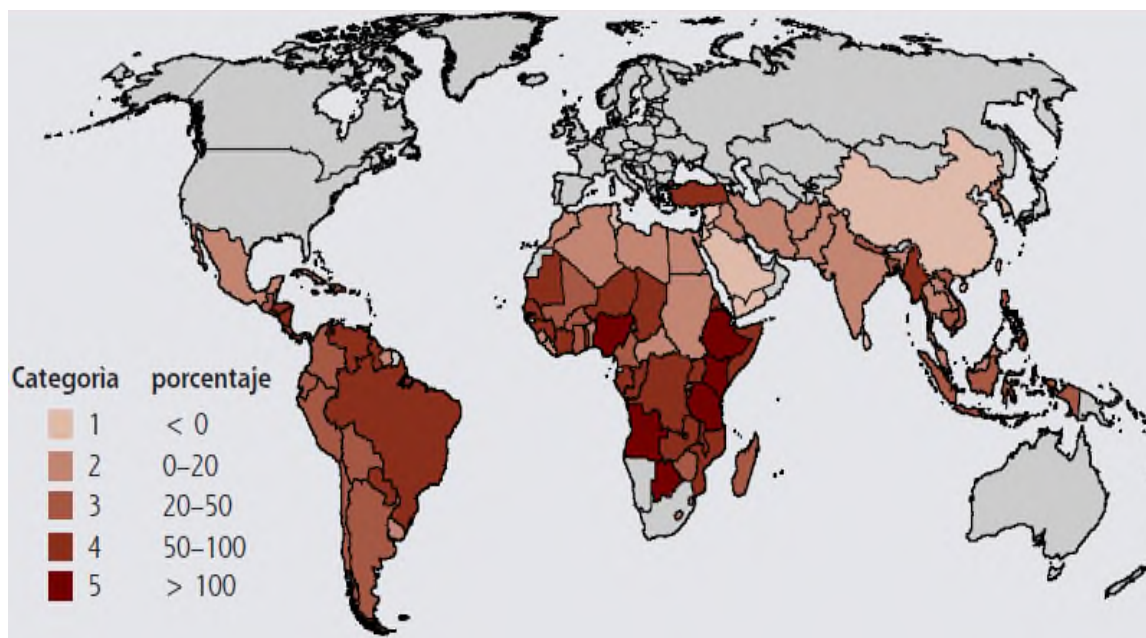


Figura 1. Aumento de las extracciones de agua para la agricultura en el año 2030, en porcentajes. (FAO, 2012).

Por otra parte, en México también se sufre por lluvias excesivas que provocan inundaciones cada vez más severas. Después de la sequía, los huracanes y en general las inundaciones, se ubican como la segunda causa de pérdidas económicas en agricultura debidas a factores ambientales (Agroasemex, 2006) (Fig. 2). Por lo tanto, el campo mexicano padece de ambos extremos del estrés hídrico.

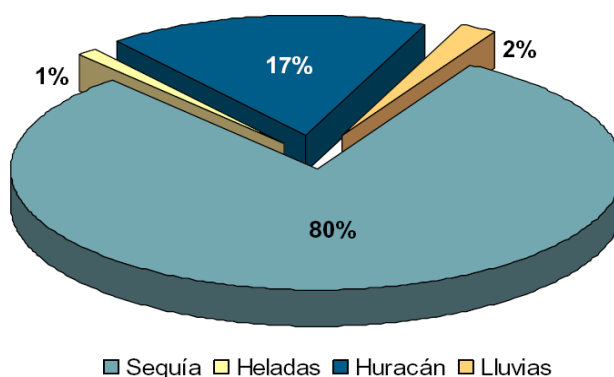


Figura 2. Catástrofes agrícolas 1995-2003 por eventos climáticos extremos. (Agroasemex, 2006).

2.3 Los factores ambientales y su impacto en las plantas

Los factores ambientales adversos impactan negativamente el desarrollo de las plantas; pueden interrumpir el metabolismo a través de diversos mecanismos, muchos de los cuales resultan en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Suzuki *et al.*, 2012). La deshidratación de las células disminuye la turgencia, incrementando el estrés iónico y la inhibición de la fotosíntesis. La alta salinidad causa la desnaturalización de proteínas y la desestabilización de membranas, y limita el crecimiento de las plantas al afectar la fotosíntesis (Sudhir y Murthy, 2004). La temperatura es un factor crítico que puede afectar la estabilidad de las proteínas, las reacciones enzimáticas, la fluidez en las membranas y las estructuras secundarias de RNA y DNA (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Los suelos inundados suelen estar agotados de oxígeno, iniciando un estrés del tipo aeróbico en la raíz. Por otro lado, los metales pesados pueden remplazar otros metales esenciales e interrumpir reacciones clave. A niveles tóxicos, los metales pesados interactúan con biomoléculas esenciales como las proteínas nucleares y el DNA, provocando el aumento excesivo de ROS (Emamverdian *et al.*, 2015). La falta de nutrientes minerales disponibles suprime el crecimiento de las plantas y su reproducción. El ozono y la luz ultravioleta induce a la formación de ROS y la formación de lesiones en las hojas programándolas para la muerte (Nawkar *et al.*, 2013).

La combinación de factores abióticos adversos puede tener efectos en la fisiología de las plantas y su productividad, haciéndolas diferentes de los efectos de factores abióticos individuales, ya que las plantas podrían adquirir protección cruzada cuando se exponen a diferentes estímulos. Cada uno de los mecanismos de respuesta a estos factores pueden actuar de manera individual o en combinación para activar las señales río abajo de las rutas para la transducción (Fraire-Velázquez *et al.*, 2011).

2.4 Respuestas al estrés hídrico en plantas

El estrés vegetal se define como cualquier condición desfavorable o sustancia que afecta o bloquea el metabolismo, el crecimiento o el desarrollo de una planta (Lichtenthaler, 1996). En su ambiente natural, las plantas enfrentan una variedad de condiciones adversas que les producen estrés, como son las carencias de nutrientes, el exceso de humedad, la sequía, el ataque de plagas, hipoxia y cambios de temperatura, entre otros factores.

La disponibilidad del agua es un factor crítico para el desarrollo de las plantas. Sus alteraciones, como ocurre en la sequía y en su contraparte, la inundación, afectan directamente la productividad (Tardieu *et al.*, 2014). La capacidad de las plantas para tolerar el estrés hídrico depende directamente de la duración y la severidad del estrés, así como de la etapa de desarrollo en que se encuentre la planta. Estos parámetros son importantes para el análisis de la respuesta de las plantas en estudios en los que se investigan los procesos involucrados, y que se encuentran dirigidos a desarrollar estrategias de supervivencia o selección de variedades resistentes al estrés (Bewley y Black, 1994).

Las plantas expuestas al estrés hídrico responden a través de cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, por ejemplo, reajustando hacia arriba o hacia abajo la producción de hormonas reguladoras, alterando su morfología para limitar el área expuesta a la deshidratación o al exceso de agua, extendiendo sus raíces para buscar agua adicional, o alargando su tallo para escapar a la inundación. Ante condiciones de déficit hídrico, las plantas cierran sus estomas para reducir la pérdida de agua por transpiración como primera línea de defensa (Taiz *et al.*, 2015). Sin embargo, el cierre de estomas también limita la captación del CO₂ hacia la planta, reduciendo la fotosíntesis y bloqueando el crecimiento (Nobel *et al.*, 1999). Las plantas pueden también acumular osmolitos o solutos compatibles, como la glicinbetaína y la prolina, para mantener un potencial osmótico favorable que permita continuar extrayendo agua residual del suelo hacia la planta (Giri *et al.*, 2011). Otro tipo de respuesta es la

estimulación del crecimiento del tallo en el caso de plantas que se encuentran inundadas como estrategia para sobrepasar la columna de agua en exceso y escapar a la inundación (Fukao y Xiong, 2013).

Las plantas expuestas al estrés hídrico pueden responder a largo plazo (aclimatación) y a corto plazo (Tabla 1). La mayoría de estas respuestas tienen que ver con rasgos relacionados a la adaptación de la planta, por ejemplo, con el tamaño de la raíz y la profundidad, la conductividad hidráulica y las reservas de almacenamiento en las semillas que están asociados al desarrollo de la planta. Cabe mencionar que uno de los mecanismos naturales responsables de la fotoprotección de la hoja, están especialmente relacionados con la disipación térmica y el estrés oxidativo. Las plantas evitan la deshidratación de sus tejidos manteniendo el potencial hídrico. Este mecanismo se observa por lo general en plantas anuales y perennes, y se ha asociado a características propias como por ejemplo: la capacidad para minimizar la pérdida de agua y maximizar la absorción de agua. La pérdida de agua se minimiza mediante el cierre de estomas (Santos *et al.*, 2009)

Tabla 1. Respuestas de las plantas al estrés hídrico a largo y corto plazo.

	<i>Respuestas a largo plazo</i>	<i>Respuestas a corto plazo</i>
<i>Baja humedad</i> <i>alta temperatura</i> <i>luz alta</i>	Inhibición en el crecimiento de brotes.	Señal de reconocimiento de la raíz.
	Reducción en el área de transpiración.	Cierre de estomas.
	Respuestas génicas.	Asimilación del decremento de carbono.
	Aclimatación metabólica.	Señales de multi-estrés.
	Ajuste osmótico.	Respuestas génicas.
<i>Déficit de agua</i> <i>compactación de suelo</i>	Mantenimiento de turgencia.	Señal de transporte.
	Crecimiento de la raíz.	Respuestas génicas.
	Incremento de la raíz/brote.	Ajuste osmótico.
	Incremento en el área de absorción.	Señalización de la sequia celular.

El estrés hídrico puede inducir cambios en el ciclo de vida, interrumpiendo el crecimiento vegetativo y acelerando el inicio de la fase de floración, o bien, deteniendo

el crecimiento en la etapa vegetativa y prolongándola. Este tipo de respuesta, que consiste en el acortamiento o alargamiento del ciclo de vida se conoce como plasticidad. Otros ejemplos de respuesta de plasticidad son la alteración de la forma, el área, la orientación y la ondulación de las hojas, o la aparición de tricomas en éstas, para limitar o repeler la exposición al estrés hídrico (Tardieu *et al.*, 2014).

La ejecución de los cambios en la duración del ciclo de vida, así como otros de tipo bioquímico y morfológico, son resultado de mecanismos moleculares que implican ajustes en la expresión de los genes. Estos ajustes consisten en la inducción de la expresión de ciertos genes para activar funciones de respuesta, protección y defensa ante el estrés, y la represión de otros genes, cuyos productos no son inminentes para la supervivencia de la planta. Los mecanismos moleculares de respuesta al estrés son fundamentales para la tolerancia y, por lo tanto, deben regularse con precisión (Springgs *et al.*, 2010).

Existe evidencia de la participación de un tipo de moléculas de RNA, llamadas microRNAs, en las redes de regulación de la expresión génica en plantas bajo estrés abiótico (Sunkar y Zhu, 2004; Barrera-Figueroa *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012; Khraiweh *et al.*, 2012; Jeong y Green, 2013).

2.5 Los miRNAs y su importancia en las plantas

Los miRNAs son pequeñas moléculas endógenas de RNA no codificante, de 20-30 nucleótidos de longitud. En plantas, la actividad de los miRNAs es determinante para el desarrollo, la morfología, el metabolismo y la respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Khraiweh *et al.*, 2012).

Los miRNAs poseen secuencias que complementan a genes o transcritos específicos, llamados blanco, a los que se hibridan y de esta forma los marcan para ser silenciados, impidiendo así su transcripción, o bien, si ya fueron transcritos, evitando su traducción o etiquetándolos para su degradación. Cuando esta actividad se lleva a cabo sobre los

genes, a nivel de DNA, se conoce como silenciamiento génico transcripcional (TGS). Cuando sucede sobre los transcritos, es decir, sobre RNA, se conoce como silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) (Xie *et al.*, 2008).

Los miRNAs son parte de un grupo más amplio de RNAs pequeños, pero se distinguen del resto por la forma en que se generan. A diferencia de otros tipos de RNAs pequeños, los miRNAs provienen de un transcrito con estructura de horquilla o tallo-asa. Los miRNAs son primero sintetizados a partir del DNA por la RNA polimerasa II que genera un RNA largo llamado miRNA primario, el cual toma una estructura tallo-asa (Fig. 3a). Después de un procesamiento simple, el miRNA primario se convierte en miRNA precursor (Fig. 3b). La proteína DCL1 (DICER LIKE 1) se encarga de procesar los RNAs precursores y liberar pequeños RNAs de doble cadena (dúplex) de 20-24 pares de bases (Fig. 3c). El resto de RNA pequeños incluye los siRNAs de interferencia (siRNAs). Algunos de éstos utilizan la metilación y la modificación de histonas para el silenciamiento génico transcripcional, y son conocidos como siRNAs heterocromáticos (Chinnusamy y Zhu, 2009).

En las plantas, los miRNAs se metilan en el extremo 3' mediante la actividad de la proteína HEN1 (Fig. 3d). Una vez procesados los miRNAs dúplex, un homólogo de exportina 5 (HASTY) (Fig. 3e) lo transporta al citoplasma, por medio del mecanismo de Ran-GTP y ya cuando se encuentran en el citoplasma, se incorporan al complejo RISC (Fig. 3f), en donde una de las hebras del RNA se degrada. La hebra que queda íntegra es funcional y se llama miRNA maduro. El complejo RISC, que involucra a la proteína AGO1 y un miRNA maduro tienen la capacidad de encontrar a un mensajero blanco sobre el cual actuará mediante degradación de RNA (Fig. 3g) o inhibición de la traducción (Fig. 3h) (Kim, 2005).

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

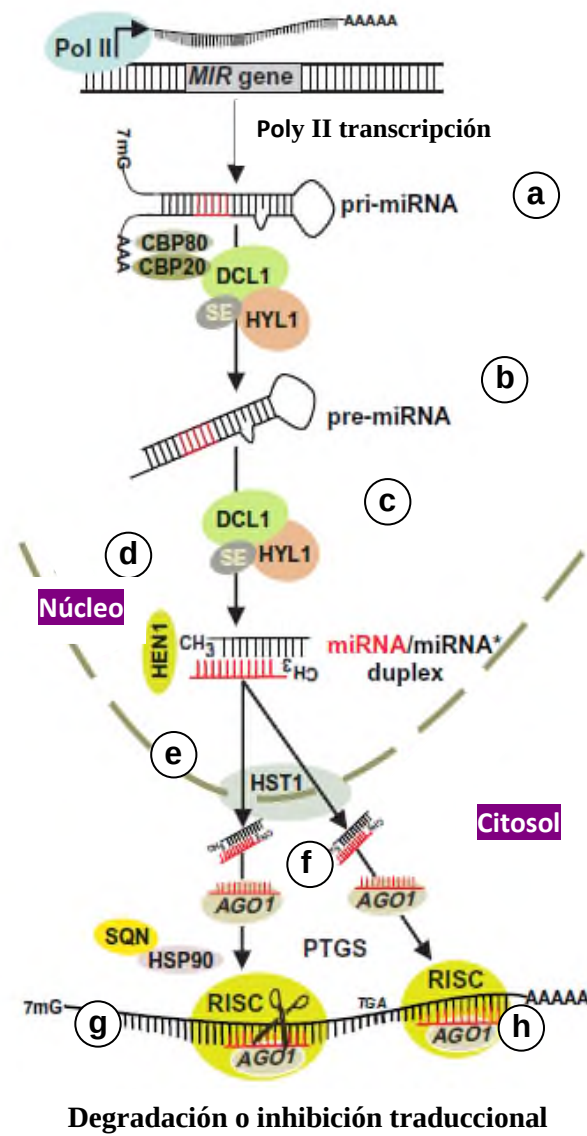


Figura 3. Biogénesis de los microRNAs y mecanismos de acción (Kraiweh *et al.*, 2011).

2.6 Los miRNAs en la floración y en la respuesta al estrés hídrico

El evento esencial para la producción de semillas en las plantas es la transición del estado vegetativo al estado maduro, que ocurre con el inicio de la floración y la producción de frutos y semillas. La iniciación de la floración está regulada genéticamente a través de cinco vías distintas: fotoperiodo, vernalización, autónoma, edad y hormonal (regulado por giberelinas) (Fornara *et al.*, 2010).

El estrés hídrico ocasionado por la sequía puede alterar el proceso de floración en las plantas, ya sea adelantando la aparición de las primeras flores, en un proceso llamado escape, o bien, retardando la formación de flores. Por ejemplo, en la planta monocotiledónea modelo, *Brachypodium distachyon* Bd21 se ha observado que la sequía retrasa la floración, mientras que en variantes como Bd1-1 y Bd2-3, la adelanta (Cesario-Solís, 2015). En el caso de la inundación, se ha reportado que en *Brachypodium* ocasiona el retraso de la floración y que este proceso está mediado por la regulación negativa del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)*, cuya proteína es llamada florigeno y promueve la floración. (Wu *et al.*, 2013). Adicionalmente, en la planta dicotiledónea modelo, *Arabidopsis thaliana*, se ha observado el fenómeno de escape a la sequía y se ha identificado a genes como *GIGANTEA (GI)* y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* como mediadores de la floración temprana en respuesta al estrés (Riboni *et al.*, 2013). De esta forma, se tiene que el estrés hídrico puede ejercer influencia sobre la temporalidad del proceso de transición a la floración para alterar la duración del ciclo de vida de las plantas.

En general, se reconoce que los miRNAs: miR159, miR172, miR156, miR169 y miR399, entre otros, están involucrados en la regulación de la floración (Fig. 4). Existe evidencia de que miR169 está implicado en la respuesta de escape a la sequía (floración temprana en respuesta al estrés) en *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2013).

Por otra parte, un miRNA específico en monocotiledóneas, miR5200, participa en la transición floral mediada por fotoperiodo y en el retraso de la floración en respuesta a la

inundación (Jeong *et al.*, 2013) mediante la regulación negativa del inductor floral FLOWERING LOCUS T (FT) (Wu *et al.*, 2013). Se ha reportado que miR159 regula la señalización del ácido abscísico (ABA) durante la germinación de las semillas en la sequía, mientras que durante el desarrollo de la flor miR159 es controlado por ácido giberelico (GA), (Reyes y Chua, 2007); mirR172 regula a *APETALA 2 (AP2)*, que a su vez regula a un gen que desempeña un papel en el desarrollo floral (Wu, *et al.*, 2009). La sobreexpresión de microRNA172 acelera la floración en *Arabidopsis* (Aukerman y Sakai, 2003; Chen, 2004; Jung *et al.*, 2007). MiR156 es necesario para el desarrollo de la fase juvenil y regula el tiempo de la transición de juvenil a adulto mediante la expresión de miR172 a través de la proteína SQUAMOSA PROMOTOR LINKER9 (SPL9) (Wu *et al.*, 2009). Cuando miR156 se sobreexpresa en *Arabidopsis* y maíz se atrasa la floración (Wu y Poething, 2006; Chuck *et al.*, 2007). MiR528 se expresa fuertemente en cultivos de *Saccharum spp.* bajo estrés por sequía, ocasionando reducción en el crecimiento de la planta (Ferreira *et al.*, 2012); miR528 está conservado en especies monocotiledóneas y se encuentra ausente en dicotiledóneas (Zanca *et al.*, 2010), lo que sugiere la existencia de mecanismos de respuesta mediados por miRNAs que son específicos de cada grupo de plantas.

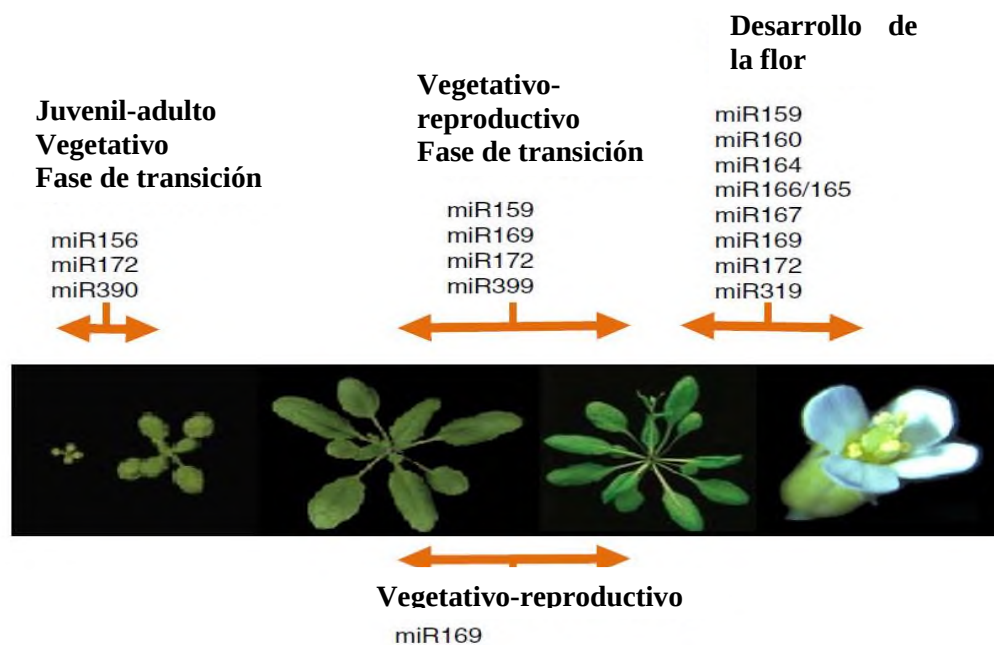


Figura 4. Funciones de los miRNAs en diferentes etapas del desarrollo de las plantas, desde la fase juvenil hasta el desarrollo de flores, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Hong y Jackson, 2015)

2.7 Métodos de análisis de la expresión de miRNAs

Los miRNAs son reguladores maestros de la expresión genética ya que pueden tener bajo su control a un amplio número de genes blanco, logrando con esto regular cascadas completas de respuesta. Esto los convierte en herramientas potenciales para el mejoramiento de características de interés en biotecnología, como la tolerancia al estrés y la producción de biomasa para la producción de biocombustibles (Trumbo *et al.*, 2015), entre otras aplicaciones. Para aprovechar su potencial, es necesario identificar a los miRNAs que participan regulando las respuestas en los procesos biológicos de interés y analizar sus dinámicas de expresión.

El estudio de los miRNAs y de sus dinámicas de expresión requiere el empleo de técnicas de biología molecular. Entre los métodos clásicos para el análisis de expresión de miRNAs se encuentran los Northern blot y la RT-PCR semicuantitativa. Otras tecnologías más modernas y de mayor alcance y de capacidad para analizar poblaciones completas de RNAs pequeños, son los microarreglos y la secuenciación de alto rendimiento mediante plataformas Illumina y IonProton, entre otras. Cada uno de estos métodos posee ventajas y desventajas. Por ejemplo, los microarreglos son útiles, pero en algunos casos pueden mostrar deficiencias en precisión, no detectan miRNAs de baja abundancia, o están limitados a especies con genoma secuenciado.

Por su parte, la secuenciación masiva o de alto rendimiento favorece el descubrimiento de nuevos miRNAs y otras secuencias de RNAs pequeños que podrían participar en los procesos de interés, pero requiere análisis bioinformático especializado para el manejo y clasificación de la información generada por el secuenciador. Por su parte, el ensayo Northern blot es útil para el análisis de miRNAs individuales, pero puede presentar problemas de detección cruzada de miRNAs con alta similitud de secuencia.

En general, los métodos como los microarreglos y la secuenciación masiva permiten obtener una imagen completa de la población total de miRNAs que se expresan en una muestra. Estos estudios van acompañados generalmente del análisis de expresión

individual de miRNAs seleccionados a partir del análisis comparativo de las muestras secuenciadas. Para este fin, se emplean tradicionalmente ensayos Northern blot. Sin embargo, en los últimos años los Northern blots han sido sustituidos por la cuantificación por PCR, o PCR cuantitativa (qPCR), también conocida como PCR en tiempo real.

2.8 Cuantificación de miRNAs por qPCR

Actualmente se destacan tres métodos de cuantificación de miRNAs basados en la qPCR, como el Stem-Loop (SL), el basado en poliadenilación y su variante S-Poli (T) (SPT), y la ligación de adaptador (LA).

a) Método Stem-Loop. El método Stem-Loop fue propuesto por primera vez por Chen *et al.*, (2005). Utiliza primers que forman una estructura tallo-asa para la síntesis de cDNA a partir de miRNAs maduros (Fig. 5a). Es un método de alta especificidad debido a que cada primer utilizado en la transcripción inversa es único para cada miRNA. Sin embargo, se considera que posee bajo rendimiento y especificidad debido a que solo algunas bases de nucleótidos son las que interactúan en la unión del extremo 3' del primer stem-loop a los miRNAs (Fig. 5a). Enseguida, un primer directo que reconoce la secuencia del miRNA, un primer reverso, y una sonda TaqMan parcialmente complementaria al miRNA, se emplean para llevar a cabo la cuantificación por PCR (Tang *et al.*, 2006). No obstante, es el método más aceptado y empleado ampliamente para el análisis de expresión de miRNAs. Puede realizarse empleando el intercalador SYBRGreen, o bien, empleando sondas Taqman.

b) Método Poli(A) y S-Poli(T). Estos métodos se basan en la poliadenilación de miRNAs por poli(A) polimerasa, seguidos de transcripción reversa para sintetizar cDNA usando un primer universal (dT) que contiene seis bases específicas para el miRNA que se desea detectar. En el caso del método Poli(A), permite la síntesis de cDNA simultánea de todos los RNAs poliadenilados incluyendo los ARNm, ARNr, ARNt,

miRNAs primarios, pre y maduros seguido de la qPCR con un primer directo miRNA específico y un primer universal inverso (Shi y Chiang, 2005). Se considera un método de alto rendimiento debido a que es capaz de detectar la expresión, no solo del miRNA maduro, sino de su RNA precursor (RNA largo del cual se origina el miRNA maduro). Sin embargo, esto puede limitar la detección real del miRNA maduro.

El método S-Poli(T) (Fig. 5b) es una variante de la técnica Poli(A). A diferencia, el método S-Poli (T) no emplea un oligonucleótido universal (dT), sino un oligonucleótido largo que incluye un sitio Poli T (dT) fusionado a seis bases específicas del miRNA sujeto de estudio, además de un sitio de unión a una sonda fluorescente (Fig. 5). Esto incrementa la eficiencia de la retrotranscripción, la sensibilidad y la especificidad, comparado con el método Poli(A) y el Stem-Loop (Kang *et al.*, 2012).

c) El método de ligación de adaptador (LA) se basa en la unión enzimática de un adaptador pre-adenilado al extremo 3' de los RNAs pequeños, mediante la T4 RNA ligasa 2 (Fig. 5c). En este método existen dos variantes de acuerdo al tipo de adaptador que se liga. Puede emplearse un adaptador de secuencia definida o un adaptador con 2-4 bases degeneradas (2-4N) en el extremo 5'. El uso de un adaptador con bases degeneradas intenta disminuir el sesgo que presenta la enzima T4 RNA ligasa 2 al ligar fragmentos de RNA con mayor o menor preferencia, dependiendo de su secuencia. Así, teóricamente, la posibilidad de tener todas las combinaciones de secuencias en las dos a cuatro primeras bases, aumenta la probabilidad de que el miRNA en cuestión se una al adaptador. De esta forma se espera que el método LA detecte a los miRNAs con alta eficiencia y, por lo tanto, con mejor sensibilidad (Ge *et al.*, 2014) (Fig. 5c).

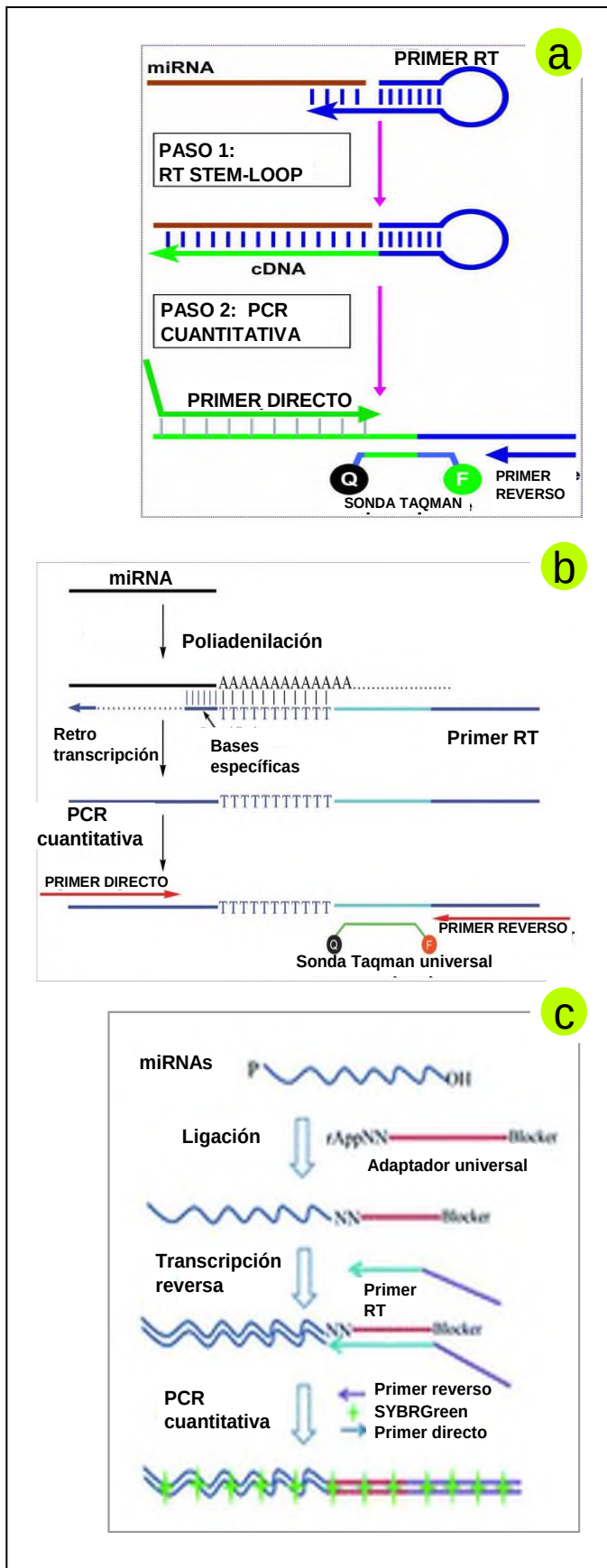


Figura 5. Métodos para la cuantificación de miRNAs. (a) STEM-LOOP (Chen *et al.*, 2005). Un primer con estructura tallo-asa, que contiene en el extremo 3' seis bases complementarias al miRNA que se desea detectar, es alineado y posteriormente sujeto a retrotranscripción. (b) S-Poly(T) (Kang *et al.*, 2012). Los miRNAs son poliadenilados mediante la poli A polimerasa. La PCR cuantitativa se realiza empleando un primer directo específico, un primer reverso y una sonda TaqMan universal. (c) Ligación de adaptador (Ge *et al.*, 2014). Un adaptador preadenilado es ligado al extremo 3' de los miRNAs, para después realizar síntesis de cDNA por retrotranscripción usando un primer largo. Enseguida se realiza PCR cuantitativa empleando un primer reverso, un primer directo específico para detectar el miRNA y SYBRGreen para la detección fluorescente.

Dada la importancia de contar con métodos adecuados para la cuantificación de miRNAs, se han realizado comparaciones entre las diferentes estrategias. Para esto se han empleado mezclas con concentraciones conocidas de miRNAs sintéticos y se ha evaluado la sensibilidad de la detección, así como el intervalo dinámico en que cada método funciona (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007; Stratford *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2014). Es importante seleccionar el método que se ajuste adecuadamente al espectro amplio de concentraciones en las que los miRNAs se acumulan en plantas. Para esto se requiere evaluar su desempeño en paralelo, e incluso considerar que, en algunos casos, podría ser necesario optimizar su aplicación dependiendo del miRNA bajo estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las modificaciones del clima en México han provocado desequilibrios en el ciclo hidrológico que provocan sequías e inundaciones. Esto ha afectado gravemente la producción de alimentos básicos como el maíz y el frijol en distintos estados de la república mexicana. Mientras las tierras cultivables se inundan y se secan, la producción de granos básicos será menor a las cantidades demandadas, ocasionando que los precios suban y se afecte la calidad de vida y la economía de los mexicanos.

La biotecnología puede proveer soluciones a esta problemática. Una estrategia se enfoca en el mejoramiento de la tolerancia de las plantas a la sequía y a la inundación a través de la manipulación de la expresión de los miRNAs, debido a que estos elementos tienen funciones clave en el desarrollo y en las respuestas a los estímulos ambientales. Para lograrlo es necesario identificar miRNAs de respuesta a ambos tipos de estrés y analizar su expresión para comprender la base de la tolerancia en plantas. Además, se requiere investigar la posibilidad de que los miRNAs puedan participar como nodos o puntos de respuesta cruzada ante el estrés por sequía e inundación. Para esto es fundamental contar con métodos eficientes, sensibles, económicos y de amplio intervalo dinámico que permitan cuantificar la expresión de los microRNAs.

Por lo tanto, en este trabajo se propuso realizar la evaluación de los métodos disponibles para el análisis de expresión de miRNAs, para elegir el de mayor sensibilidad y de rango dinámico y, con éste, investigar los perfiles de expresión de 5 miRNAs que podrían tener funciones clave en la respuesta a ambos tipos de estrés hídrico. Para esto, se empleó a *Brachypodium distachyon*, una planta monocotiledónea modelo con ciclo de vida corto de tres a cuatro semanas, con amplias facilidades para su estudio molecular, con genoma secuenciado que comprende un tamaño de 272 Mb organizado en 5 cromosomas. Con el conocimiento generado se pretende ampliar y profundizar en los aspectos básicos de la función de los miRNAs, para que en un futuro esta información pueda ser aplicada en el mejoramiento de características de valor agronómico en las

plantas, como la productividad de semillas y la tolerancia simultánea a sequía e inundación.

4. HIPÓTESIS

- 1) Los métodos disponibles para el análisis cuantitativo de la expresión presentarán distintos niveles de sensibilidad e intervalo dinámico para la detección de miRNAs en plantas.
- 2) Los miRNAs miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200 se expresan en forma diferencial y establecen puntos de respuesta cruzada al estrés por sequía e inundación en *Brachypodium distachyon*.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y seleccionar un método cuantitativo adecuado para el análisis de expresión de miRNAs y aplicarlo al estudio de los perfiles de expresión diferencial de miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200, durante estrés por sequía e inundación en *Brachypodium distachyon*.

5.1 Objetivos específicos

- 1) Formular muestras con miRNAs sintéticos que reflejen la diversidad de concentraciones naturales de miRNAs presentes en plantas.
- 2) Evaluar 3 métodos para el análisis de expresión de miRNAs: Stem-loop (SL), S-Poli (T) (SPT) y ligación de adaptador (LA), para seleccionar el de mayor sensibilidad e intervalo dinámico.
- 3) Establecer un modelo para el estudio de la respuesta a sequía e inundación en *B. distachyon*.
- 4) Seleccionar y evaluar parámetros fisiológicos de estrés y desarrollo en *B. distachyon* bajo sequía o inundación.

- 5) Analizar la expresión de los miRNAs, miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200 en el estrés por sequía e inundación.

6. METODOLOGIA

6.1 Establecimiento de plantas y tratamientos de estrés

6.1.1 Material vegetal

Se utilizó semillas de la planta modelo *Brachypodium distachyon* del ecotipo Bd21, donadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Éstas fueron sembradas en macetas de 8 cm de diámetro por 6 cm de altura, rellenas con sustrato SunShine #3: Perlita (3:1) enriquecido con fertilizante Nitrofoska 15N-5P-20K a razón de 2 % del peso total, previamente homogenizado y esterilizado a 121 °C durante 1 h en autoclave.

Las plantas se cultivaron en un cuarto de crecimiento a 23 °C, con fotoperiodo de 16 h / 8 h luz / oscuridad, e intensidad de luz a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.1.2 Desinfección de semillas de *B. distachyon*

Se seleccionaron semillas para desinfección de manera superficial, que se colocaron en tubos de plástico cónicos con tapa. En ambiente estéril, se lavaron con 10 ml de etanol al 70 % durante 30 s, seguido por enjuague con agua destilada estéril. Se lavaron enseguida con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.3 % con agitación por cuatro minutos. La solución se decantó y se enjuagó las semillas con agua destilada estéril como mínimo tres veces. Se envolvieron con papel aluminio el tubo con las semillas ya esterilizadas e hidratadas con agua estéril llenadas hasta el tope del tubo. El tubo se guardó en el refrigerador durante cuatro días a 5 °C, para romper la dormancia.

6.1.3 Generación y propagación de plantas de *B. distachyon*

Después de romper la dormancia durante cuatro días, las semillas se sembraron en el cuarto de crecimiento, con el sustrato y las condiciones ambientales mencionadas en el apartado 6.1.1

6.1.4 Tratamientos de estrés

Para analizar los efectos de la aplicación de tratamientos de estrés hídrico, se empleó un diseño de bloques al azar, considerando como variables los tratamientos control, sequía, e inundación. Para los experimentos, se seleccionaron las plantas que mostraron el mismo nivel de desarrollo. La estrategia utilizada fue sembrar todas las semillas en una maceta grande para que todas germinaran y posteriormente seleccionarlas con la misma altura y día de germinación y pasarlas a las macetas pequeñas. Cada maceta tenía cuatro plantas y un peso total de 100 g con la mezcla homogénea (sustrato, perlita y fertilizante). El experimento se desarrolló con tratamientos de sequía (control-sequía), sequía-control, inundación (control-inundación), inundación-control, sequía-inundación y control (control-control). Los tratamientos sequía-sequía e inundación-inundación se eliminaron por dañar a las plantas más allá de los límites planteados en este trabajo. El tratamiento de inundación-sequía se eliminó por exceder la duración de los tratamientos, ya que se requiere mayor tiempo para alcanzar el estrés por sequía tras haberse saturado de agua el sustrato durante la inundación. Los tratamientos se realizaron en la siguiente manera:

- a) CONTROL (condiciones normales de agua todo el tiempo)
- b) SEQUIA (control, luego suspensión del suministro de agua).
- c) INUNDACION (control, luego sumersión de plantas enteras en agua).
- d) INUNDACION-CONTROL (sumersión de plantas enteras en agua, seguido de riego normal).

- e) SEQUIA-INUNDACION (suspensión del suministro de agua, seguido de sumersión)
- f) SEQUIA-CONTROL (suspensión del suministro de agua, seguido de riego normal).

La distribución para llevar a cabo este diseño experimental en cada tratamiento, fue el siguiente (Tabla 2):

Tabla 2: Diseño experimental para los tratamientos aplicados a *B. distachyon*

Tratamientos	Colecta I	Colecta II	Monitoreo/ floración	Total de macetas	Total de semillas
CONTROL	3	3	6	12	48
SEQUIA	0	3	6	9	36
SEQ-INUNDACION	3	3	6	12	48
INUNDACION	0	3	6	9	36
INUND-CONTROL	0	3	6	9	36
SEQUIA-CONTROL	0	3	6	9	36
			<u>TOTAL</u>	60 macetas	240 semillas

Como se indica en la Tabla 2, se utilizaron 9 a 12 macetas según el tratamiento, y cada una contenía cuatro semillas. En total por todo el experimento fueron 60 macetas y 240 semillas. Para la colecta de muestras se cortó la parte aérea de la planta (hojas), se utilizaron tres macetas, de las que se tomaron nueve plántulas en total, dejando las demás macetas y plántulas para observación durante su desarrollo.

Para los tratamientos de sequía (sequía, sequía-control y sequía-inundación; Fig. 6 b, c y e), las plántulas se dejaron de regar hasta que llegaron al peso de 50 g por maceta, lo que representa una pérdida del 50% del peso inicial, manteniendo este peso por cinco días de estrés. Cabe mencionar que estos experimentos estuvieron desfasados por tres días, el estrés de sequía y sequía-control inició a los tres días del estrés de sequía-inundación,

debido a que este último estrés estuvo por tres días en inundación al finalizar su sequía, lo que nos llevó a que las sequias tendrán los mismos días de estrés al momento de la colecta de muestras.

Para el tratamiento de sequía-control, al finalizar el estrés de sequía se llevó a las plantas a las condiciones de control, al igual que el estrés de inundación, que empezaron al mismo tiempo su tratamiento (Fig. 6 b y f). Los controles fueron suministrados con riego durante todo el experimento (Fig. 6 a).

Para los tratamientos de inundación (inundación, inundación-control y sequía-inundación; (Fig. 6 c, d y f), las plantas se colocaron en una tina traslúcida, bajo las mismas condiciones de luz que los controles. Para simular la inundación natural que se produce por la lluvia, el agua de inundación se incorporó a la tina por tiempos de 15 min, para subir el nivel de agua gradualmente de 5 cm, hasta que las plántulas se sumergieron por completo. Este proceso se completó en el lapso de 2 h. Enseguida, se dejó a las plantas en el nivel máximo de sumersión hasta completar un periodo total de tres días. El sistema empleado para la inundación se muestra en la Fig. 7.

Al terminar la inundación por tres días, las plántulas se colectaron bajo el agua y se colocaron inmediatamente en el nitrógeno líquido, con el propósito de no desencadenar otras señales moleculares en las plántulas.

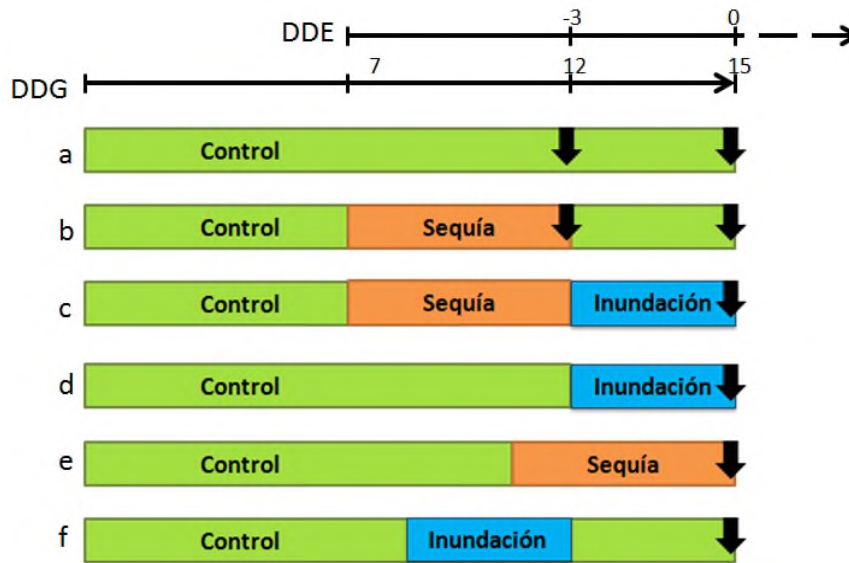


Figura 6. Planeación de los tratamientos de estrés hídrico y las colectas. Con flechas negras se señalan los puntos en los que se realizaron las colectas en el curso del estrés.
DDG: Días después de germinación, **DDE:** Días después del estrés.

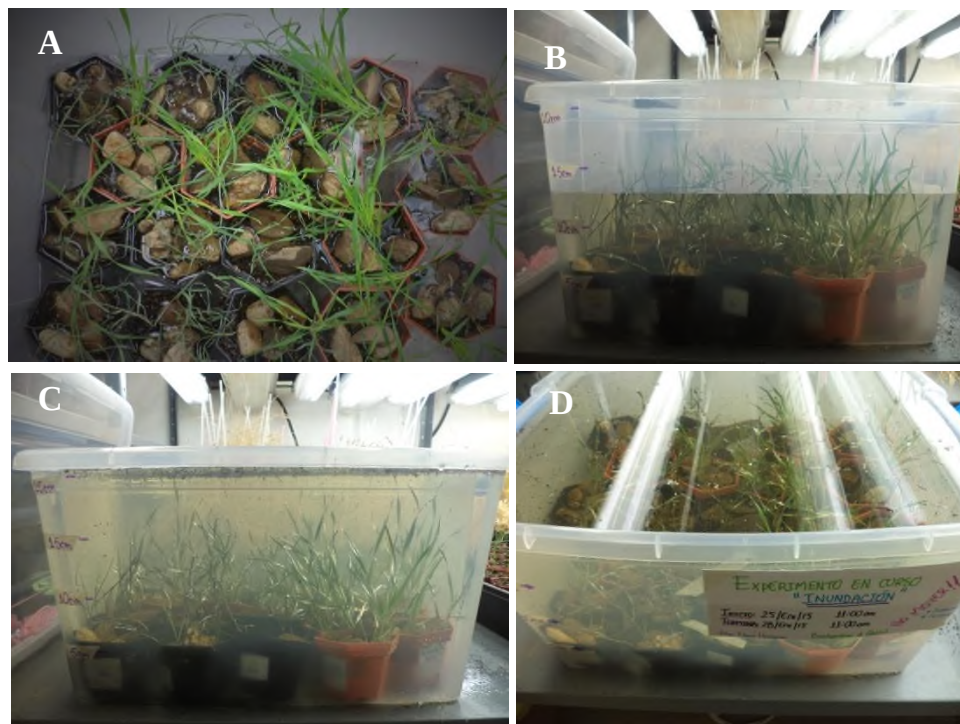


Figura 7. Aplicación del tratamiento de inundación en tina traslúcida, aumentando el nivel de agua de manera gradual hasta cubrir por completo las plántulas de *B. distachyon*. **A.** vista superior de la tina al inicio de la inundación. **B.** Proceso de inundación a la mitad del tiempo completo 10 cm en 1 h. **C.** Proceso de inundación completa 20 cm en 2 h. **D.** Vista superior de la tina al termino de la inundación.

6.1.5 Medición de parámetros de desarrollo, contenido de agua y fluorescencia de clorofila.

Las plantas que no se colectaron se dejaron para monitoreo de las alteraciones del desarrollo producidas por los tratamientos. Todas las plantas se llevaron al mismo peso para asegurar un contenido de agua homogéneo, independientemente del tratamiento al que se sometieron. Con esto se permitió continuar su ciclo de vida y hacer observaciones, especialmente en cuanto se refiere a su proceso de floración.

Para conocer la cantidad relativa de agua en las hojas de las plantas bajo los tratamientos, se tomaron pequeñas muestras de las segundas hojas de las plantas (trozos de hojas de aproximadamente el mismo tamaño y cantidad) en las que se registró el peso fresco (P_f) al momento de la colecta. La muestra se sumergió en un tubo con agua desionizada durante 24 h y posteriormente se sacó el agua del tubo y los trozos de las hojas se secaron en papel absorbente eliminando el agua en la superficie de las hojas y se pesó, para obtener el peso turgente (P_t). Por último, se llevaron las muestras al horno a 70 °C por 48 h, finalmente se obtuvieron los pesos secos (P_s) de las muestras. Se aplicó la siguiente fórmula para determinar el contenido relativo de agua en hojas (CRA) (Barrs y Weatheley, 1968):

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

Donde:

P_f = Peso fresco

P_s = Peso seco

P_t = Peso turgente

La medición de la fluorescencia de clorofila se realizó en los tratamientos de control, y sequia-inundación, minutos antes de la primera colecta, con un fluorómetro portátil (Opti-Sciences OS-30Pt). Se seleccionó al azar una hoja de cada planta colocando un

clip adaptador para aislar de la luz. Se dejaron pasar de 10-15 min para permitir la adaptación de la hoja a la oscuridad y al terminar se midió la fluorescencia de clorofila mediante el cálculo de F_v/F_m (fluorescencia variable máxima/ fluorescencia máxima) con el fin de conocer el nivel de estrés que experimenta la planta.

6.1.6 Recolección del tejido vegetativo

La fecha de recolección se determinó por la manifestación de los síntomas que presentaron las plantas al estrés por sequía. Se observó la fisiología y se colectaron tallos y hojas de las plantas, envolviéndolas en papel aluminio y sumergiéndolas inmediatamente en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento en el ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de la extracción. Los experimentos que estuvieron en inundación en tina se colectaron bajo el agua para no inducir otros tipos de estrés. Las colectas se realizaron en los puntos indicados con flechas en la Fig. 6.

6.2 Extracción de RNA total

Las muestras colectadas y almacenadas a -80°C , fueron pulverizadas con nitrógeno líquido. El polvo fue colocado en tubos Eppendorf previamente etiquetados hasta la marca de 0.5 ml. Al tubo se le adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen, 15596018) y se agitó con vortex. Posteriormente se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente para después agregar 0.2 ml de cloroformo a cada tubo y agitar manualmente por 20 s.

Los tubos se dejaron incubar a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min, en una centrifuga a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La fase acuosa (fase superior) fue separada de la fase orgánica (inferior) y se pasó a un microtubo de 1.5 ml. Se agregó 0.2 ml de cloroformo, se agitó y centrifugó por 20 min a 13,000 rpm a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nuevamente se recuperó la fase superior en un microtubo de 1.5 ml y se agregó 1 ml de isopropanol.

Después de mezclar se dejó por 20 min a temperatura ambiente, seguido por centrifugación por 20 min a 13,000 rpm a 5 °C para facilitar la precipitación del RNA en el fondo del tubo. Se lavó la pastilla precipitada agregando 0.5 ml de etanol al 80 %, preparado con agua de DEPC. Se agitó en vortex y centrifugó por 5 min a 5 °C. Tras decantar la solución de lavado, la pastilla se dejó secar por 15 min a temperatura ambiente para posteriormente resuspenderse en 30-50 µL de agua tratada con DEPC (Apéndice). Los RNAs obtenidos se almacenaron a -80 °C.

El análisis de la concentración y la pureza del RNA total obtenido se determinó con el criterio de Abs 260/280 empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000/2000e. Posteriormente, la integridad de las muestras se analizó en un gel de agarosa desnaturalizante al 1 % (Apéndice) visualizando la intensidad de las bandas de RNA ribosomal. Las muestras se prepararon mezclando en tubos 1 µL de amortiguador de carga de 5X para ARN que contiene bromuro de etidio, 2 µL de muestra de RNA y 2 µL de agua DEPC. Para desnaturalizar, se incubaron las muestras en un termobloque durante 5min. Al término, se transfirieron al hielo, dejándolo reposar por 2 min para después cargarlas en carriles de un gel de agarosa desnaturalizante. La electroforesis se corrió a 60 V empleando como solución de corrida el buffer MOPS 1X (Apéndice).

6.2.1 Tratamiento con DNasa

Las muestras de RNA total fueron tratadas posteriormente con DNasa I, libre de RNasa (ThermoScientific, EN0525). para eliminar cualquier resto de DNA. Para comenzar con la digestión se tomaron 12 µg de RNA extraído se y se le agregó 12 µl de Buffer DNasa, 12 µl DNasa y 84 µl de H₂O, la mezcla se llevó a incubar por 37 °C por 30 min. Se colocó en cada tubo 500 µl de TRIzol y se agitó por 20 seg en vortex, se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente, agregando 100 µl de cloroformo agitando por 20 seg. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min centrifugando 13,000 rpm por 15 min a 5 °C, se separó y mezcló con 500 µl de isopropanol y se agitó manualmente, después se incubó por 20 min a temperatura ambiente, las muestras se

centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 20 min a 5 °C, se verificó la pastilla en el fondo, decantando y lavando con 250 µl etanol al 80 % con agitación vortex y centrifugando por 5 min a 5 °C, se decantó la solución de lavado y verificó la pastilla pegada al tubo, dejando los tubos inclinados a temperatura ambiente, por último se resuspendieron las pastillas en 10µl con agua de DEPC almacenándolos a -20°C.

6.3 Ensayos para evaluar las estrategias de PCR cuantitativa

Para seleccionar el mejor método cuantitativo de la expresión de miRNAs, se realizaron pruebas con dos tipos de muestras:

MUESTRA A: miRNA sintético. Se prepararon diluciones de un miRNA sintético, de secuencia conocida, para obtener concentraciones específicas, desde 10 hasta 0.0001 µM.

MUESTRA B: miRNAs de concentración desconocida en RNA total. Se prepararon diluciones de RNA total y se realizaron ensayos para determinar la abundancia de dos miRNAs naturalmente presentes en la muestra.

Las muestras A y B fueron analizadas con los tres métodos de PCR cuantitativa, de la siguiente manera:

1) Stem-Loop (SL). Se siguió el protocolo de Chen *et al.* (2005), con modificaciones a las secuencias de oligonucleótidos originales. Se emplearon oligonucleótidos Stem-Loop diseñados para complementar las 6 últimas bases del miRNA sintético, o de los miRNAs naturales en cuestión, dependiendo de que se trate de la muestra A o la muestra B. Se procedió a la reacción de retrotranscripción de forma individual para cada miRNA. Las reacciones de retrotranscripción se prepararon como se indica más adelante, empleando diluciones del miRNA sintético a 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 o 0.0001 µM para el caso de la muestra A, o 0.25, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 o 0.00001 µg de RNA total para la muestra B.

2) S-Poli (T) (SPT). Se realizó siguiendo el protocolo de Kang *et al.* (2012). Para esto, previo a la retrotranscripción se llevó a cabo la poliadenilación de las muestras de miRNA sintético y de RNA total en reacciones de 10 μ L, que contenían 1 μ L de dilución de miRNA sintético (100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 μ M), o 1 μ L de RNA total (2.5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 μ g/ μ L), 1 μ L de buffer de reacción 10X, 1 μ L de ATP 10 mM, 1U de Poli (A) polimerasa, y agua hasta completar 10 μ L (New England Biolabs). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 min, seguido de la inactivación de la enzima en 65 °C por 5 min.

3) Ligación de adaptador (LA). Se realizó con el protocolo propuesto por Qinyu *et al.*, (2014) con algunas modificaciones. Para esta prueba se emplearon dos adaptadores por separado: adaptador L1, que posee una secuencia conocida en toda su longitud, y adaptador 4N, que posee secuencia conocida hacia el extremo 3' y cuatro bases degeneradas en el extremo 5'. En ambos casos los adaptadores están preadenilados en el extremo 5' y su extremo 3' se encuentra bloqueado para evitar la autoligación. Para ambos tipos de adaptadores, previo a la retrotranscripción se llevó a cabo la ligación del adaptador a las muestras A y B. Para esto se mezclaron en un tubo 1 μ L de dilución de miRNA sintético (100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 μ M), o 1 μ L de RNA total (2.5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 μ g/ μ L), con 1 μ L de adaptador (L1 o 4N, 1 μ M). La mezcla se incubó a 70 °C durante 2 min, y se enfrió inmediatamente en hielo. A la mezcla se le agregó 1 μ L de buffer de reacción 10 X sin ATP, 1 μ L de DMSO, 200 U de T4 RNA ligasa 2, troncada (New England Biolabs), y agua hasta completar 10 μ L. La reacción se incubó a 25 °C durante 60 min.

6.3.1 Retrotranscripción

Después de las reacciones de poliadenilación y ligación, todas las muestras fueron ajustadas a la misma concentración. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a

cabo en un volumen total de 10 μ L, empleando para cada caso 1 μ L de RNA (miRNA sintético o RNA total, a las concentraciones indicadas para el caso de Stem-Loop; o miRNA sintético o RNA total producto de las reacciones de poliadenilación para el caso de S-Poli (T); o miRNA sintético o RNA total producto de las reacciones de ligación para el caso de Ligación de Adaptador). El resto del procedimiento se realizó empleando el kit TaqMan miRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos que se emplearon en las reacciones de retrotranscripción para esta etapa del trabajo se diseñaron para que los cDNAs producidos con los tres métodos contengan fragmentos de secuencia común para que pueda unirse una sonda TaqMan. Los oligonucleótidos diseñados se enlistan en la Tabla 3.

6.3.2 PCR cuantitativa

Para la cuantificación se empleó una sonda Taqman universal que reconoce la secuencia común de los cDNAs generados por los tres métodos. Para los ensayos de PCR cuantitativa se realizaron reacciones de 20 μ L, empleando el kit TaqMan miRNA (Applied Biosystems) o el kit Maxima Probe qPCR Master Mix (2 x) No ROX (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las reacciones se realizaron en un equipo PikoReal (Thermo Scientific) programado para detectar fluorescencia emitida por el fluoróforo FAM durante el curso de la reacción de PCR. Los productos obtenidos fueron resueltos en un gel de acrilamida al 6 % (Apéndice) para verificar la amplificación de un producto único del tamaño esperado. Los oligonucleótidos y la sonda diseñados para la PCR cuantitativa se enlistan en la Tabla 3.

En la Fig. 8 se esquematiza el diseño y las adaptaciones de los métodos que se emplearon para cuantificar la expresión de los miRNAs en este trabajo.

6.3.3 Evaluación de la sensibilidad de los métodos

Los datos cuantitativos que se obtuvieron de la PCR, expresados como Cq (ciclo de cuantificación o ciclo umbral), se analizaron para identificar el método o métodos que permitieron la detección de cada miRNA al Cq más bajo en sus diferentes diluciones.

Adicionalmente, se verificó la posibilidad de realizar la síntesis del cDNA para el análisis de más de un miRNA en la misma reacción. Para esto se preparó una mezcla de primers stem-loop (primerMIX), para analizar la respuesta de los métodos, realizándose de la siguiente manera: el primerMIX se preparó mezclando los primers SL para los 5 miRNAs bajo estudio, a concentración final de 0.5 μ M. Esta mezcla se incluyó en el paso de retrotranscripción (en lugar de colocar solo un primer específico), y se siguió el procedimiento con las temperaturas y reactivos indicadas previamente. El cDNA multiplex se empleó para realizar las reacciones de qPCR en la manera indicada previamente, en reacciones independientes para cada miRNA específico.

6.3.4 Evaluación del intervalo dinámico

Para cada método se observó la eficiencia en la detección de concentraciones decrecientes de miRNA sintético y de miRNAs a partir de RNA total, mediante la obtención de la gráfica de correlación lineal y el cálculo de R^2 . Se analizó el intervalo de concentraciones a las cuales cada método permitió obtener mediciones confiables, y se identificó aquel que detectó el intervalo más amplio de concentraciones de miRNAs.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos diseñados.

Oligonucleótidos para la retrotranscripción (5'-3')	
miRNA sintético	GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
RT Stem-loop (miRNA sintético) miR1	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTGATCGT
RT Stem-loop (miRNA 156)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTGTGCTC
RT Stem-loop (miRNA 159)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTAGAGCT
RT Stem-loop (miRNA 166)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTGGGGAA
RT Stem-loop (miRNA 172)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTATGCAG
RT Stem-loop (miRNA 528)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTCTCCTC
RT Stem-loop (miRNA 5200)	AAATTGCCCAGGTGGCGCGCAGGGTCCGAGGT CAGAGCCAC CTGGGCAATTTAAGCCT
RT S-Poli(T) (miRNA sintético) miR1	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATAT CAGAGCCACCTGGGCAATT TTTTTTTTTGATCGT
RT S-Poli(T) (miRNA 156)	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATAT CAGAGCCACCTGGGCAATT TTTTTTTTTGCTC
RT S-Poli(T) (miRNA 159)	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATAT CAGAGCCACCTGGGCAATT TTTTTTTTTAGAGCT
Linker 4N (degenerado)	rAppNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
Linker 1 (no degenerado)	rAppCTGTAGGCACCATCAATC
RT 4N	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATAT CAGAGCCACCT GGGCAATTTGCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
RT linker	CAGTGCAGGGTCCGAGGTATAT CAGAGCCACCT GGGCAATTTGATTGATGGTGCCTACAG
Oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa (5'-3')	
miRNA sintético Directo (miR1)	CAGTTCAGAGTTCTACAGTCCG
miRNA 156 Directo	GCGCGGGTTGACAGAAGAGAGC
miRNA159 Directo	CGGCTGCGTTTTGGATTGAAGGG
miRNA166 Directo	GTGACTCGGACCAGGCTTCA
miRNA172 Directo	TGCCAGTCCGAGAATCTTGATGATG
miRNA 528 Directo	ACGATGGAAGGGGCATGCA
miRNA 5200 Directo	AGCCCCACCTTGTAGATACTCCCTA
PCR universal Reverso (S-PolyT y Ligación de Adaptador)	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
PCR Stem Loop Reverso	GTGGCGCGCAGGGTCCG
Sonda TaqMan universal	5-FAM/CAGAGCCAC/ZEN/CTGGGCAATTT/3IABkFQ

En negritas se señala el sitio de reconocimiento de la sonda TaqMan universal.

6.4 Ensayos de expresión de los miRNAs miR156, miR159, miR172, miR528 y miR5200 por PCR cuantitativa

De acuerdo al análisis de métodos, se eligió el de mayor sensibilidad y amplio intervalo dinámico y se aplicó a la detección de los cinco miRNAs en muestras de *B. distachyon* bajo los diferentes tratamientos de estrés hídrico. Se empleó a miRNA166 como control constitutivo de expresión, de acuerdo a Pulido-Barajas (2014, tesis de licenciatura). La expresión de los miRNAs en respuesta al estrés se cuantificó con el método $\Delta\Delta C_T$. De acuerdo a la siguiente fórmula (Livak y Schmittgen, 2001).

$$ER=2^{-(\Delta\Delta C_T)}$$

Donde $\Delta\Delta C_T = (C_{t_{miRNAproblema}} - C_{t_{miRNAconstitutivo}})_{seq} - (C_{t_{miRNAproblema}} - C_{t_{miRNAconstitutivo}})_{control}$

6.5 Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los parámetros fisiológicos de estrés se calcularon las medias y desviaciones estándar. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante la prueba t de Student con $p < 0.05$. Para el análisis de los métodos de qPCR, se empleó la misma estrategia. El primer análisis se realizó entre los métodos de qPCR (Stem-loop y S-PolyT) y las concentraciones de nuestra muestra sintética (miRNA sintético: MIR1) mediante la prueba t de Student, para $p < 0.05$. Enseguida, se analizó la capacidad de cada método para detectar significativamente las diferencias de concentración del miRNA sintético. El siguiente análisis que se realizó fue para evaluar los métodos de qPCR (SL y SPT) con las concentraciones de muestras de RNA total identificando dos miRNAs (miR156 y miR159).

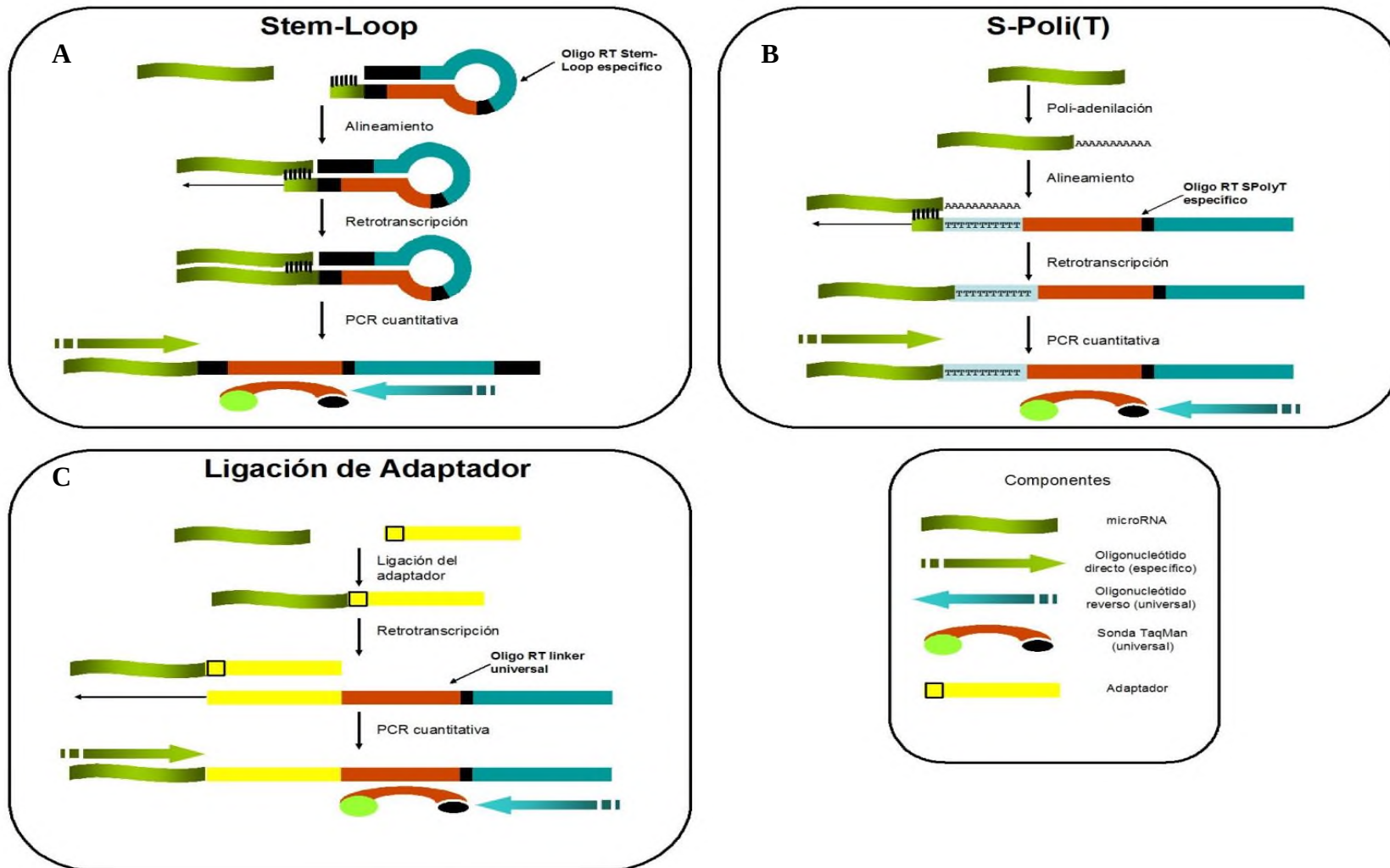


Figura 8. Representación de los métodos de PCR cuantitativa de miRNAs y su adaptación para el empleo de una sonda TaqMan universal común a los tres métodos. **A.** Stem-Loop, **B.** S-PolyT, **C.** Ligación de adaptador.

7. RESULTADOS

7.1 Inducción de estrés y medición de parámetros fisiológicos

Los diferentes tratamientos de estrés aplicados en este trabajo produjeron síntomas en *B. distachyon*. El tratamiento de sequía produjo síntomas que se manifestaron como la intensificación aparente del color verde, así como marchitamiento y enrollamiento de las hojas, tal como puede apreciarse en la Fig. 9.

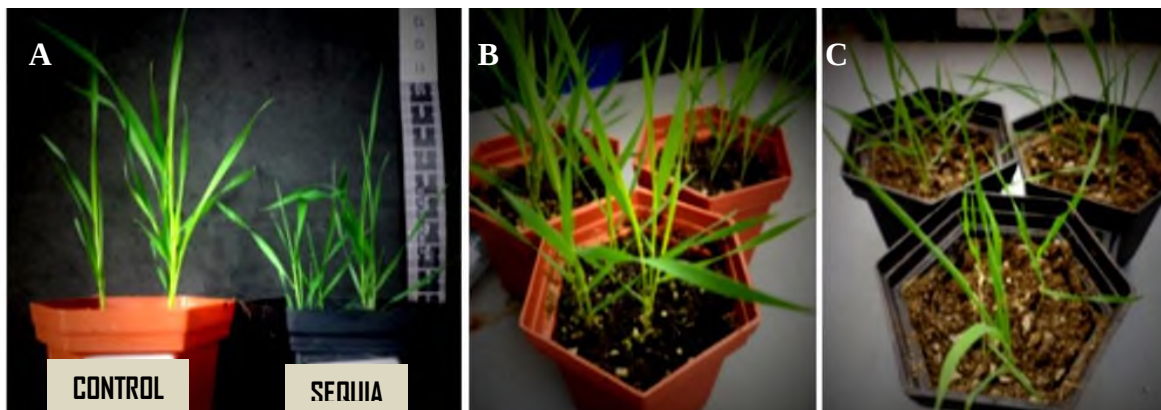


Figura 9. Plantas de *B. distachyon*. Bd21, en condiciones normales y estrés por sequía. Se observa el cambio en la tonalidad verde, y el marchitamiento y enrollamiento de las hojas, lo que se correlaciona con las condiciones de humedad en el sustrato. **A.** Vista frontal de comparación de tamaño en plantas de control y sequía, **B.** Vista superior de plantas control, **C.** Vista superior de plantas en sequía.

A los 4 días de suspensión de riego, las plantas en estrés por sequía que iniciaron en un peso de 100 gr por maceta, llegaron a un peso de 50 gr aproximadamente y se agregaba agua para tenerlas por otros 4 días en peso neto de 50 gr por maceta con la finalidad de mantener el estrés de manera controlada, y con el propósito de no arriesgar las plantas a un estrés extremo que las indujeran a la programación de muerte.

Posteriormente, terminando el tratamiento de estrés por sequía, se realizó al azar la primera colecta de los tratamientos de sequía-inundación (sin pasar aun por inundación), y del control, y a la par se tomaron muestras para determinar el contenido relativo de agua en hojas, a fin de conocer el estado de hidratación de las plantas. Al realizar los

registros del contenido relativo de agua en hojas, se encontró que las plantas con tratamiento de estrés por sequía presentaban déficit hídrico en comparación con las plantas control (Fig. 10).

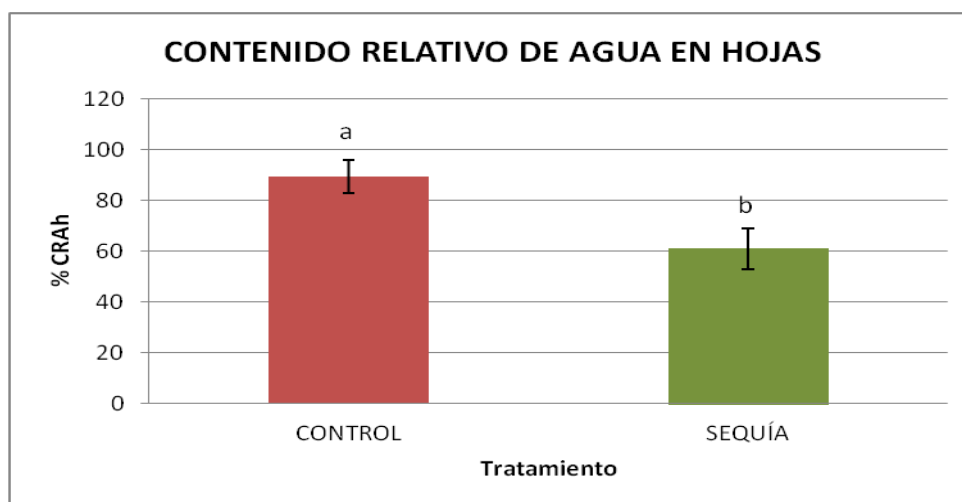


Figura 10. Contenido relativo de agua en hojas en condiciones de estrés por sequía y control en plantas de *B. distachyon*. Las barras negras indican la media $\pm$ DS. Las letras distintas indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$).

En el caso de las plantas que se sometieron a los tratamientos de inundación, durante las primeras horas desarrollaron pequeñas burbujas de aire adheridas a las hojas, como se observa en la imagen (Fig. 11).

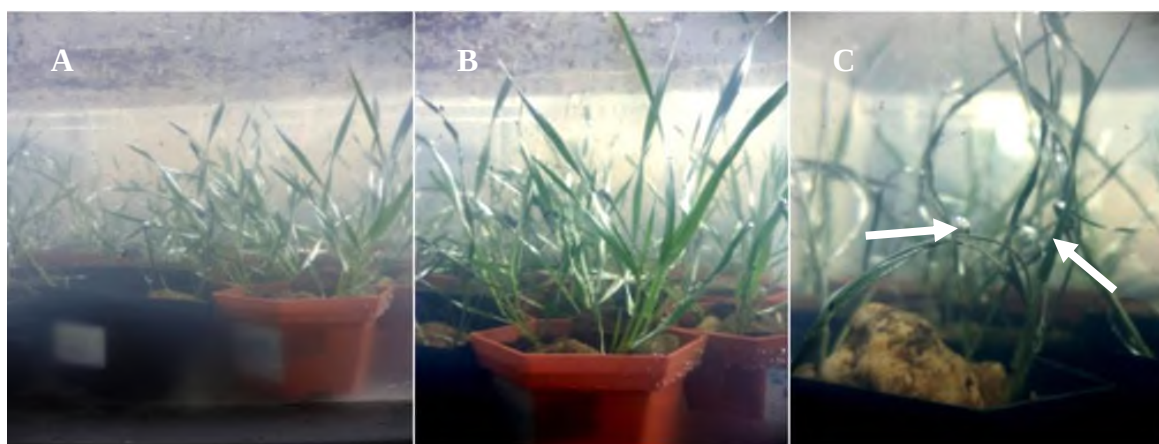


Figura 11. Plántulas de *B. distachyon* en sumersión, después de 3-4 h aproximadamente se observan formación burbujas en las hojas. **A.** Plantas de sequía-inundación e inundación. **B.** Plantas de inundación, **C.** Plantas de sequía-inundación. Las flechas blancas señalan las burbujas.

Otro parámetro analizado en las plantas en estrés fue la fluorescencia de clorofila. Como resultado de estos análisis, se encontró que, en general, no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de estrés en las plantas estudiadas cuando se comparan con el control, excepto en las plantas tratadas con estrés consecutivo de sequía e inundación. En la Fig. 12 se muestran los datos de fluorescencia de clorofila obtenidos para los tratamientos en *B. distachyon*.

La fluorescencia de clorofila se ha empleado con éxito para cuantificar el nivel de daño causado por la sequía en *Brachypodium* (Luo *et al.*, 2011). Por tal razón, previamente en el laboratorio se han realizado mediciones de fluorescencia de clorofila en plantas de sorgo, *Brachypodium*, arroz y maíz bajo sequía crónica. Sin embargo, no se logró observar diferencias en este parámetro que puedan asociarse al estrés (Pulido-Barajas, 2014). Es probable que se requieran niveles de estrés más extremos para lograr detectar diferencias, fuera de los límites que se plantearon para este trabajo.

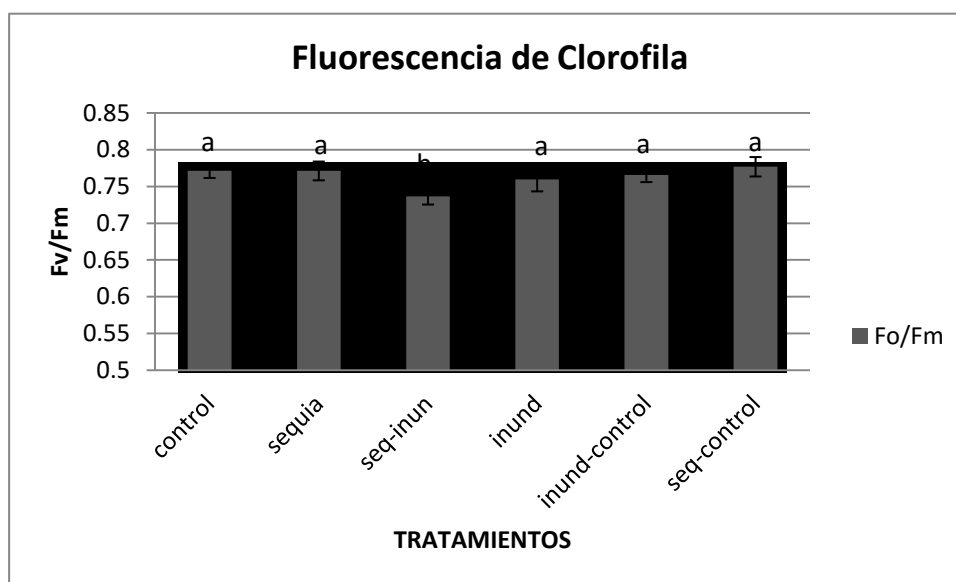


Figura 12. Fluorescencia de clorofila en las plántulas de *B. distachyon*. Las barras negras indican la Media $\pm$ DS. Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre cada tratamiento y el control, de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$).

Después de haber realizado todas las colectas de los diferentes tratamientos en estrés, se dejaron algunas macetas en observación para monitorear el tiempo a floración y la producción de flores, encontrando los resultados que se muestran en la Fig. 13. Las

plantas sometidas a tratamientos únicos de sequía o inundación, a tiempo final (Fig. 13, gráficos D y E) mostraron diferencias en el tiempo a floración y en producción de flores. Las plantas en tratamiento de sequía fueron las primeras en desarrollar flores, a los 10 DDE (Días Después del Estrés) (Fig. 13, gráfica E). En contraste, las plantas sometidas al tratamiento de inundación mostraron las primeras flores hasta los 15 DDE (Fig. 13, gráfica D). Analizando estos resultados, se puede observar que los tratamientos de estrés por sequía tienden a mostrar un escape a la floración, con una diferencia de 5 días comparándola con el control. Además, se observa que las plantas que se sometieron al estrés por sequía acumularon mayor número de flores que las de inundación.

Analizando los efectos de los tratamientos en la Fig. 13, gráficas B, C y D, puede observarse que cuando se realiza el tratamiento de sequía, sin combinación con inundación (Fig. 13, gráfica B), las plantas presentan un comportamiento similar al control desde los 20 DDE (Fig. 13, gráfica A) en cuanto a tiempo a floración y número de flores acumuladas. En cambio, las plantas sometidas a inundación sin exposición previa a sequía (Fig. 13, gráfica D), si bien no alteran su tiempo a floración, sí disminuyen el número de flores acumuladas. Cuando la planta es sometida a estrés por sequía seguida de inundación (Fig. 13, gráfica C), se mantiene el tiempo a floración, pero el número de flores acumuladas es intermedio, lo que sugiere un equilibrio entre los efectos de la sequía y la inundación para este parámetro.

Cuando la inundación se realizó en etapas más tempranas del desarrollo vegetativo, como en el caso del tratamiento de inundación-control (Fig. 13, gráfica F), los efectos del tratamiento en términos de tiempo a floración y número de flores acumuladas se presentaron más marcados con un atraso en tiempo a floración de 20 DDE y baja producción de flores.

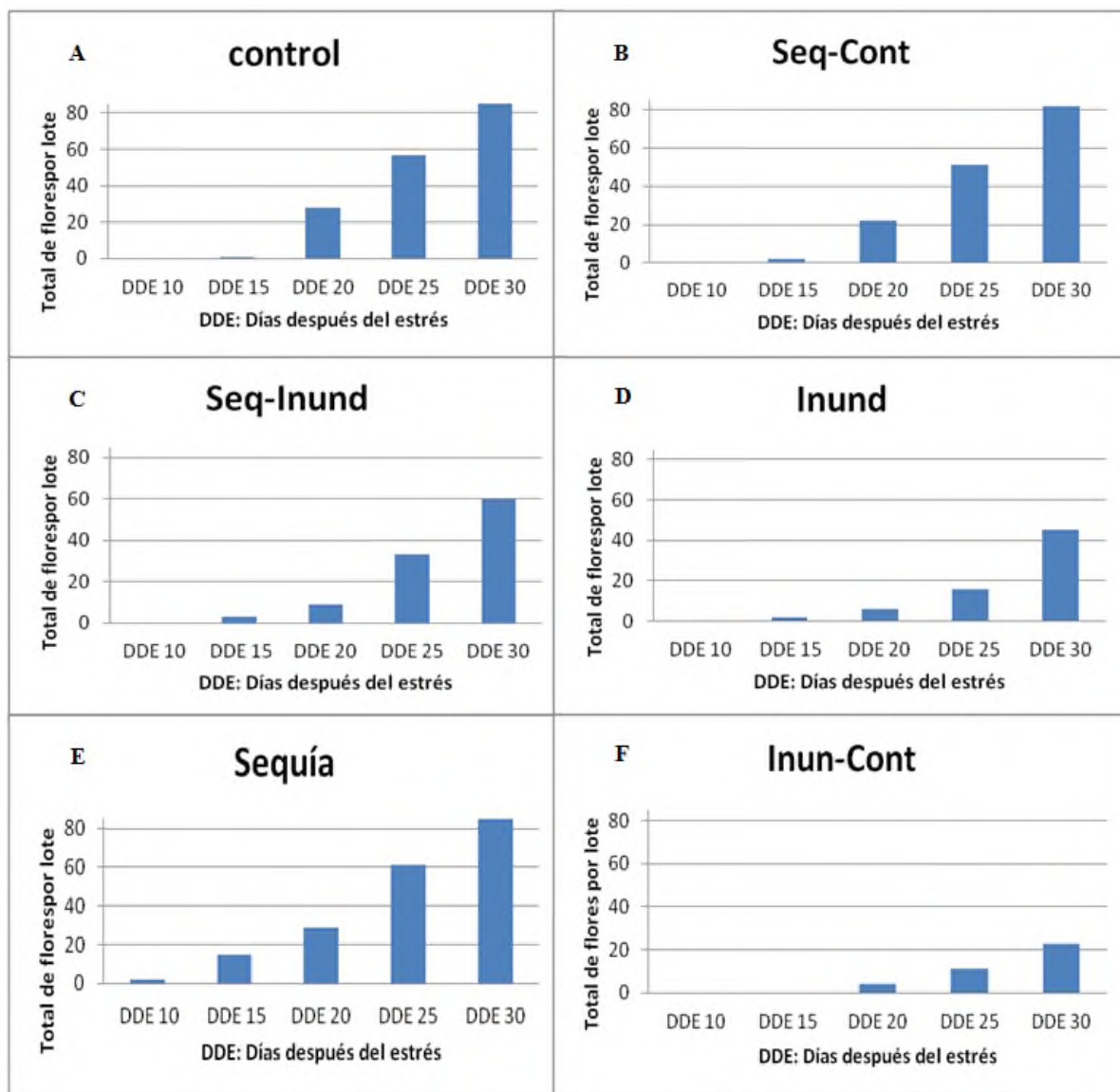


Figura 13. Tiempo a floración y número de flores acumuladas por tratamiento en días después del estrés (DDE), en las plántulas de *B. distachyon*. Las flechas negras indican el momento de las colectas. **A.** Control, **B.** Sequía-control, **C.** Sequía-inundación, **D.** Inundación, **E.** Sequía, **F.** Inundación-control.

En la Fig. 14 se muestran las plantas de *B. distachyon*, en sus diferentes etapas de desarrollo y durante los tratamientos y la recuperación del estrés, hasta llegar a la etapa de floración, además se observa el crecimiento de las plántulas y follaje según sea el tratamiento, antes y después del estrés.



Figura 14. Tratamientos antes y después del estrés, hasta llegar a la floración, en días después de germinación (DDG) y días después del estrés (DDE) en *B. distachyon*. 1. Control, 2. Sequía-inundación, 3. Sequía-control, 4. Inundación, 5. Sequía, 6. Inundación-control.

De acuerdo a lo que se muestra en el panel A de la Fig. 14, después de 12 DDG, las plantas que se sometieron a los tratamientos iniciales de sequía mostraron síntomas típicos de estrés por déficit hídrico, tales como la reducción de tamaño y número de hojas (macetas 2, 3 y 5). Cuando transcurrieron 14 DDE, durante el periodo de recuperación después del estrés, las plantas continuaron mostrando los efectos causados por el estrés por sequía previo (panel B). Adicionalmente, en las plantas que se sometieron al tratamiento de inundación (macetas 2, 4 y 6) se pudo apreciar una tendencia a reducir la estatura y a ampliar el ángulo de inclinación de las hojas con respecto al tallo. Cuando las plantas en recuperación avanzaron en su ciclo de vida, se manifestaron los efectos de los tratamientos sobre la floración (Panel C), cuya cuantificación se presentó en la Fig. 13. Las plantas sobre las que se aplicó el tratamiento de inundación mostraron un atraso en la floración y/o menor producción de flores al tiempo 30 DDE (macetas 2, 4 y 6), con respecto al control (maceta 1), mientras que las que se sometieron a sequía (macetas 3 y 5) mostraron formación de flores. En el caso de las plantas que fueron tratadas consecutivamente con ambos estreses (maceta 2), se redujo la producción de flores, prevaleciendo los efectos combinados de la inundación y la sequía, tal como se discutió previamente.

7.2 Extracción de RNA

La integridad de los RNAs totales extraídos de plantas sometidas a los tratamientos se verificó por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa al 1% (Fig. 15). Se identificaron las bandas de RNAs ribosomales 25S y 18S, como prueba de ausencia de degradación aparente. Posteriormente, se midió la concentración y pureza de los RNAs (cercana a 2), con lo que se confirmó la obtención de diversos rendimientos de RNA. Aunque algunas muestras presentaron concentraciones bajas de RNA (Fig. 15), fueron suficientes para proceder con los procedimientos subsecuentes.

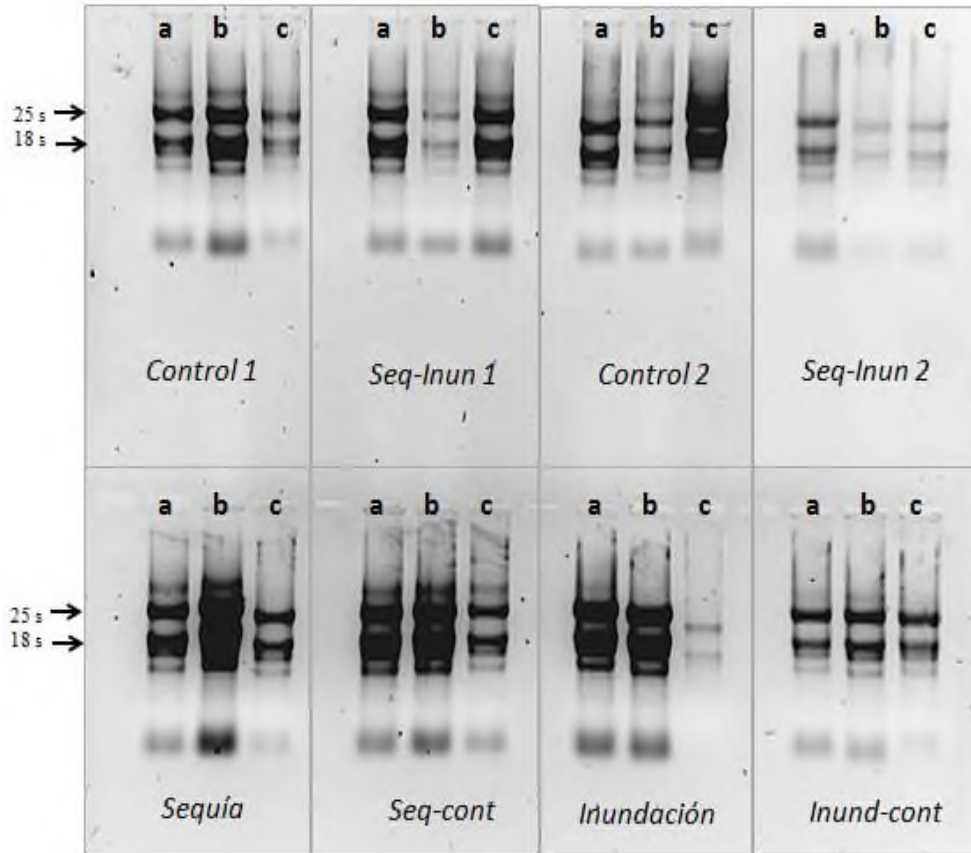


Figura 15. Gel de agarosa desnaturizante al 1%, donde se observan las extracciones de RNA con TRIZOL en cada tratamiento, por triplicados (**a**, **b** y **c**), visualizando la integridad de las bandas ribosomales.

7.2.1 Tratamiento con DNasa

La digestión del DNA en muestras de RNA es un procedimiento recomendado para eliminar restos de DNA previo a cualquier análisis de expresión, ya que su presencia puede subestimar la cantidad de RNA en la muestra y, en ciertos casos, pueden participar en las reacciones y enmascarar la expresión de los RNAs. Las muestras de RNA total se trataron con DNasa y posteriormente se realizó un gel de agarosa para verificar nuevamente su integridad. En la Fig. 16 se observa la electroforesis de muestras representativas de cada tratamiento. El análisis de concentración reveló concentraciones desde 0.3 µg hasta 0.8 µg para las muestras.

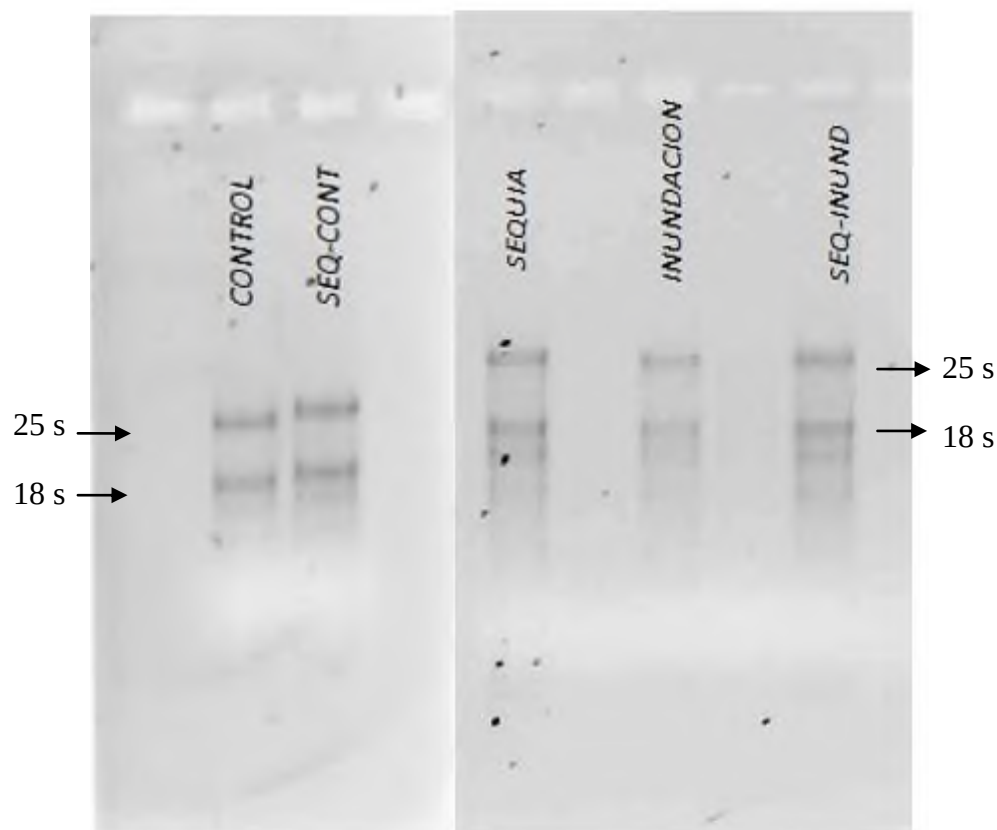


Figura 16. Gel de agarosa para verificar la integridad y pureza de las muestras después de ser tratadas con DNasa.

7.3 Evaluación de las estrategias de los métodos para PCR cuantitativa

7.3.1 PCR cuantitativa y evaluación de la sensibilidad de los métodos

El primer ensayo, donde se evaluaron los tres métodos SL, SPT y LA (con sus dos variantes 4N y L1), con el primer sintético diseñado a diferentes concentraciones, reveló que los métodos SL y SPT presentan el mejor rendimiento con una amplia gama dinámica a lo largo de las concentraciones ensayadas. En la Fig. 17 se muestran los resultados del análisis. Aunque SL y SPT produjeron una buena correlación entre las

concentraciones del primer sintético y los valores de Cq, y amplio rango dinámico, el método SPT mostró la mayor correlación, con un valor de $R^2=0.9835$ (Fig 17B).

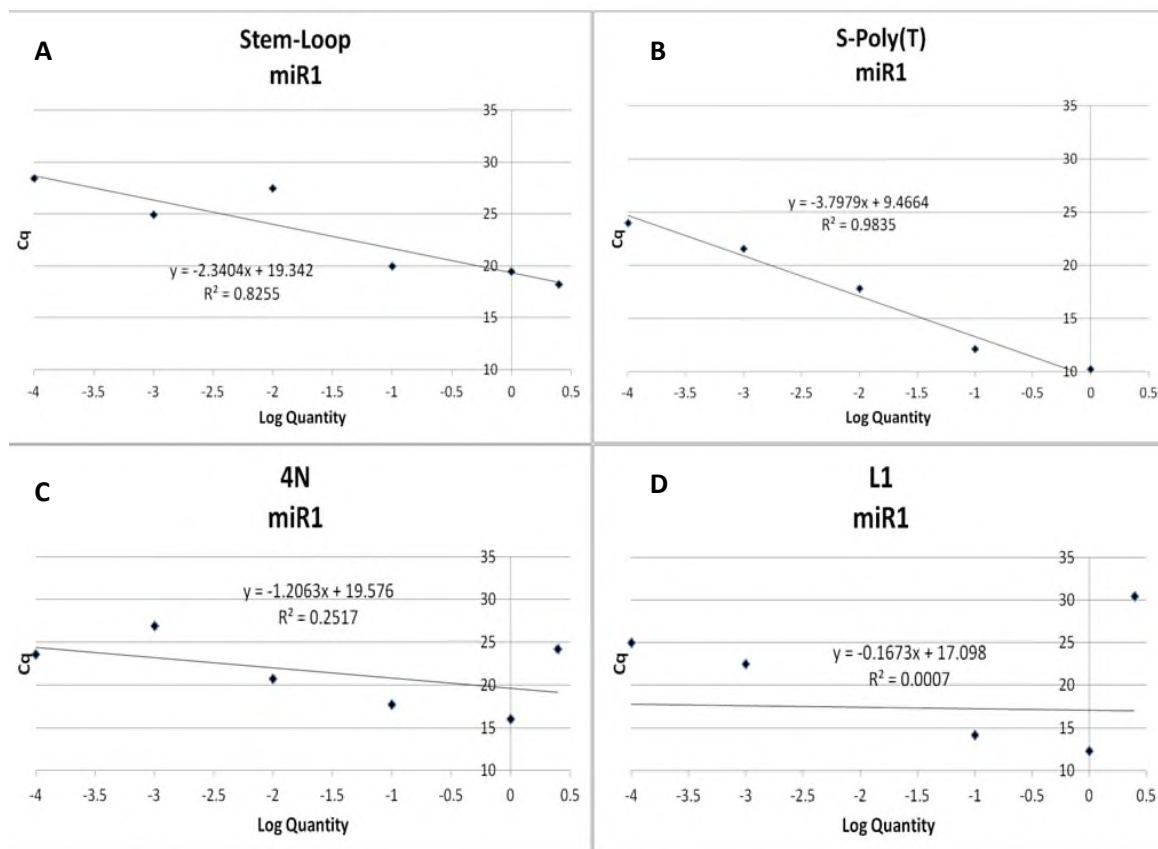


Figura 17. Rango dinámico y sensibilidad de los métodos para el análisis cuantitativo para miR1. **A.** Stem-loop, **B.** S-Poly(T), **C.** LA(4N) y **D.** LA(L1).

El método LA mostró perfiles que no se correlacionaron con la concentración de oligonucleótido de MIRNA sintético, por lo que no pudo determinarse su rango dinámico ni su sensibilidad. A pesar de esto, todos los métodos produjeron un solo producto de qPCR cuando se analizaron por electroforesis (Fig. 18). En el caso del método LA, es evidente que se obtienen productos del mismo tamaño, aunque éstos parecen ser inespecíficos ya que no corresponden a la concentración de RNA sintético presente en las reacciones.

Los métodos ST y SPT se analizaron para identificar al que permitiera la mayor sensibilidad de detección del miRNA sintético (miR1) en sus diferentes diluciones, desde 10 μ M hasta 0.0001 mM. En la Fig. 19 se puede observar que en las dos primeras diluciones (las concentraciones más altas de miR1) de los métodos existen diferencias en la obtención del Cq más bajo. Por ejemplo, en la concentración de 1 μ M el Cq más bajo detectado fue para el método de SPT, mientras que en la siguiente dilución de concentración 0.1 μ M el método de SL fue el que detectó el Cq más bajo. Analizando las gráficas obtenidas por el equipo de qPCR (Fig. 21), donde se incluye la concentración de 10 μ M, se observa que entre las tres primeras diluciones en el método de SPT, la concentración 10 μ M se superpone con la concentración 0.1 μ M, mientras que el método de SL entre las dos primeras concentraciones, 10 μ M se superpone con 1 mM. Esto indica que ambos métodos tienden a saturarse cuando las concentraciones de RNA son altas, dificultando la cuantificación adecuada de los miRNAs. De igual manera, cuando las concentraciones son muy bajas (p. ej. .00001 μ M) se pierde la correlación, por lo que estos métodos también presentan un límite mínimo de concentración para obtener una cuantificación adecuada.

Aunque ambos métodos tienen buena correlación, mostrando valores de Cq que corresponden a la concentración del miRNA sintético, presentan diferencias en la detección, tal como puede observarse en la Fig. 19, donde el método SL detecta al miRNA sintético a Cq más bajos que SPT, con diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, SL es el método más sensible.

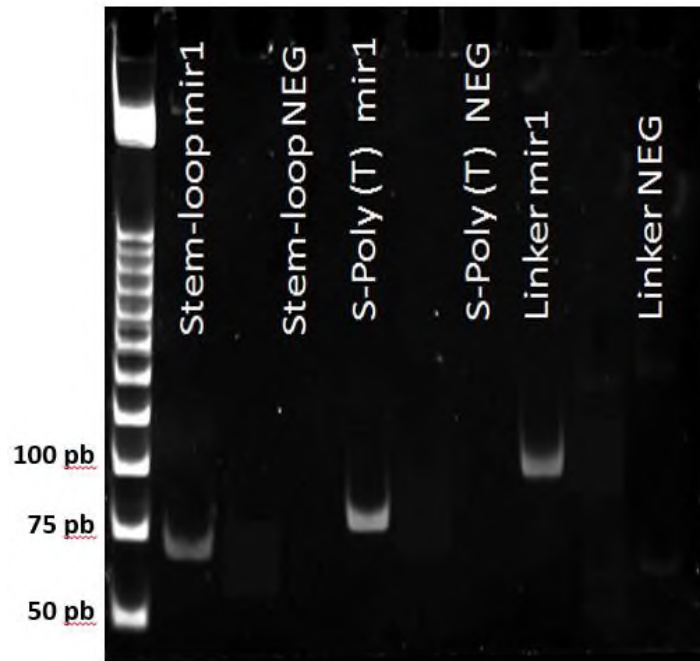


Figura 18. Verificación de productos obtenidos empleando tres métodos de PCR cuantitativa con el primer sintético. Gel de acrilamida al 6%. En el primer carril se muestra el ladder 25bp DNA step (Promega) como referencia de peso molecular.

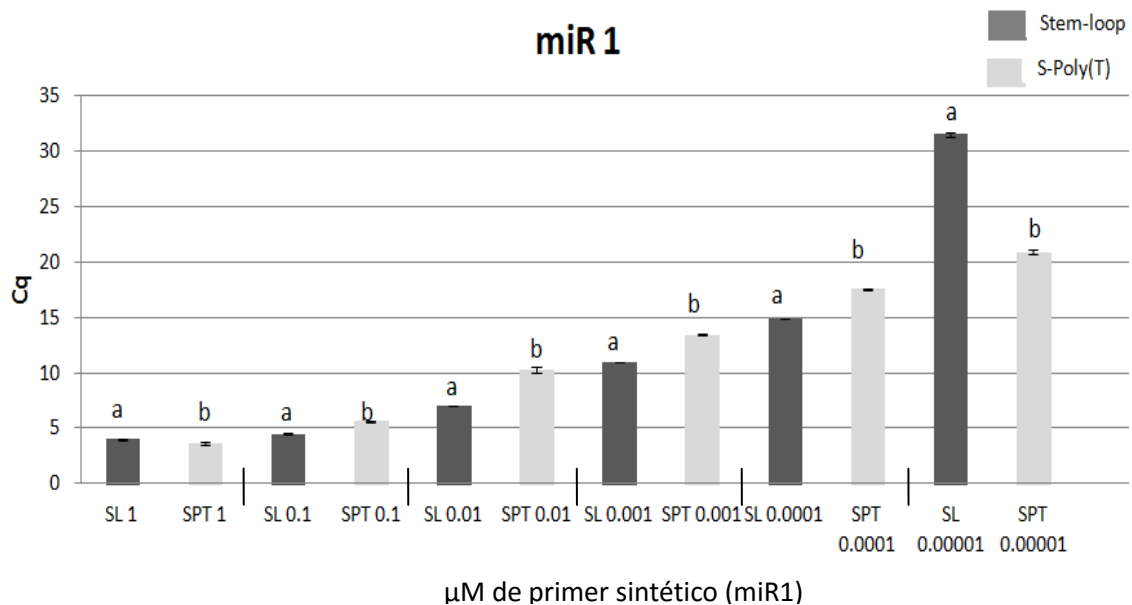


Figura 19. Valores de Cq para los métodos SL y SPT con sus diferentes diluciones. Las letras diferentes expresan diferencias significativas comparando entre métodos para cada dilución, de acuerdo a la prueba t de Student, con significancia $p < 0.05$. Medias $\pm$ DS (indicadas con barras negras).

En la Fig. 20 se presenta una comparación de la cuantificación del miRNA sintético a diferentes concentraciones. Puede observarse que el método SL falla en detectar diferencias entre las concentraciones más altas del miRNA sintético (1 y 0.1 μ M), por lo que satura a altas concentraciones. Esto sugiere que el método SL podría no ser el más adecuado para cuantificar miRNAs altamente abundantes. Sin embargo, es el método de mayor sensibilidad.

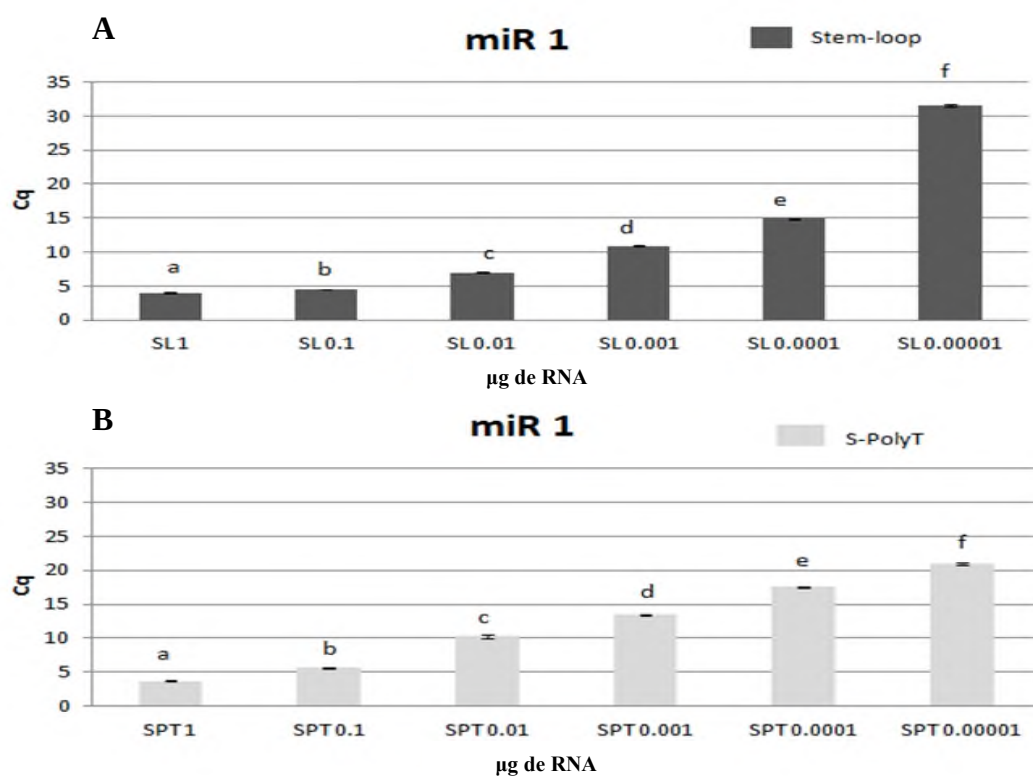


Figura 20. Valores de Cq para los métodos SL y SPT con sus diferentes diluciones. Las letras diferentes expresan diferencias significativas comparando entre diluciones para cada método con diferencias estadísticas significativas de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$). Media $\pm$ DS (indicadas con las barras negras).

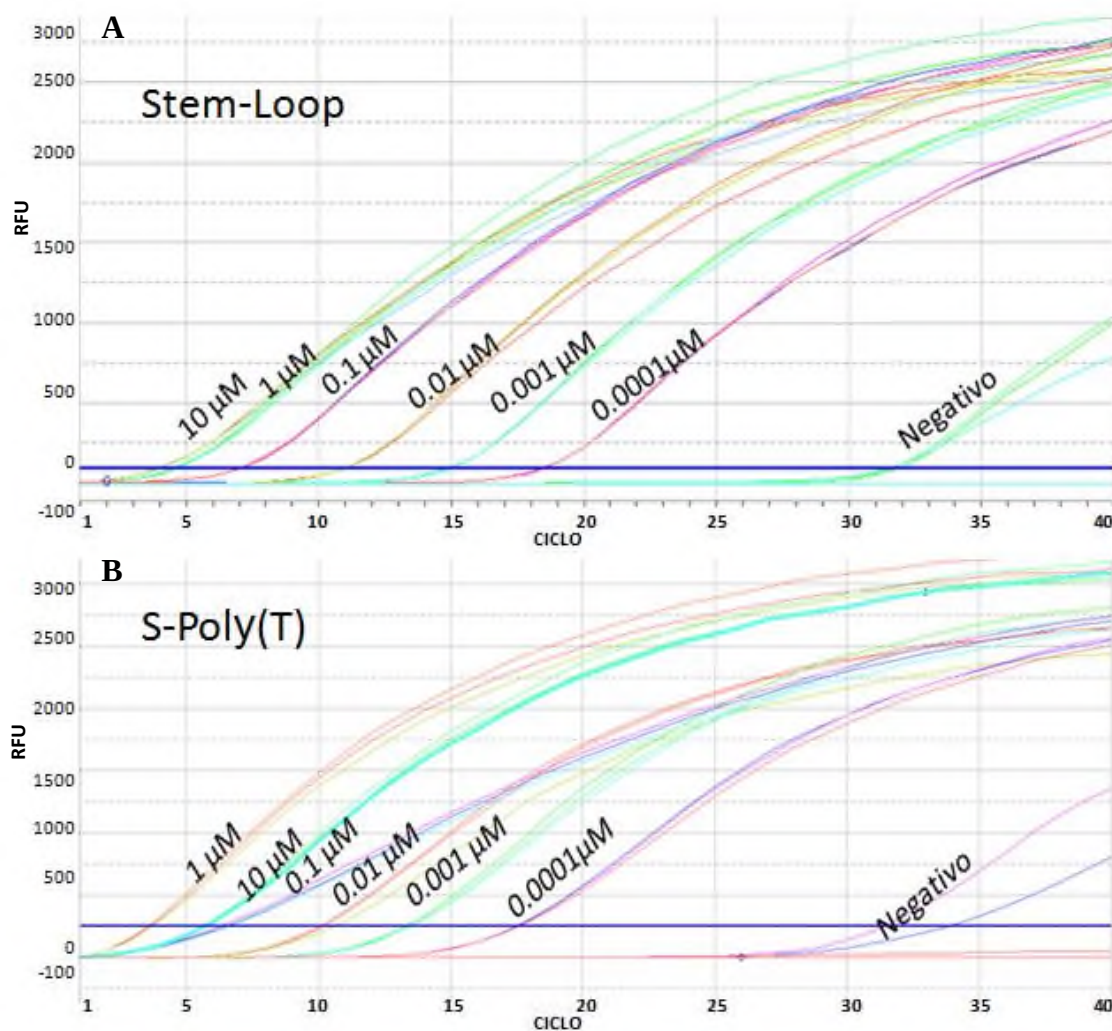


Figura 21. Graficas representativas de qPCR de los métodos SL y SPT con sus respectivas concentraciones (10 μ M hasta 0.0001 μ M) y negativo, **A.** Stem-loop y **B.** S-Poly(T)

En el segundo ensayo, los métodos se evaluaron con muestra de RNA total de planta y con primers específicos para el análisis de miR156 y miR159. En este ensayo, se hizo evidente que el método de LA(L1) no fue útil para detectar a miR159 (Fig. 22).

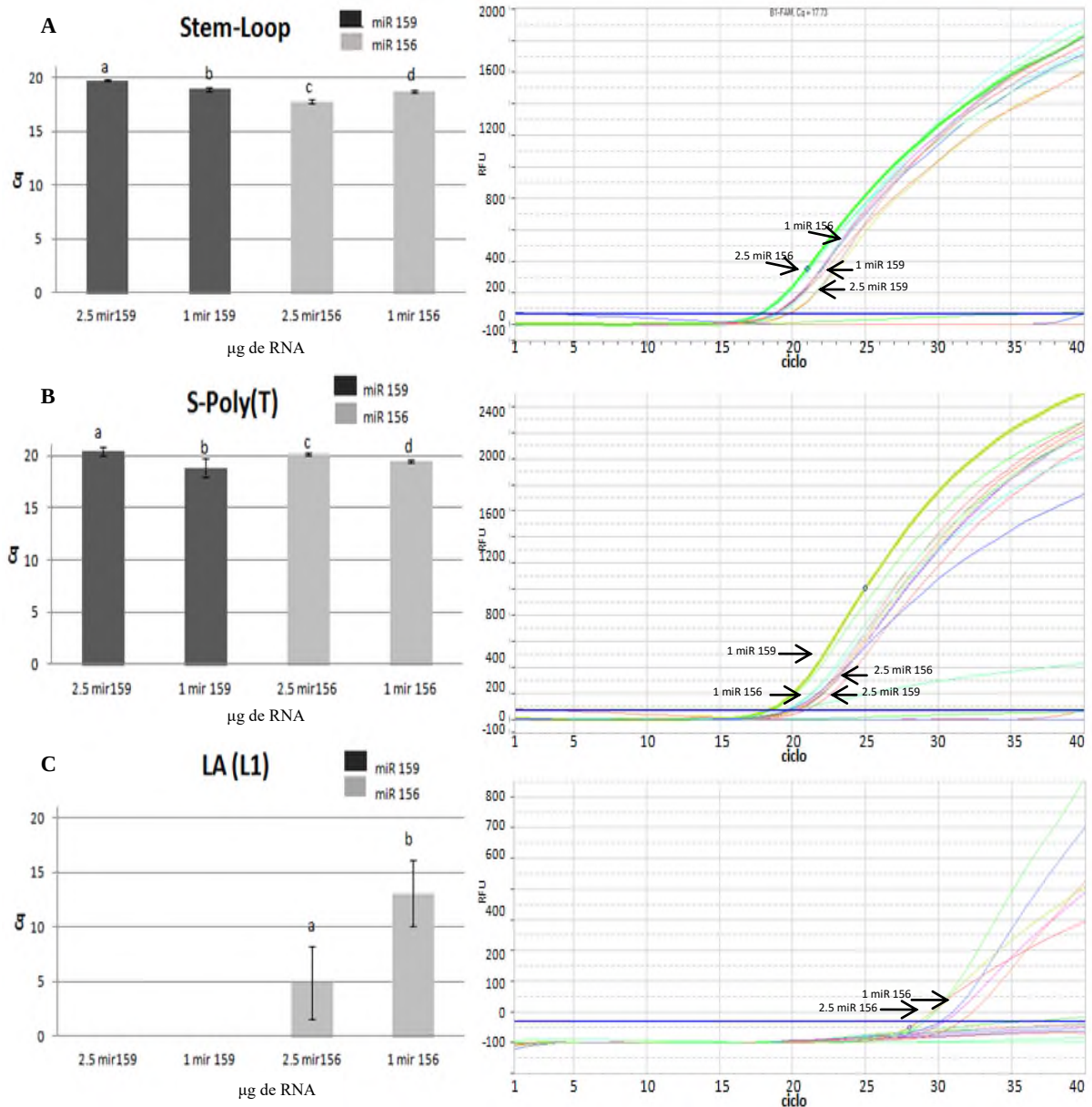


Figura 22. Evaluación de los métodos con muestras de RNA total. Valores en Cq con sus respectivas gráficas de qPCR: A) Stem-loop, B) S-Poly (T) y C) LA(L1), todos a partir de 2.5µg y 1µg de RNA total y primers para detectar miR159 y miR156. Media $\pm$ DS (indicada por las barras negras). Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre diluciones en cada método, para cada microRNA, de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$).

Adicionalmente, se observó que cuando se empleó RNA total en altas cantidades (p.ej. 2.5 μ g) se reprodujo el efecto de la alta concentración de miRNA sintético del ensayo 1 con el método SL (Fig. 22); SL no logra detectar adecuadamente a miR159 cuando se inicia el procedimiento empleando RNA en cantidades de 2.5 y 1 μ g, mientras que miR156 sí se detecta en correlación con la concentración de RNA inicial. SPT no muestra buena correlación entre la concentración de RNA y los valores de Cq cuando se emplea RNA total como muestra inicial.

Con la intención de realizar una reacción única de síntesis de cDNA útil para detectar por qPCR los miRNAs de interés, se realizó una mezcla de los primers SL o SPT para todos los miRNAs (PrimerMIX) y se realizaron las reacciones de qPCR individuales. En la Fig. 23 se muestran los resultados del uso del PrimerMIX. Comparando con el uso de primers no mezclados para realizar las reacciones de cDNA, se observa que, por ejemplo, para la detección de miR156 a partir de 1 μ g de RNA total con el método SL (Fig. 23, panel A) se requiere un Cq de 18.73 ± 0.10 . En cambio, cuando se emplea el PrimerMIX, partiendo de la misma cantidad de RNA total, se requiere un Cq de 24.69 ± 0.57 . Cuando se emplea el método SPT para mi156 se observa la misma tendencia. Para el caso de miR159, con ambos métodos también se observa este efecto, lo que indica que el uso de la mezcla interfiere en la detección individual de los miRNAs.

Adicionalmente, se observa que miRNA172 no presenta expresión en los dos métodos. También se observa que miR5200 no se visualiza en SPT mientras que en el SL sí presenta expresión (Fig. 23, B). Como dato adicional, el método SL presenta amplificación en el control negativo cuando se emplea el PrimerMIX, por lo que es posible que estos métodos sean muy sensibles a la mezcla de primers, que posiblemente interactúan entre ellos ocasionando productos secundarios o artefactos. Esto se confirmó analizando los productos en un gel de acrilamida al 6 %, en donde se observaron bandas adicionales a los productos esperados. Por todo lo anterior, se descarta el uso del PrimerMIX.

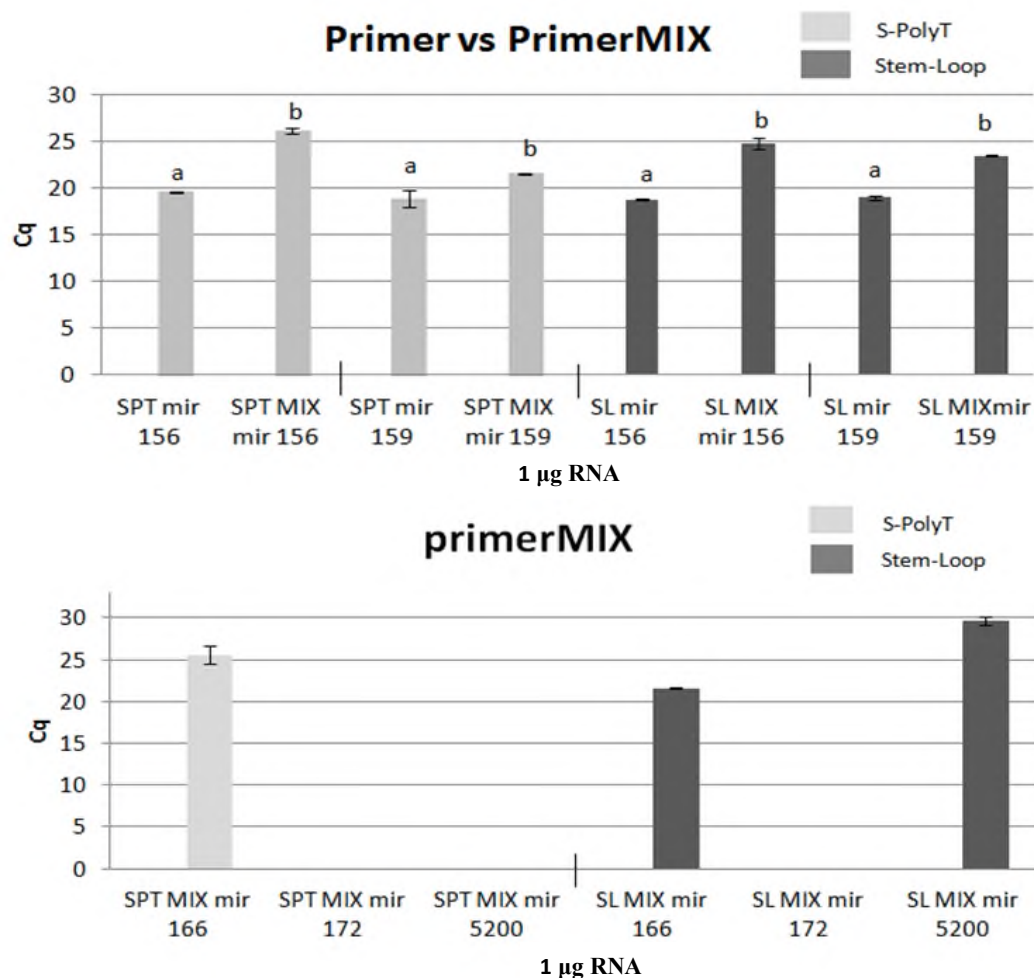


Figura 23. Resultados de la PCR cuantitativa a partir de cDNA multiplex mediante el uso de primerMIX. A. Reacciones de PCR individuales vs PrimerMix para miR156 y miR159. B. Mezcla de PrimerMix para miR166, miR172 y miR5200. Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre cada método, para cada microRNA, de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$)

7.3.2 Evaluación del intervalo dinámico

Debido a que el método SL mostró mayor sensibilidad para detectar los miRNAs de interés, se eligió para realizar un análisis más detallado en el intervalo dinámico, considerando cantidades decrecientes de RNA total a partir de 1 μ g. Consistente con los

resultados del primer ensayo, SL detectó a miR156 y miR159 de forma eficiente, con alta sensibilidad y amplio intervalo dinámico. Los resultados se muestran en la Fig. 24.

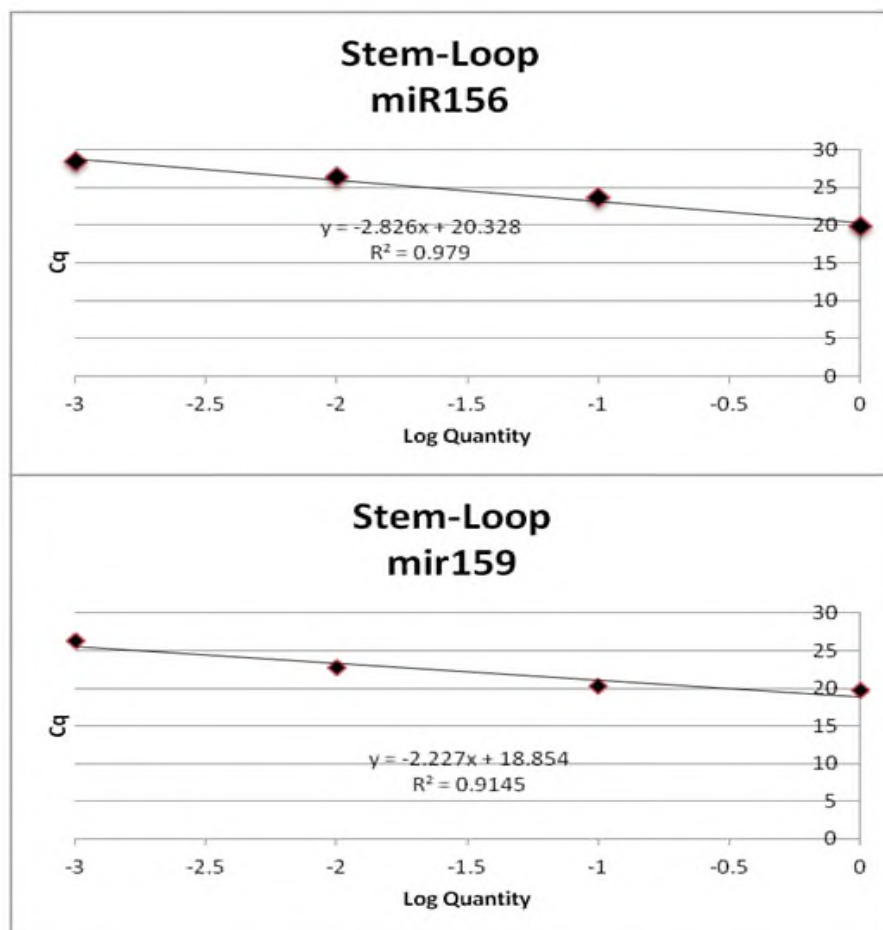


Figura 24. Rango dinámico y sensibilidad de SL para miR156 y miR159 empleando 1, 0.1, 0.01 y 0.001 μ g de RNA total en las reacciones de retrotranscripción.

7.4 Análisis de expresión de los miRNAs 156, 159, 172, 528 y 5200 por PCR cuantitativa.

En los análisis de métodos, se identificó que el mejor es el Stem-Loop, por demostrar mayor sensibilidad y amplio intervalo dinámico, por lo tanto, se realizaron ensayos de qPCR para analizar los microRNAs de interés en los diferentes tratamientos.

Para el experimento de qPCR, cada tratamiento se realizaron reacciones por triplicado y con sus respectivos negativos, al obtener los valores de Cq de las curvas de estos triplicados en las gráficas de qPCR, no se observó desviaciones estándar con valores mayores a 1 en los ciclos entre las reacciones, esto se cumplió satisfactoriamente en los miRNAs 156, 159, 166 y 528 mientras que los miRNAs 5200 y 172 no se detectaban valores de Cq. Se realizaron varias veces estos experimentos en qPCR para verificar el comportamiento y el resultado fue el mismo, por lo tanto, con estos miRNAs no se pudo realizar el análisis de expresión en respuesta a los tratamientos de estrés.

El análisis de la expresión de los miRNAs en respuesta al estrés se cuantificó con el método $\Delta\Delta C_T$ mediante la fórmula de Livak y Schmittgen (2001).

Con los resultados obtenidos se identificó que miR156 y miR528 presentan una expresión diferencial 15 y 16 veces mayor, respectivamente, en el tratamiento sequía-inundación, seguida por el tratamiento de sequía, con expresión 5 veces mayor que en control. En contraste, los tratamientos de inundación y sequía-control (plantas que ya se han recuperado de la sequía) presentan una expresión disminuida. Esto sugiere que miR156 y miR528 podrían estarse acumulando por efecto de la sequía, y que cuando ésta va seguida con estrés por inundación, su expresión se eleva aún más. En cuanto a miR159, se expresa mayormente en los tratamientos de estrés por sequía e inundación-control seguidas de las expresiones en sequía-inundación, mientras que las que presentaron un estrés más bajo fue inundación y sequía-control. (Fig 25).

Mediante los valores de Cq se realizó también un análisis entre los tratamientos con similitud, separándolos en dos grupos, los tratamientos en sequía e inundación como se muestra en las Figs. 26 y 27.

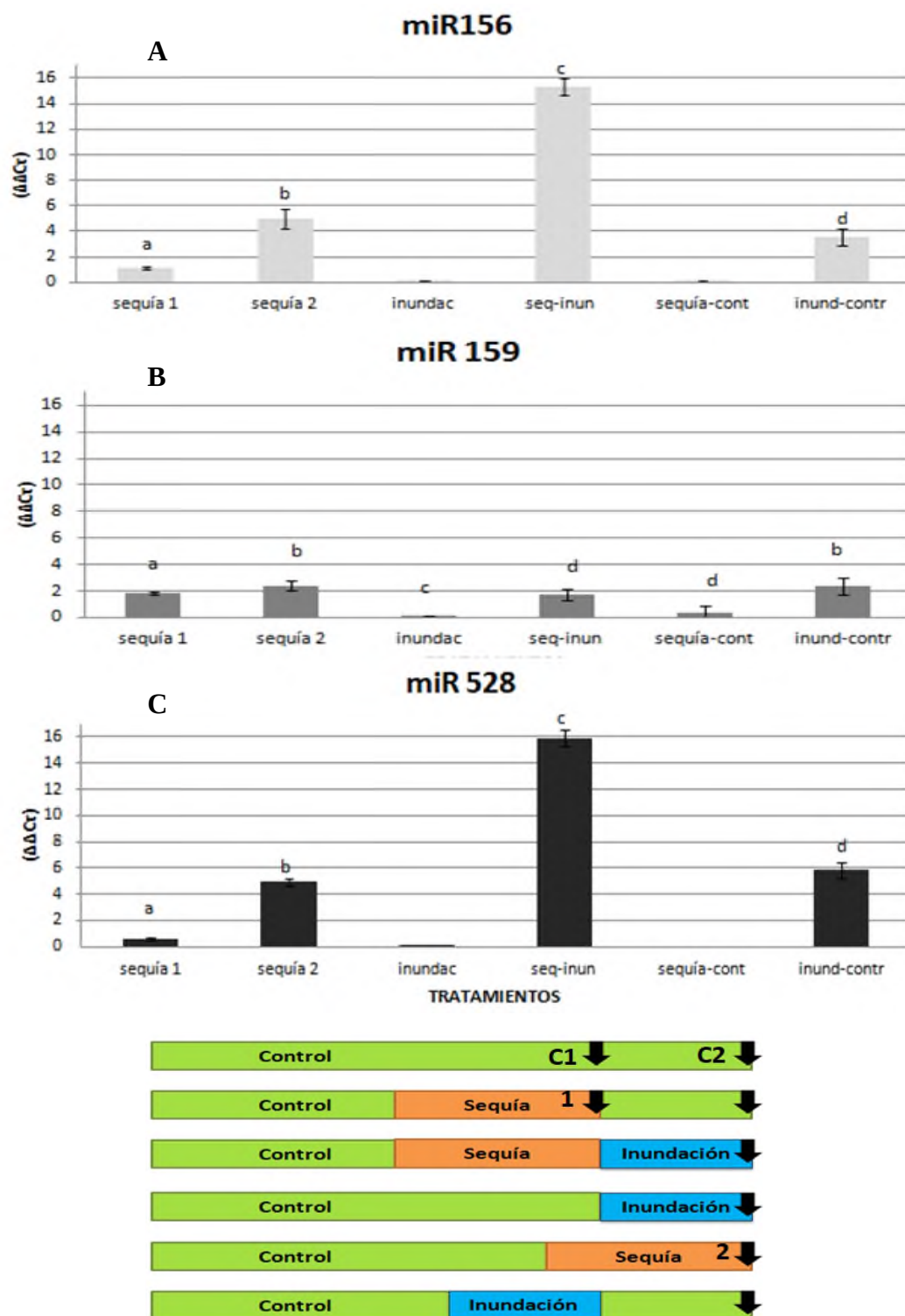


Figura 25. Expresión de los miRNAs en respuesta al estrés en los diferentes tratamientos con análisis de Media $\pm$ DS (indicadas con las barras negras). Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, de acuerdo a la prueba t de Student ($p < 0.05$). **A.** miR159, **B.** miR156 y **C.** miR 528. C1: Colecta 1, C2: Colecta 2.

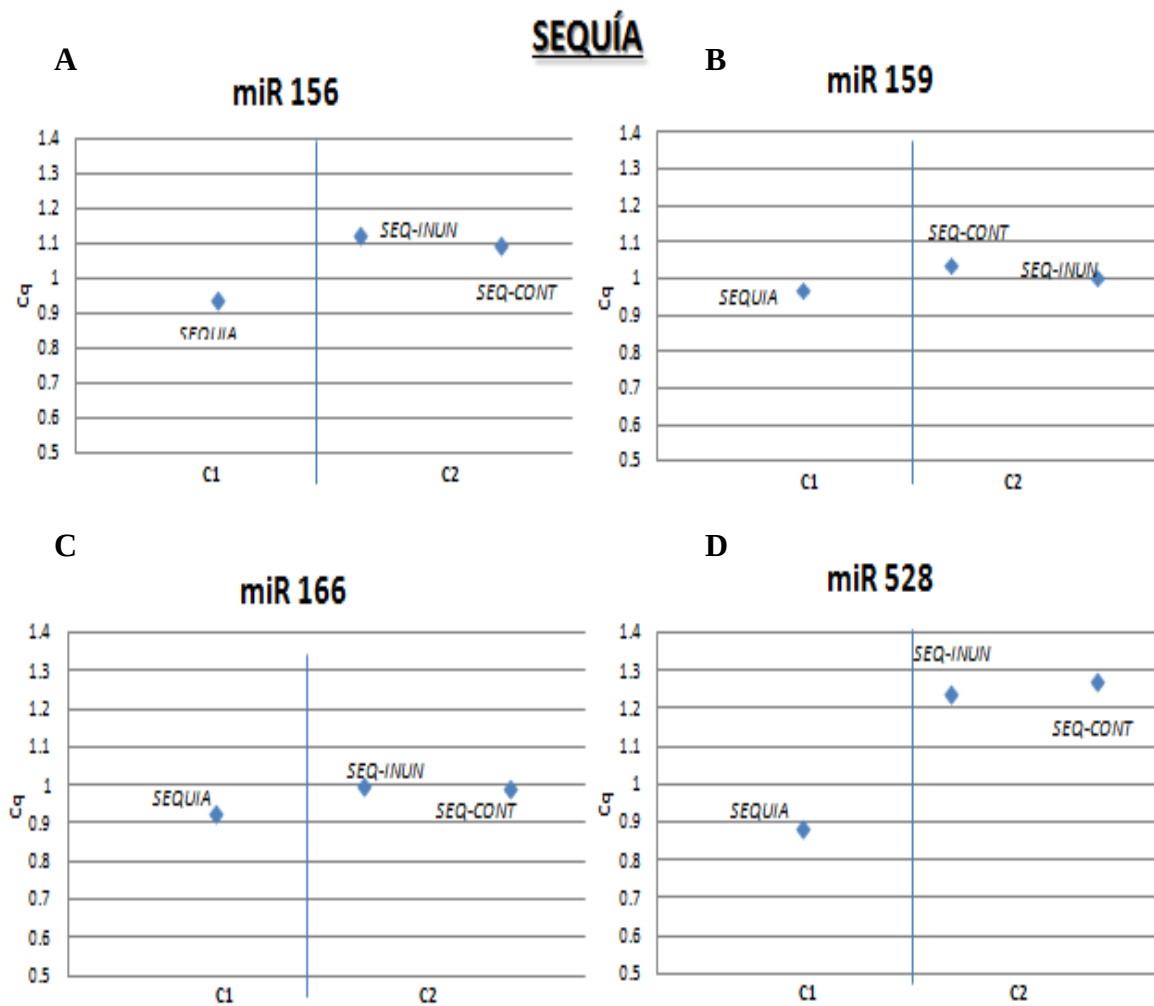


Figura 26. Expresión de los miRNAs 156, 159, 166 y 528, en respuesta al estrés por sequía. C1: control 1, C2: control 2.

A. miR156, **B.** miR159, **C.** miR 166 y **D.** miR528.

En el estrés por sequía los miRNAs 156 y 166 presentan un comportamiento muy similar en la relación de alta expresión del tratamiento de sequía-inundación sobre el tratamiento de sequía-control, de modo contrario en los miRNAs 159 y 528 expresan mayormente los tratamientos de sequía-control sobre sequía-inundación. De manera general, se puede observar que la sucesión de estreses eleva la expresión de los microRNAs a niveles superiores de lo que haría un solo tipo de estrés.

INUNDACIÓN

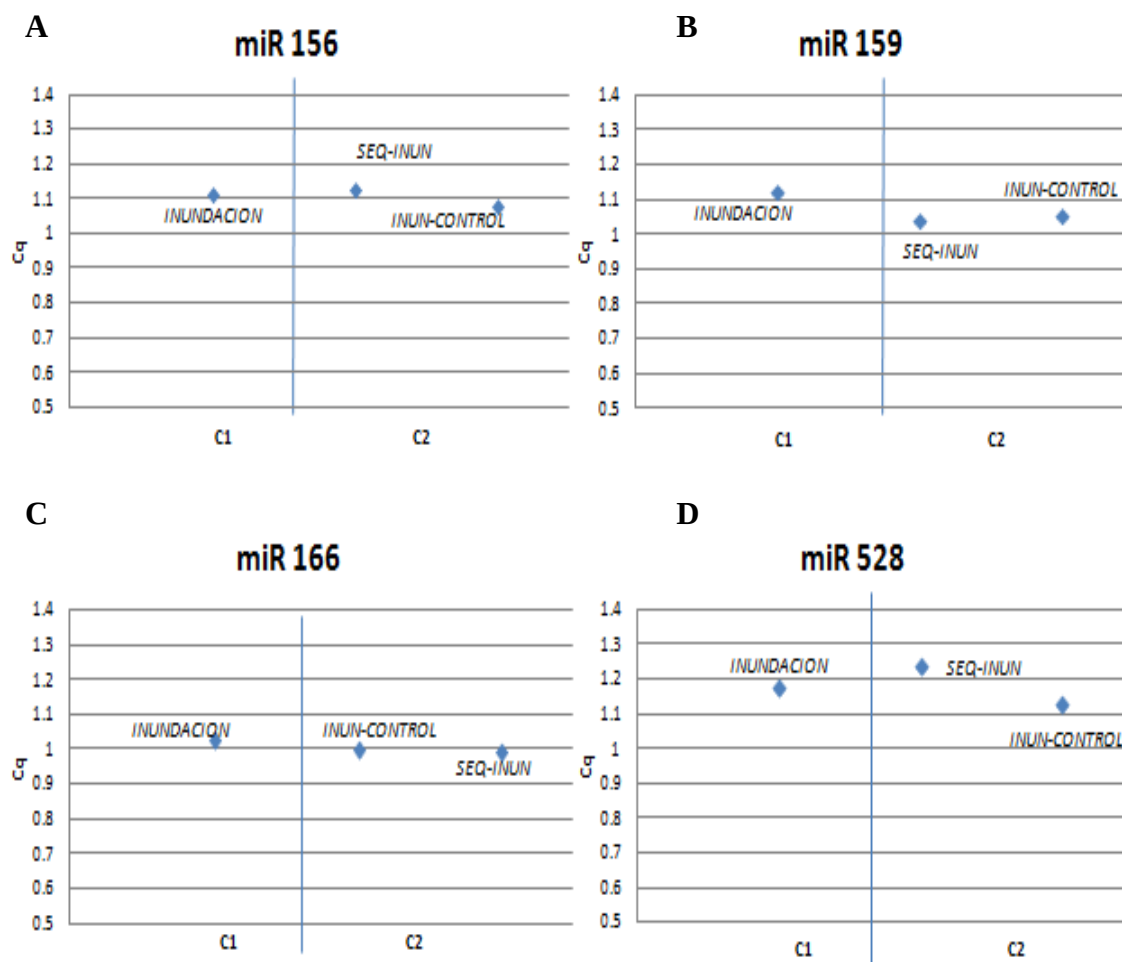


Figura 27. Expresión de los miRNAs 156, 159, 166 y 528, en respuesta al estrés por inundación. C1: control 1, C2: control 2.

A. miR156, **B.** miR159, **C.** miR 166 y **D.** miR528.

En el estrés por inundación de miR156 y miR528 presentan similitud en el nivel de expresión donde el estrés por inundación se encuentra debajo del estrés de sequía-inundación y por arriba del estrés inundación-control. Por otra parte, los miRNAs 166 y 159 también presentan similitud en los niveles de expresión de inundación-control por arriba de sequía-inundación, estos dos estrés se encuentran por debajo de la expresión en la inundación.

8. DISCUSION

El estudio de las biomoléculas ha permitido ampliar el conocimiento de las bases biológicas de la tolerancia al estrés en plantas. Esto se ha facilitado por la disponibilidad cada vez mayor de herramientas de análisis molecular. En este trabajo fue posible realizar una evaluación de herramientas aplicada al análisis de expresión de miRNAs mediante la PCR cuantitativa, la cual se considera entre las mejores para medir expresión de miRNAs. La qPCR es útil para validar datos ya que posee sensibilidad y especificidad. En la actualidad se dispone de estrategias estándar para la cuantificación de miRNAs por qPCR. Las principales son conocidas como el método de Stem-Loop (Chen *et al.*, 2005), S-PolyT (Kang *et al.*, 2012), y ligación de adaptador (Ge *et al.*, 2014).

En este trabajo, se realizaron evaluaciones de los métodos disponibles con el uso de un miRNA sintético y de una sonda TaqMan de tipo universal, haciendo la detección más específica. Además, se realizó la detección de miRNAs en muestras de RNA reales. Como resultado, se identificó a los dos métodos más eficientes para la detección, como son Stem-loop y S-PolyT. Entre éstos, se determinó que el de mayor sensibilidad y rango dinámico fue el método Stem-Loop, que no requiere reacciones adicionales a la retrotranscripción, limitando así la manipulación del RNA y la tendencia al error experimental, en comparación al S-PolyT, los resultados coinciden con los realizados por Varkony *et al.* (2007), quienes realizaron estudios de expresión de miRNAs en tejidos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* mediante la técnica de Stem-Loop con qPCR. En dicho trabajo se concluye que stem-loop es el mejor método, ya que refleja fielmente los perfiles de expresión, con alta sensibilidad y especificidad, por lo que es el método de elección para la cuantificación de miRNAs.

En este trabajo se propuso la aplicación de un tratamiento novedoso, en el cual se expuso a *Brachypodium distachyon* a condiciones consecutivas de sequía e inundación. Esto se realizó con la finalidad de simular los estados a los que se enfrentan las plantas

en condiciones naturales. Cabe destacar que también el tratamiento de inundación se realizó de manera gradual simulando lo que sucede en una inundación de manera natural, aumentando el nivel de agua poco a poco hasta que las plántulas permanecieran sumergidas en su totalidad.

La sumersión en las plantas tiende a activar la respuesta mediada por miRNAs para reprimir el proceso de floración, como parte de la quiescencia en las plantas (Jeong *et al.*, 2013). Nuestros experimentos en estrés por inundación efectivamente atrasaron la floración y además mostraron una resistencia de 3 días bajo el agua en las mismas condiciones de iluminación que las plantas control, y al finalizar el estrés las plantas desarrollaban un mayor follaje (Fig 14).

Según Wu *et al.*, (2013), el miR5200 juega un papel importante en la regulación de la transición floral mediada por fotoperiodos, expresada en condiciones de inundación. En comparación con nuestros estudios, no obtuvimos ninguna expresión de este miRNA en nuestros tratamientos individuales de inundación y sequía. Sin embargo, donde sí existe expresión considerable de miRNAs, es en la combinación de tratamientos de inundación seguida de recuperación, expresándose el miR528. Por lo tanto, es probable que la expresión de miR528 esté asociada con el proceso de pérdida gradual de agua.

Por otro lado, se sabe que durante el estrés por sequía existe participación de múltiples miRNAs (Barrera-Figueroa *et al.*, 2011), observando que los miRNAs que se expresan en estas condiciones son miR156, miR159 y miR528. Estos miRNAs se expresan diferencialmente en los tratamientos de sequía y sequía-inundación. Otro miRNA evaluado en este trabajo fue miR172. MiR172 se ha estudiado en la planta modelo dicotiledónea *A. thaliana*, donde se encontró que regula a un gen en el desarrollo floral cuando se sobreexpresa. Se sabe que miR172 acelera la floración en dicotiledóneas. Sin embargo, en nuestros resultados, *B. distachyon* no mostró ninguna expresión de este miRNA, al igual que el miRNA5200, independientemente del adelanto o atraso de la floración observada en nuestros tratamientos. Es posible que se requiera un nuevo diseño de primers para detectar a estos miRNAs. Sin embargo, de acuerdo a trabajos

experimentales previos realizados sobre miR5200 en el grupo de trabajo, se asume que este miRNA es de baja abundancia y difícilmente es detectado por las técnicas de análisis. Adicionalmente, en este trabajo se acepta la posibilidad de que los tratamientos aplicados no logren causar alteraciones importantes en la expresión de estos miRNAs, y que las respuestas relacionadas al desarrollo y la floración puedan estar determinadas por otros miRNAs, y que dependan del estado de desarrollo de la planta, y de diferentes niveles de intensidad y duración del estrés (Bewley y Black, 1994).

Analizando la plasticidad del tiempo a floración, nuestra planta modelo monocotiledónea coincide con los estudios realizados en la planta modelo dicotiledónea *A. thaliana*, frente a los estreses hídricos. En *A. thaliana* se ha documentado el fenómeno de escape al estrés, caracterizado por el tiempo a floración adelantado, que lleva a la producción de semillas de forma anticipada. En contraste, en condiciones de inundación se puede presentar floración atrasada y gran producción de biomasa (Peña-Castro *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Riboni *et al.*, 2013).

9. CONCLUSIONES

1. El empleo de miRNAs sintéticos para evaluar la eficiencia de detección por PCR cuantitativa no refleja en su totalidad los efectos de emplear muestras de RNA total que contienen la diversidad de composición y concentraciones de microRNAs presentes en las plantas.
2. Los métodos SL y SPT son los más adecuados para el análisis de expresión de miRNAs. Sin embargo, éstos presentan diferencias significativas en el nivel de sensibilidad para la detección de miRNAs específicos, así como distintos intervalos dinámicos.
3. El mejor método para el análisis de expresión de miRNAs es SL, puesto que detecta miRNAs con alta sensibilidad y amplio rango dinámico, empleando RNA total.
4. El método SL es sencillo de realizar y eficaz, debido a que no necesita de reacciones previas a la retrotranscripción, con lo que se reduce la manipulación de las muestras y el tiempo de ensayo.
5. *B. distachyon* Bd21, es un buen modelo de estudio para el análisis de combinación de tratamientos bajo estrés hídrico, sequía-inundación, inundación-control y sequía-control.
6. El estado de desarrollo en el que se encuentran las plantas cuando se expone al estrés, tiene influencia sobre su respuesta fisiológica y sobre la expresión de microRNAs.
7. Los miRNAs miR156, miR159 y miR528 se expresan en forma diferencial y opuesta durante la sequía y la inundación, por lo que no establecen puntos de respuesta cruzada al estrés hídrico en *Brachypodium distachyon*. No obstante, la exposición a estrés por sequía, seguida por inundación, induce la acumulación de los microRNAs 156 y 528 en forma superior al efecto de los estreses individuales.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar y analizar la expresión de otros miRNAs que puedan estar presentes en la combinación de tratamientos de estrés hídrico.
- Estudiar la expresión de los miRNAs durante todas las etapas de desarrollo de las plantas frente a los estreses hídricos.
- Encontrar otros miRNAs que puedan actuar como control constitutivo con alta estabilidad, principalmente para su aplicación en la combinación de los tratamientos hídricos.
- Continuar el estudio de los microRNAs 156 y 528, así como de sus genes blanco, para investigar a detalle la dinámica de expresión y los factores que potencian su acumulación cuando se aplican tratamientos consecutivos de sequía e inundación.

11. REFERENCIAS

1. Agroasemex (2006) La experiencia mexicana en el desarrollo y operación de seguros paramétricos aplicados a la agricultura. Agroasemex. Disponible en: www.agroasemex.gob.mx, pp. 42.
2. Araya YN (2007). Ecology of Water Relations in Plants. En: Not Set ed. Encyclopaedia of life sciences [26 vol. set]. Wiley.
3. Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15, 2730-2741.
4. Barrera-Figueroa BE, Gao L, Diop NN, Wu Z, Ehlers JD, Roberts PA, Close TJ, Zhu JK, Renyi L (2011) Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology* 11: 127
5. Barrs C, Weatheley PE (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15, 413-4.
6. Bewley JD, Black MS (1994) *Physiology of Development and Germination*, New York, Plenum Press, 2 ed., 1994, 445 p.
7. Cesario-Solís ME (2015) Tesis de maestría. Caracterización fisiológica y molecular de la floración en *Brachypodium distachyon* bajo estrés por déficit hídrico. Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec.
8. Chaumont F, Tyerman SD (2014) Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol.* 164:1600-1618.
9. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33, e179.

10. Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* 303, 2022–2025.
11. Chinnusamy V, Zhu JK (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 133-139.
12. Chuck G, Meeley R, Irish E, Sakai H, Hake S (2007) The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nat. Genet.* 39, 1517-1521.
13. FAO (2009) How to feed the World in 2050? Resumen ejecutivo. Disponible en: www.fao.org. Consultada en febrero 2015.
14. FAO (2012) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma 2002.
15. Ferreira TH, Gentile A, Vilela RD, Costa GGL, Dias LI, et al. (2012) microRNAs Associated with Drought Response in the Bioenerg Crop Sugarcane (*Saccharum spp.*) *PLoS ONE* 7(10): e46703, doi:10.1371/journal.pone.0046703.
16. Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G (2009) Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* 17, 75-86.
17. Fukao T, Xiong (2013) Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex? *Curr. Opin. Plant Biol.* 16:196-204.
18. Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J (2011) The submergence tolerance regulator SUB1A mediates crosstalk between submergence and drought tolerance in rice. *Plant Cell*, 23: 412-427.
19. Ge Q, Tian F, Zhou Y, Zhu Y, Lu J, Bai Y, Lu Z (2014) A universal linker-RT PCR based quantitative method for the detection of circulating miRNAs. *Anal. Methods* 6, 9101.
20. Giri J. (2011) Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:1746-1751.

21. Goldstein G, Ortega JKE, Nerd A, Nobel PS (1991) Diel patterns of water potential components for the crassulacean acid metabolism plant *Opuntia ficusindica* when well-watered or droughted. *Plant Physiol.* 95:274-280.
22. Hong Y, Jackson S (2015) Floral induction and flower formation -the role and potential applications of miRNAs. *Plant Biotechnol. J.* 13, 282-292.
23. IMTA (2009) Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, disponible en: www.imta.gob.mx. Consultada en Febrero 2015.
24. INEGI (2009). El sector alimentario en México, disponible en: cuentame.inegi.org.mx. consultada en Febrero 2015.
25. Jeong DH, Green P (2013) The role of rice microRNAs in abiotic stress responses. *J. Plant Biol.* 56:187-197.
26. Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM (2007) The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2736–2748.
27. Kang K, Zhang X, Liu H, Wang Z, Zhong J, Huang Z, Peng X, Zeng Y, Wang Y, Yang Y, Luo J, Gou D (2012) A novel real-time assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo (dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity. *PLOS One* 7, e48536.
28. Khraiweh B, Zhu JK, Zhu J (2012). Role of miRNAs in biotic and abiotic stress responses in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819, 137-148.
29. Kim J, Jung JH, Reyes JL, Kim YS, Kim SY, Chung KS, Kim J, Lee M, Lee Y, Kim VN, Chua NH, Park CM (2005) microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J.* 42, 84–94.
30. Kramer PJ, Boer JS (1995) *Water Relations of plants and soils*. Academic Press, San Diego.
31. Livak KJ, Shmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408.
32. Luo N, Liu J, Yu X, Jiang Y (2011) Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum* 141: 19-29.

33. Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:595-624.
34. Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
35. Nobel PS (1999) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 2nd ed. Academic Press, San Diego.
36. Olivera-Villaroel (2013) El Impacto de la Pobreza del Cambio Climático en México (2013), Banco Mundial de Política de Investigación Documento de Trabajo N° 6461. Disponible en: www.ssrn.com. Consultada en marzo 2015.
37. Peña-Castro JM, van Zanten M, Lee SC, Patel MR, Voesenek LACJ, Fukao T, 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(3):434-446.
38. Pulido-Barajas JF (2014) Tesis de maestría. Identificación y análisis de expresión de microRNAs de respuesta a sequía en plantas monocotiledóneas. Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec.
39. Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant J.* 49, 592-606.
40. Riboni M, Galbiati M, Tonelli C, Conti L (2013) *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*. *Plant Physiology* 162, 1706-1719.
41. SAGARPA (2004) Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>.
42. SAGARPA (2007) Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, disponible en: www.sagarpa.gob.mx. Consultada en abril 2015.
43. Santos MG, Ribeiro RV, Machado EC, Pimentel C. Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit. *Biologia Plantarum* 2009, 53 (2): 229-236.

44. Shi R, Chiang VL (2005) Facile means for quantifying microRNA expression by real time-PCR. *Biotechniques* 39, 519-525.
45. Springgs KA, Bushell M, Willis EA (2010) Translational Regulation of gene Expression during conditions of cell Stress. *Molecular Cell* 40, Elsevier Inc, DOI 10.1016/j.molcel.2010.09.028.
46. Stratford S, Stec S, Jadhav V, Seitzer J, Abrams M, Beverly M (2008) Examination of real-time polymerase chain reaction methods for the detection and quantification of modified siRNA. *Analytical Biochemistry* 379, 96-104.
47. Sunkar R, Zhu J K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell*, 16(8): 2001–2019.
48. Taiz L, Zeiger, Moller M, Murphy (2015). *Plant Physiology and Development*, 6^o Edition.
49. Tang F, Hajkova P, Barton SC, Lao K, Surani MA (2006) MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acid Res.* 34, c9-c16.
50. Tardieu F, Parent B, Caldeira CF, Welcker C (2014) Genetic and physiological controls of growth under water deficit. *Plant Physiol.* 164: 1628-1635.
51. Trumbo JL, Zhang B, Stewart Jr CN (2015) Manipulating microRNAs for improved biomass and biofuels from plant feedstocks. *Plant Biotechnol. J.* 13, 337-354.
52. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3: 12.
53. Wheeler TD, Stroock AD (2008) The transpiration of water at negative pressures in a synthetic tree. *Nature* 455:208-212.
54. Wu G, Park Y, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS (2009) The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell* 138, 750–759.
55. Wu G, Poethig RS (2006) Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133, 3539-3547.

56. Wu L, Liu D, Wu J, Zhang R, Qin Z, Liu D, Li A, Fu D, Zhai W, Mao L (2013) Regulation of FLOWERING LOCUS T by a MicroRNA in *Brachypodium distachyon* The Plant Cell, Vol. 25: 4363–4377
57. Xie Z, Qi X (2008) Diverse small RNA directed silencing pathways in plants. Biochim. Biophys. Acta 1770, 720-724.
58. Xu MY, Zhang L, Li WW, Hu XL, Wang MB, Fan YL, Zhang CY, Wang L (2013) Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 65, 89–101.
59. Zanca SA, Vicentini R, Ortiz-Morea AF, Bem LEV, Da Silva JM, Vincentz M, Nogueira TSF (2010). Identification and expression analysis of microRNAs and targets in the biofuel crop sugarcane. BMC Plant Biol 10:260.

12. APÉNDICE

FORMULAS PARA LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

- Agua de DEPC para un volumen de 1000mL

Componente	cantidad
Dietil pirocarbonato	1 mL
Agua desionizada	1000 mL

Mantener todos los componentes en agitación de 12 a 24h, posteriormente esterilizar a 15 lb/pulg² por 15 min. Mantener a temperatura ambiente.

- TAE 10X para un volumen de 1000 mL

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

Disolver todos los componentes (TRIS, ácido acético y EDTA) en 800 mL de agua, aforando a 1000mL y almacenar a temperatura ambiente.

- TBE 10X para un volumen de 1000 mL

componente	Cantidad
Acido bórico	55 g
EDTA (0.5 M)	40 mL
TRIS base	108 g
Agua desionizada	Aforar a 1000 mL

Diluir TRIS base en 100 mL de agua desionizada, después agregar el ácido bórico y mezclar hasta disolver completamente, posteriormente agregar EDTA aforando a 200 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

- Gel de agarosa desnaturalizante al 1%. Para un volumen de 100 mL.

componente	Cantidad
Agarosa	1 g
MOPS 10x	10 mL
Agua DEPC	72 mL
Formaldehído	18 mL

En un frasco de vidrio con tapa, añadir la agarosa, el MOPS 10X y el agua DEPC. Calentar en el microondas hasta disolver completamente la agarosa. Posteriormente, antes de que solidifique, agregar el formaldehído, mezclar y vaciar en una canastilla de preparación. Una vez que solidifique el gel, puede emplearse para cargar las muestras de RNA.

- Gel de acrilamida 6% nativo para un volumen de 10 mL

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

*Añadir 100 mg de persulfato de amonio a 1mL de agua desionizada agitando, hasta disolver la sal y posteriormente almacenar a 4°C.

Agregar primero los componentes: agua desionizada, TBE, acrilamida y APS en un tubo cónico de 15 mL, agitando suavemente unos segundos, posteriormente agregar el TEMED al tubo y agitar por unos segundos y vaciar la solución rápidamente en la cámara de electroforesis previamente preparada.

- MOPS 10X pH 7.0 para un volumen de 500mL

componente	cantidad
MOPS	20.927 g
Acetato de sodio	5.44 g
EDTA (0.5M)	10 mL
NaOH (2N)	Lo necesario para un pH 7.0
Agua DEPC	Aforar a 500 mL

Disolver el acetato de sodio en 370 mL de agua DEPC, posteriormente adicionar al MOPS y disolver para luego agregar el EDTA, ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Aforar a 500 mL con agua DEPC. Almacenar la solución a temperatura ambiente.

- Buffer de carga para RNA 5X para un volumen de 10 mL

Componente	cantidad
Formamida	2084 μ L
Formaldehido	720 μ L
MOPS 10X	4 mL μ L
EDTA	80 μ L
Azul de bromofenol	16 μ L
Bromuro de etidio	10mg
Glicerol	2 mL
Agua DEPC	Aforar a 10 mL

Agregar en un tubo con tapa y mezclar los componentes. Almacenar después de su uso a 4°C.