



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VÍCTOR ALZAMORA CASTRO

IDENTIFICACIÓN DE microARNs (miRNAs)
ASOCIADOS AL ESTRÉS HÍDRICO EN *Solanum
tuberosum subsp andígena*.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

OLGA PATRICIA PONCE TRAVEZAÑO

LIMA – PERÚ

2016

JURADO EXAMINADOR:

Presidente: Dr. Jorge Arévalo Zelada

Vocal: Dra. Patricia Herrera Velit

Secretario: Dr. Mirko Zimic Peralta

ASESOR:

Carlos Merino Méndez

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por todo el apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por haber financiado mis estudios de maestría. A mi asesor Carlos Merino por las recomendaciones brindadas durante el desarrollo de la tesis. A Edgar Neyra por su preocupación y apoyo constante. A mis amigos del laboratorio por los ánimos y las fuerzas brindadas.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.	Planteamiento del problema	9
2.	Marco teórico – Antecedentes	10
2.1.	Sequía	10
2.1.1.	El problema de la sequía.	10
2.1.2.	Sequía en Perú	11
2.2.	La papa	14
2.2.1.	Centro de origen y diversificación de la papa cultivada.....	16
2.2.2.	Ciclo de vida.....	17
2.3.	Los efectos de la sequía en la papa.....	20
2.3.1.	El transcriptoma y la expresión génica durante la sequía.....	24
2.4.	microARNs (miRNAs).....	26
2.4.1.	Concepto.....	26
2.4.2.	Descubrimiento	27
2.4.3.	Biogénesis	29
2.4.4.	miRNA en papa	32
2.4.5.	miRNAs relacionados a la sequía en papa	33
3.	Justificación.....	35
4.	Objetivos	37
4.1.	Objetivo general	37
4.2.	Objetivos específicos.....	37
5.	Hipótesis.....	38
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
1.	Material biológico	39
2.	Diseño experimental.....	42
3.	Extracción de ARN total	47

4.	Secuenciamiento.....	48
5.	Análisis de secuencias	48
5.1.	Pre-procesamiento de los datos obtenidos.....	49
5.2.	Mapeo genómico.	52
5.3.	Predicción de los miRNAs.	53
5.4.	Identificación de los miRNAs relacionados a la respuesta de tolerancia ante el estrés hídrico.....	57
5.4.1.-	Cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs	57
5.4.2.-	Generación de grupos de co-expresión génica.	58
5.4.3.-	Identificación de miRNAs relacionados a la tolerancia a estrés hídrico.....	59
5.5.	Identificación de genes blancos o targets de los miRNAs secuenciados. ...	59
5.6.	Descripción de la funcionalidad de los genes blanco.....	61
IV.	RESULTADOS	62
1.	Extracción de ARN total	62
2.	Análisis de secuencias	63
2.1.	Pre-procesamiento de los datos obtenidos.....	63
2.2.	Mapeo genómico.	64
2.3.	Identificación de miRNAs.....	67
2.4.	Identificación de los miRNAs relacionados a la respuesta de tolerancia ante el estrés hídrico.....	73
2.4.1.-	Cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs.	73
2.4.2.-	Generación de grupos de co-expresión génica.	76
2.4.3.-	Identificación de miRNAs relacionados a la tolerancia a estrés hídrico.....	81
2.5.	Identificación de los genes blanco de los miRNAs secuenciados.....	84
2.6.	Descripción de la funcionalidad de los genes blanco.....	86
V.	DISCUSIÓN.....	88
VI.	CONCLUSIONES.....	108
VII.	REFERENCIAS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Zonas en el Perú más propensa a la sequía. La zona del Perú más propensa a la sequía viene a ser el Sur Andino, en donde los cultivos están supeditados al riego por Lluvia.....	13
Figura 2.- Esquema de la planta de la papa.....	15
Figura 3.- Efecto del estrés hídrico en los diferentes estadios de crecimiento de la papa.....	21
Figura 4.- Biogénesis de los miRNAs en plantas.....	32
Figura 5: Representación gráfica del sistema aeropónico de cultivo de papa (Otazú, 2010).....	41
Figura 6.- Diseño experimental del tratamiento con estrés hídrico sobre las dos variedades de <i>Solanum tuberosum</i> subsp <i>andigena</i>	46
Figura 7.- Corrida electroforética de los ARNs extraídos a partir de hojas de plantas de papas resistentes y susceptibles a sequía.....	62
Figura 8.- Distribución de las secuencias mapeadas (redundantes y no redundantes) por tamaños de 17 a 30nucleotidos.....	66
Figura 9.- Cantidad de miRNAs identificados en la variedad susceptible y tolerante de papa.....	70
Figura 10.- Representación de las posiciones de los miRNAs identificados a lo largo de los 12 cromosomas.....	71
Figura 11.- Cantidad de miRNAs que variaron su expresión entre la planta control sin estrés y los tratamientos seguidos, con respecto al control.....	73
Figura 12.- Histograma que muestra el número de miRNAs que cambiaron (subieron y bajaron) y no cambiaron su expresión durante los 4 tiempos evaluados.....	75
Figura 13.- Grupos de co-expresión génica. La barra al costado de los grupos de co-expresión que están juntos con los heatmaps representan la escala de los niveles de expresión, en base a su logaritmo de 2.....	78

Figura 14.- Cambios de expresión de los miRNAs candidatos a ser parte del fenotipo de tolerancia al estrés hídrico en papa, durante los tiempos evaluados.....	82
Figura 15.- Plots de los valores de TPM de los 7 miRNAs candidatos a ser parte del fenotipo de tolerancia al estrés hídrico durante los 4 tiempos evaluados.....	83
Figura 16.- Anotación funcional de los genes blanco en base a los procesos biológicos en donde intervienen.....	87
Figura 17.- Anotación funcional de los genes blanco en base a su función molecular.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estimación de los impactos de diferentes tipos de estrés abióticos en la producción de cultivos y en la investigación (visto como número de publicaciones).....	11
Tabla 2.- Variedades de plantas de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>Andigena</i> evaluadas en la tesis.....	40
Tabla 3. Composición de la Solución Nutritiva empleada para el cultivo aeropónico.....	42
Tabla 4.- Muestras evaluadas en el presente estudio. En total son 8 muestras de hojas, 4 de la variedad susceptible y otras 4 de la variedad tolerante.....	47
Tabla 5.- Concentración y coeficiente de los rangos de absorbancia obtenidos de la extracción de ARN con trizol.....	63
Tabla 6.- Cantidad de lecturas durante el pre-prosecamiento de las muestras.....	64
Tabla 7.- Cantidad de lecturas mapeadas en el genoma de la papa.....	64
Tabla 8.- miRNAs identificados dentro de las 8 bibliotecas analizadas. No todos se expresaron en todas las bibliotecas.....	68
Tabla 9.- Genes blanco de los miRNAs candidatos a dar el fenotipo de tolerancia contra el estrés hídrico.....	85

RESUMEN

Para prevenir una extrema pérdida de cultivos a causa de la sequía, se ha realizado investigaciones sobre distintos cultivos modelos y de importancia mundial. Los estudios realizados en la especie cultivable de papa *Solanum tuberosum* en relación a sequía, han correlacionado una gran cantidad de genes con la respuesta a este estrés. Así también, estudios realizados en otros cultivos, han mostrado que los miRNAs, que son una clase de ARNs pequeños no codificantes, regulan la expresión de genes codificantes relacionados a estrés hídrico. Sin embargo, a pesar de que los miRNAs tienen una relevancia en los cambios de expresión genética, aún se sabe poco de su relación con el fenotipo de tolerancia a sequía. Es así que, esta tesis, busca identificar qué miRNAs formarían parte de los genes involucrados en la tolerancia en papa. Con dicho propósito se emplearon 2 variedades de la subespecie andígena (una resistente y otra susceptible a sequía), para comparar la respuesta génica de sus miRNAs durante el estrés hídrico. Por medio del secuenciamiento masivo de ARNs pequeños totales y mediante análisis bioinformático se identificaron 7 miRNAs que se expresaron de manera opuesta entre las dos variedad *S. andigena* frente a dicho estrés: stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009, los cuales vendrían a ser parte de los genes candidatos a dar el fenotipo de tolerancia. Las secuencias reguladas por estos miRNAs estarían involucradas en la producción de antioxidantes, la respuesta a ABA, el desarrollo de la planta, la fijación de CO₂ y el metabolismo de carbohidratos.

Palabras claves: miRNA, sequía, *S.tuberosum subsp. andigena*

ABSTRACT

To prevent extreme loss of crops due to drought, researches have been studying model plants and crops of global importance. On one hand, studies in the cultivated potato species *Solanum tuberosum* have correlated a large number of genes with the response to drought. On the other hand, studies in other crops showed that miRNAs, which are a class of non-coding small RNAs, regulate the expression of coding genes related to water stress. Despite miRNAs having relevance in the regulation of gene expression, little is known about their relationship with the drought tolerance phenotype. Thus, this thesis seeks to identify miRNAs involved in the potato drought tolerance phenotype. For this purpose, 2 varieties of the subspecies andigena (drought resistant and drought susceptible) were exposed to water stress in order to compare miRNAs expression. Through total small RNAs sequencing and bioinformatic analysis, seven miRNAs whose expressions were expressed oppositely on tolerant and susceptible varieties from *S. andigena* were identified: stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-stu-miR8004 and miR8009. These sequences are strong candidate genes that might be implicated in the potato drought tolerance phenotype. Sequences regulated by these miRNAs are putatively involved in antioxidant production, ABA's response, plant development, CO₂ fixation and carbohydrate metabolism.

Key words: miRNA, drought, *S.tuberosum subsp. andigena*

I. INTRODUCCIÓN

La papa, una planta herbácea tuberosa perteneciente a la familia Solaneaceae, es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, ocupando el cuarto lugar en consumo, debido a su alto valor nutricional. Su importancia radica en sus tubérculos que contienen 80% de agua y 20% de materia seca. Esta última constituida por carbohidratos, proteínas, celulosa, minerales y vitaminas A y C. Produce más carbohidratos por hectárea por año que cualquier otro cultivo, exceptuando la caña de azúcar (Kesaulya *et al.*, 2015).

Según la FAO, entre las plantas cultivadas, la papa es la que tiene la diversidad genética más abundante (FAO, 2015). Tanto la papa cultivada como la silvestre presentan varios niveles de ploidía, se tienen desde monoploides ($n=12$) hasta pentaploides ($5n=60$), llegando hasta hexaploide en el caso de las silvestres (Spooner *et al.*, 2007, Hawkes, 1990). Las variedades cultivadas se agrupan en 4 especies, una de ellas es *Solanum tuberosum*, que se divide en dos subespecies, la subsp. *Andigena*, de ploidia variable, adaptada a condiciones de días cortos y se cultiva principalmente en los Andes; y la subsp. *Tuberosum* o también llamado Chilotanum, que es tetraploide, adaptada a condiciones de días largos y es la variedad más cultivada en el resto del mundo (Bradshaw, 2006; Spooner *et al.*, 2007).

Los recursos genéticos de las papas de los Andes Sudamericanos incluyen especies silvestres, especies autóctonas cultivadas, variedades producidas por los agricultores

locales e híbridos de plantas cultivadas. Estas variedades de papas nativas que crecen en zonas alto andinas están sometidas constantemente a condiciones ambientales adversas. Por ello, se cree que dichos genotipos han logrado adaptarse y/o creado mecanismos que les permitan crecer, sobrevivir y producir tubérculos en ambientes en dichas condiciones (Gabriel *et al.*, 2012).

De todas las presiones de estrés, causadas tanto por factores bióticos como abióticos, que vienen afectando a este cultivo, la sequía viene a ser la mayor limitante en su producción a nivel mundial. (Schapendonk *et al.*, 1989; Van Loon, 1981). Este tipo de factor abiótico, viene siendo una importante limitación que ejerce el medio ambiente sobre la producción de papa en las áreas tradicionales del cultivo, en donde el riego se da sólo por las lluvias (Gabriel *et al.*, 2012). Se estima que la sequía causará pérdidas de entre un 18 a 20% en su producción en los próximos 30 años. (Hijmans, 2003).

Ante el estrés hídrico una de las primeras respuestas observadas en la planta es el cierre de estomas, lo cual reduce la absorción de CO₂ para la fotosíntesis. Dentro de las respuestas fisiológicas y bioquímicas que se inducen, se incluyen la acumulación de ácido absícico y de osmolitos, activación de la respiración y síntesis de nuevas proteínas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Yordanov *et al.*, 2003), para lo cual, a nivel celular y molecular, se modifica la expresión de varios genes, en donde se incluyen diversos factores de transcripción. (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Si el estrés es prolongado se produce el marchitamiento a causa de la pérdida

de turgencia en las hojas, lo que conlleva a la reducción del crecimiento y del rendimiento de la planta, ya que disminuye el desarrollo de raíces, tallos y el área foliar (Steyn *et al.*, 1992).

En la región de los Andes encontramos variedades de papa que toleran el estrés hídrico. Según estudios previos, esta tolerancia, se debe a la activación de diversas respuestas fisiológicas y metabólicas que vienen a ser rasgos poligénicos, controlados por un número de genes aditivos y en muchas ocasiones sinérgicos (Bohnert *et al.*, 1995). Los genes de estos germoplasmas tienen el potencial de contribuir al mejoramiento de la papa para las necesidades futuras (Ritter *et al.*, 2008), pero la información acerca de la tolerancia sequía de las papas nativas de los andes aún es escasa (Monneveux *et al.*, 2013).

Una de las metodologías altamente empleadas, en la década de los 90s, para la identificación de genes activos fue la de secuenciar regiones de fragmentos de ADN complementario o cDNA, llamados "EST" (por sus siglas en inglés "Expressed Sequence Tag") (Adams *et al.*, 1991). Para secuenciar estos ESTs era necesario generar cDNA, a partir de los cuales se clonaban las regiones extremas, que vienen a ser los EST, para luego secuenciarlos con la metodología tradicional de esa época, que fue la metodología de Sanger. Si bien la metodología de Sanger fue de mucha utilidad para su época, esta resultaba ser costosa. A pesar de esto, se generaron base de datos de EST de diversas especies, muchos de los cuales fueron empleados

para el diseño de sondas que hibridaban con secuencias de genes de interés para determinar sus expresiones bajo distintos estados.

Con la aparición de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (“New Generation Sequencing” (NGS)), en los 2000s, junto con las potentes herramientas computacionales, se ha reducido el costo del secuenciamiento de genomas y transcriptomas completos. En base a los millones de secuencias cortas producidas por estas nuevas tecnologías, se ha descubierto nuevos genes, y se ha detectado numerosas mutaciones y polimorfismos en tiempos más corto y a un menor costo, si lo comparamos con el uso del método tradicional de Sanger. Estas tecnologías son en la actualidad una herramienta poderosa que es incorporada en los estudios relacionados al mejoramiento genético de plantas (Ray & Satya, 2014). De hecho, con el empleo del NGS se ha secuenciado genomas completos de diversas plantas no modelos, como el café (Denoëud *et al.*, 2014), la uva (Jaillon *et al.*, 2007), la yuca (Prochnik S., *et al.*, 2012), el tomate (The Tomato genome Consortium, 2012), la berenjena (Hirakawa H. *et al.*, 2014) y la papa (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011), entre otros.

El uso de NGS también ha permitido secuenciar el conjunto de moléculas de ARN transcrito por un organismo en un momento dado, llamado transcriptoma, (Wang *et al.* 2009), en diversas especies de plantas. Gracias a esta metodología se han detectado nuevos genes, nuevas isoformas de genes y mutaciones, superando la técnica de microarreglos (Unamba *et al.*, 2015). Este método de secuenciamiento masivo de transcriptomas, llamado RNASeq (Wang *et al.* 2009), está permitiendo

conocer el perfil de expresión de los genes de las plantas en respuesta a diversos tipos de estrés como es el caso de la respuesta al frío, al calor, a la luz y a la sequía, entre otros (Wang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Bhardwaj *et al.*, 2015). Todos estos datos generados, junto con las secuencias genómicas, proveen una herramienta muy útil para los mejoradores.

Recientemente se han realizando estudios enfocados en la identificación de genes de resistencia a sequía en papa empleando la técnica de RNASeq. Junto con esta técnica y gracias a que se tiene secuenciado el genoma completo de la papa (*Solanum tuberosum* Group Phureja DM1-3 516R44) (The Potato Genome Sequencing Consortium., 2011), se tiene identificado un gran número de genes que responden al estrés por sequía. En el 2013 Torres *et al.*, analizó la expresión bajo sequía de una variedad resistente y otra susceptible de *Solanum tuberosum* sbsp. *Andígena*. Comparando los perfiles de expresión, se encontraron entre 887 y 1925 genes inducidos/reprimidos por este estrés en la variedad sensible y entre 998 y 1995 en la variedad tolerante. Por otro lado, Zhang analizó el transcriptoma de hoja de una variedad de *S. tuberosum* tolerante a la sequía llamada “Longshu 3“. Sus resultados mostraron que muchos de los genes de respuesta al estrés están involucrados en la biosíntesis de hormonas, en el ajuste osmótico, rescate celular y en la regulación de la expresión génica. Esto mismo fue observado en el trabajo realizado por Gong *et al.*, el cual analizó el transcriptoma de los estolones de una variedad de papa llamada Ningshu 4. (Torres *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2015).

En la década de lo 90s se descubrieron ARNs pequeños asociados al silenciamiento génico, los cuales, en la actualidad, se sabe que son un componente regulatorio esencial en los eucariotes. Se han realizado marcados progresos hacia el entendimiento de su biogénesis y su función en la célula. Dentro de este grupo de ARNs pequeños, se tienen a los microRNAs (miRNAs) que son moléculas de ARN de cadena simple, codificada por el genoma, de una longitud aproximada de entre 21 y 24 nucleótidos. Se ha observado que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional en plantas, animales, nemátodos y en hongos (Bartel *et al.*, 2004). Estos miRNA actúan sobre los ARNs mensajeros (ARNm) cortándolos, reprimiendo su expresión y por tanto evitando a que se traduzcan en proteínas. De esta manera regulan el número de moléculas proteicas producidas por los ARNm en un tipo celular específico y en un estado de desarrollo en particular (Sunkar *et al.*, 2012).

En las plantas, los mecanismos regulatorios mediados por los miRNAs están involucrados en varios procesos biológicos importantes, en donde se incluye el tiempo de desarrollo, la defensa contra la invasión de patógenos y la respuesta al estrés medioambiental (Sunkar *et al.*, 2012). El primer estudio sobre la respuesta de los miRNAs frente al estrés abiótico, fue realizado en *Arabidopsis* en el año 2004. Los resultados mostraron que el miRNA llamado miR169 es regulado negativamente a través de una ruta dependiente del ácido abscísico, para controlar la expresión de un factor de transcripción, el NFYA5, el cual es uno de los mediadores para la tolerancia a sequía. (Sunkar *et al.*, 2004). A partir de esta publicación surgieron muchas otras, incluso en papa.

Si bien se ha identificado miRNAs de papa, empleando predicciones in silico a partir de ESTs (Zhang *et al.*, 2009, Xie *et al.*, 2011), así como por secuenciamiento por RNASeq (Hwang *et al.*, 2011 & Zhang *et al.*, 2014-1), poco se sabe acerca de cómo actúan frente al estrés por sequía, sobre todo teniendo en cuenta que los estudios previos emplearon variedades de las cuales no mencionan el grado de tolerancia a este tipo de estrés. Estos estudios identificaron a stu-miR156a y stu-miR157a (Hwang *et al.*, 2011) y a miR3437, miR1076, miR4375, miR3695, miR1037, miR3637, miR1867, miR4235, miR2099 y miR2109 como los miRNAs relacionados a la respuesta a sequía (Zhang *et al.*, 2014-2). Dentro de los genes que regulan estos miRNAs se encontraron factores de transcripción (MYB, bZIP, WRKY), enzimas (trealosa sintasa) y proteínas funcionales (acuaporinas), los cuales se sabe que interviene en la respuesta frente al estrés por sequía. Estos resultados muestran la participación de los miRNAs en respuesta a este estrés regulando la expresión de los genes. Sin embargo, si se quiere encontrar genes de resistencia a un factor de estrés, es necesario realizar estudios en variedades resistentes.

En el Perú, se cuenta con variedades de papas nativas que tienen fenotipos resistentes a diversos factores, dentro de ellos, la sequía. Muchas de estas variedades, que han desarrollado naturalmente dicha resistencia, aún no se encuentran caracterizadas genéticamente. *S. tuberosum* subsp. *Andigena*, es un grupo muy importante dentro de las papas que crecen en el antiplano andino (2000- 4000 msnm), ya que contiene un pool genético de gran importancia para el mejoramiento de otros cultivares de papa. Dentro de la gran variedad, tanto morfológica como fisiológica que contiene este

grupo, se pueden encontrar genes de resistencia a diferentes factores tanto bióticos (PVY, PVX, nemátodos, etc) como abióticos (sequía, heladas) (Huaman 1983, Ross 1986; Hawkes, 1990).

Como contribución a todo el conocimiento generado en la actualidad, esta tesis tiene como objetivo identificar y analizar los miRNAs que se encuentren regulando la respuesta de genes bajo estrés hídrico, simulando la sequía, en base al estudio de dos variedades de papa nativas *S. tuberosum* subsp. *Andigena*, una resistente y otra susceptible. Este estudio, que es una primera aproximación a la búsqueda de genes miRNAs relacionados a la resistencia de papa a sequía empleando secuenciamientos masivos, identifica nuevos miRNAs que intervienen en el mecanismo de la tolerancia a este estrés en particular y que pueden ser explotadas aplicando el conocimiento resultante hacia la mejora de las variedades susceptibles que están en riesgo debido al cambio climático.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Planteamiento del problema

En la actualidad, el calentamiento global amenaza la productividad de varios cultivos importantes a nivel mundial. Los modelos de cambio climático predicen pérdidas en rendimiento de los cultivos debido a futuras sequías en muchas regiones del mundo (Van Loon, 1980).

La papa, un cultivo ampliamente distribuido a nivel mundial, es generalmente considerada como sensible a la sequía y esto limita su producción a áreas con adecuada irrigación. Se estima su pérdida entre 18 a 20% en los próximos 30 años a causa de este estrés medio ambiental (Hijmans, 2003). Dentro de la región de los Andes se tiene una gran variedad de papas de la subespecie andígena, las cuales han sido reportados como tolerante a diversos factores tanto bióticos como abióticos (Gabriel *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento se tiene muy pocos estudios a nivel molecular sobre estas variedades resistentes, que vienen a ser un banco de genes de gran importancia para la agricultura.

En los últimos años, los estudios han revelados que hay un grupo de pequeños ARNs llamados miRNAs, que tienen una participación importante en la respuesta a diversos tipos de estrés, entre ellos a la sequía. Sin embargo, aún se sabe poco acerca de su papel frente a la sequía en papa, ya que los estudios que se tiene no se enfocan en variedades tolerantes a este estrés (Zhang *et al.*, 2014-2), dentro de las cuales se albergan los genes de miRNAs de resistencia a este factor. Debido a esto, hasta el

momento no se han identificado miRNA, en sí, que intervienen en la tolerancia al estrés hídrico en papa.

2. Marco teórico – Antecedentes

2.1. Sequía

2.1.1. El problema de la sequía.

Por definición, la sequía es un período en el cual una región tiene un déficit de suministro de agua sobre un extenso lapso de tiempo. Esto da como resultado un daño significativo a los distintos cultivos, provocando la disminución o pérdida en sus rendimientos (Kramer, 1983). La severidad del daño es influenciada por diferentes factores: por la capacidad de almacenamiento de humedad de los suelos, por la demanda de evaporación, y por la cantidad y la distribución de la lluvia (Wery *et al.*, 1994). Dicha severidad podría incrementar debido a la tendencia del cambio climático que se está dando a nivel mundial (Le Houérou, 1996).

Los avances en la tecnología de irrigación en algunos casos han logrado aminorar el problema, sin embargo, los costos de irrigación y el limitado abastecimiento de agua restringe el riego en muchas partes del mundo. Esta escasez de agua conlleva a que la productividad de las plantas sea severamente afectada por la sequía. En general, el estrés abiótico es la principal causa de pérdidas en el rendimiento de cultivos a nivel mundial. En 1982 Boyer indicó que el factor medioambiental podría provocar una pérdida de la producción de más del 50% de los principales cultivos que se tiene

(Boyer *et al.*, 1982). Por otro lado, un reporte escrito por la FAO indicó que sólo el 3.5% del área global de suelos no es afectada por algún factor medioambiental. (FAO, 2007). Este reporte, además, indicó que el estrés abiótico que afecta a más áreas a nivel global viene a ser la sequía. (Tabla 1). Según Pennisi ésta es considerada como el factor medioambiental más complejo y devastador a nivel mundial (Pennisi, 2008).

Tabla 1.- Estimación de los impactos de diferentes tipos de estrés abióticos en la producción de cultivos y en la investigación (visto como número de publicaciones).

Tipo de Estrés	% de la superficie mundial terrestre afectada *	% de la superficie mundial de tierras rurales afectadas **	Número de publicaciones ***
Estrés abiótico			33,012
Agua			4819
Déficit o sequía	64	16	4137
Inundaciones o anoxia	13	10	682
Temperatura			9365
Frío	57	26	3798
Helada			187
Altas temperaturas			5380
Luz			7659
Bajo			3081
Alto			4578
Químico/Suelo			10390
Salinidad	6	6	3498
Deficiencia de minerales o baja fertilización	9	39	222
Toxicidad de minerales			437
Suelo ácido	15		3646
Aire contaminado			
Ozono			1369
Dióxido de sulfuro			378
Elevado CO ₂			840
Miscelaneo(ej. Viento, mecánico, etc)			779

* Basado en "FAO World Soil Resource Report 2000" <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/wsr.pdf>.

** Basado en las tablas 3.6 y 3.7 del reporte de la FAO del 2007 <http://www.fao.org/docrep/010/a1075e/a1075e00.htm>

*** Basado de simples búsquedas dentro de la base de datos del PubMed realizados entre el 2001 y el 2011

Fuente: Cramer *et al.*, 2011

2.1.2. Sequía en Perú

En el Perú las sequías se presentan con frecuencia e intensidad irregular, afectando la actividad agropecuaria, la producción de hidroenergía eléctrica e incluso el

abastecimiento normal de agua potable en las ciudades. Sin embargo, los daños provocados por ella inciden fundamentalmente en la agricultura, provocando pérdidas económicas mayores en las áreas que dependen directamente de la lluvia (agricultura de secano). En la sierra, ubicada mayormente en la vertiente del Atlántico, aproximadamente el 95% de las tierras de cultivo se labran en secano (1'200,000 ha). Es así que los períodos críticos afectan en forma inmediata a la producción agrícola, impactando severamente la economía de la población. Los rendimientos de las cosechas disminuyen y cuando se presentan períodos largos con deficiencias de lluvia del 20% y períodos cortos con 30%, las cosechas se pierden totalmente debido a que los cultivos en su mayoría son cultivos alimenticios de raíz pequeña. En el Perú, las sequías afectan severamente la zona sur andina, en donde la temporada de lluvias se inicia en diciembre y termina en abril. Las zonas más afectadas a las sequías del sur andino son: Puno (la que tiene mayor vulnerabilidad), Cusco, Tacna, Moquegua, Arequipa y Apurímac; algunas veces, extendiéndose hacia Ayacucho y Huancavelica. (PREDES, 2011; Pardo & Castillo 2013) (Figura 1). Los daños causados por la sequía en la agricultura hacen que sea necesario incrementar la productividad en las áreas afectadas por este estrés de tipo abiótico, para satisfacer la demanda de alimentos. El mejoramiento genético de los cultivos de la tolerancia a la sequía viene a ser una estrategia importante para mejorar la productividad de los cultivos que se encuentran en condiciones agrícolas no óptimas. Para esto es necesario estudiar las respuestas moleculares al estrés por sequía, las cuales involucran interacciones entre muchas rutas metabólicas en las plantas.

Figura 1.- Zonas en el Perú más propensa a la sequía. La zona del Perú más propensa a la sequía viene a ser el Sur Andino, en donde los cultivos están supeditados al riego por lluvia.



Fuente: <http://www.preDES.org.pe/sequias>

2.2. La papa

La papa, perteneciente a la familia Solanaceae, es el cuarto cultivo de importancia a nivel mundial, luego del arroz, trigo y el maíz. Sus mayores productores a nivel mundial son China y la India, los cuales han desarrollado una tecnología muy bien implementada para generar una producción alta de este cultivo. (FAO, 2012).

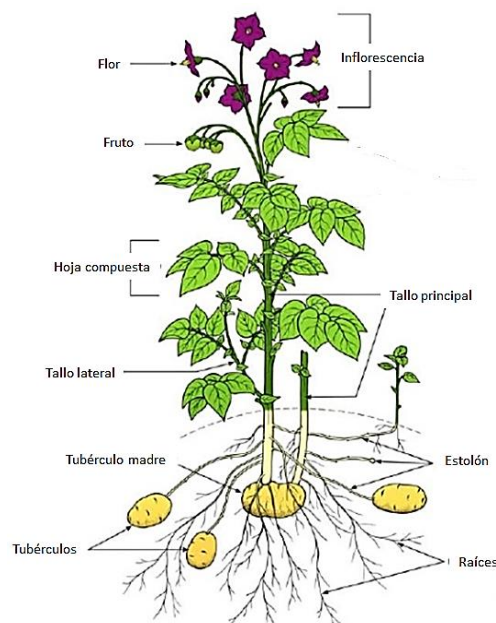
La distribución de las diferentes especies de papa es muy amplia en los Andes y en general en el mundo entero. Abarca no solamente casi todas las latitudes y continentes, sino igualmente un rango de altura que va desde el nivel del mar hasta 4 300 msnm. En este sentido es posiblemente el cultivo de mayor versatilidad climática y ecológica (Tapia & Fries, 2007).

Morfológicamente, *Solanum tuberosum*, que es la papa comúnmente sembrada, es una planta herbácea tuberosa con un crecimiento erecto o semierecto. Su tubérculo, que es la parte económicamente significativa de la planta, funciona como un órgano de reserva y de almacenamiento masivo para una gama de macromoléculas, principalmente almidón y proteínas. Este tubérculo es producido bajo el suelo como protuberancia a lo largo de los tallos modificados llamados estolones, y además es el principal propágulo, a las cuales llaman “semilla tubérculo”, aunque también puede reproducirse a partir de verdaderas semillas (Tapia & Fries, 2007).

Según la variedad, la planta varía de tamaño entre 0,30 y 1 m de alto. Del mismo modo, los tubérculos varían en tamaño, en forma y en color de la piel y la pulpa. Las hojas son compuestas pinadas, la flor es bisexual (es decir que tiene estambres y pistilos), y los colores de la corola varían de blanco a un color morado oscuro y rosado. El fruto maduro es una baya generalmente de color verde oscuro que contiene las semillas, denominadas semillas botánicas, para diferenciarlas de la semilla tubérculo. (Bradeen & Kole, 2011). (Figura 2).

La papa es esencialmente un “cultivo de clima templado”, para cuya producción la temperatura representa el límite principal: las temperaturas inferiores a 10° C y superiores a 30° inhiben drásticamente el desarrollo del tubérculo, mientras que la mejor producción ocurre donde la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18° a 20° C (FAO, 2008).

Figura 2.- Esquema de la planta de la papa.



Fuente: <http://cipotato.org/potato/how-potato-grows/>

2.2.1. Centro de origen y diversificación de la papa cultivada.

Según Hawkes, el origen de la papa se localiza en los Andes del Sur del Perú y del norte de Bolivia, en donde se encuentran abundantes especies silvestres (Hawkes, 1978), siendo apoyado por estudios genéticos (Spooner, *et al.*, 2005). Probablemente a partir de estas poblaciones silvestres, se seleccionaron las primeras papas cultivadas entre 6000 y 10000 años atrás, siendo la región del lago Titicaca el lugar donde se dieron los primeros cultivos. (Hawkes, 1978).

La primera especie cultivada que se originó en los Andes sería una especie diploide, ($2n = 2x = 24 = AA$), la cual se habría originado de sus antecesores silvestres *Solanum canasense* y *Solanum multidissectum* ampliamente distribuidos en el centro sur del Perú altoandino. Esta primera especie diploide llamada *S. stenotomum* por medio de poliploidizaciones sexuales entre sus diferentes genotipos daría lugar a la emergencia de un nuevo cultivar tetraploide llamado “andígena” (*S. tuberosum* subsp. *Andígena*). Esta subespecie adaptada a días cortos, fue transportada a ambientes con días largos, en donde ocurrieron eventos de adaptación. Según Hawkes estos eventos ocurrieron dos veces, primero en su llegada a Chile, en la isla Chiloé en el archipiélago Chonos, donde se piensan que se originó la subespecie “tuberosum” (*S. tuberosum* subsp. *Tuberosum*), y segundo, a su llegada a Europa, al ser introducida por los españoles. El primer registro de la papa fuera de Sudamérica data de 1562 dentro de las islas Canarias. Esta llegó a ser rápidamente cultivada en Europa y luego en el mundo entero. (Hawkes, 1978). Desde entonces y durante muchos años la selección y los cruces transformaron a la papa en cultivares modernos con colores y

formas uniformes y con cualidades agronómicas mejoradas tales como la resistencia a enfermedades y en el rendimiento.

2.2.2. Ciclo de vida

El crecimiento y el desarrollo de la planta de papa pueden ser divididos en dos conjuntos principales de eventos:

(1) Eventos que ocurren arriba del suelo, en donde se tiene la germinación/brotación, el desarrollo de hojas, la formación de brotes laterales, el crecimiento longitudinal, la aparición del órgano floral, la floración, la formación de frutos o bayas (que contiene las llamadas “semillas verdaderas”) y la senescencia. (Meier, 2001).

(2) Eventos que ocurren por debajo del suelo, que viene a ser todo lo relacionado a la formación de tubérculos: a) Brotación del tubérculo, b) la aparición y el crecimiento de los estolones, c) la tuberización, d) el llenado del tubérculo y e) la madurez. (Ewing & Struik, 1992).

Con respecto al ciclo de vida de la papa en base al proceso de formación de tubérculos, el desarrollo de la planta inicia con la brotación de un “tubérculo semilla”. Este tubérculo madre viene a ser una pieza importante durante el crecimiento de la planta, pero llega a ser menos importante una vez que la nueva planta se establece. Cuando se inicia la brotación, el almidón es hidrolizado y los niveles de azúcar comienzan aumentar, esto provee carbono y energía para el crecimiento (Strand, 2006). Experimentos han mostrado que la giberelina y las citoquinas están involucradas en este proceso, mientras que se le considera inhibidor al ácido abscísico

y al etileno (Smith & Rappaport, 1961; Suttle, 1998). A todo el período que comprende desde el inicio de esta brotación hasta la aparición de nuevos tubérculos cosechables se le conoce como “crecimiento vegetativo”. En este período se da el crecimiento de raíces, y de la planta en general.

Durante el crecimiento de la planta, bajo condiciones de días cortos (días con menos de 13 horas luz), en las hojas se sintetiza un derivado del ácido jasmónico, llamado ácido tuberónico, este es transportado hacia los estolones, en donde se dispara la formación de los tubérculos. Además de la cantidad de horas luz, la formación de tubérculos también necesita de otras señales ambientales específicas como tener una alta intensidad de luz y niveles bajos de nitrógeno. (Ewing y Struik, 1992). En esta etapa de tuberización también se da inicio a la floración.

El desarrollo del tubérculo inicia con el alargamiento de las células de la médula ubicadas en la región sub-apical del estolón, seguido rápidamente por divisiones de las células del parénquima. Las comunicaciones floemáticas entre hoja y tallo, y entre tallo y tubérculo, permiten que haya una acelerada descarga de fotoasimilados, los cuales llenan los mencionados órganos de reserva (Viola, 2007). La etapa de llenado del tubérculo es un período crítico para el rendimiento y la calidad de estos, y es también conocido como la “fase del crecimiento lineal del tubérculo”. La interrupción de las condiciones ideales puede resultar en la disminución del crecimiento del tubérculo y en la pérdida de tanto la calidad como la cantidad de

tubérculos, siendo la actividad fotosintética y la duración del dosel de hojas dos factores importantes que influyen esta etapa (Strand, 2006).

En la etapa de madurez las hojas se tornan amarillas y caen, y la fotosíntesis disminuye. La maduración del tubérculo está en función del equilibrio hormonal, especialmente por el descenso de auxinas y giberelinas en las yemas, el incremento de ácido abscísico y el descenso en los niveles de citoquininas. Las enzimas degradadoras de almidones como α -amilasa y β amilasa tienen baja actividad, no se rompen las cadenas de almidón y por tanto los sustratos respiratorios son bajos y el tubérculo permanece estable en peso y en actividad metabólica (Suttle, 2004).

La dormancia puede ser considerada desde el inicio de la tuberización hasta cuando las yemas son capaces de extender su crecimiento. Lo definen como el estado del tubérculo en que no ocurre un crecimiento autónomo, incluso cuando hay condiciones naturales ideales para la brotación. En este estado hay metabolismo activo, pero a nivel muy bajo. Cuando la dormancia termina y empieza la brotación, la respiración cae, pero la síntesis de proteínas, ARN y ADN continúan e incrementa (Tuan & Bonner, 1964).

La duración de todas estas etapas depende de los factores medioambientales, tales como la temperatura, humedad, localización geográfica, y del cultivar en sí.

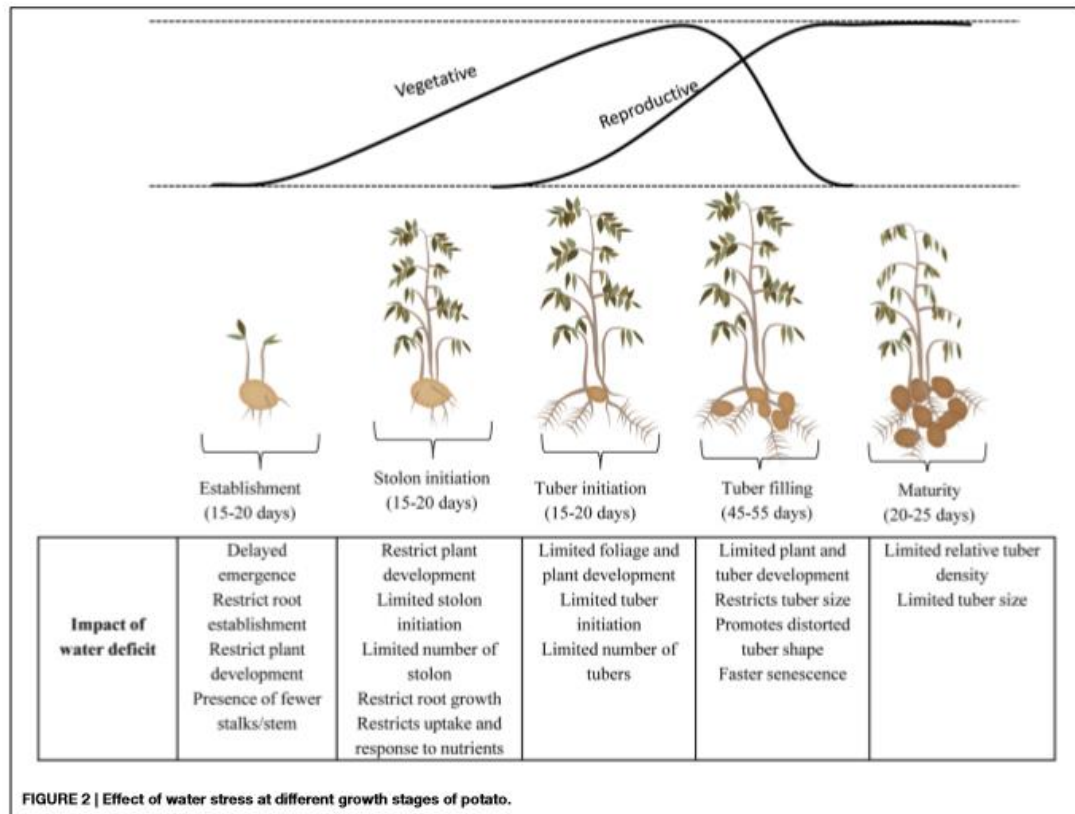
2.3. Los efectos de la sequía en la papa

El déficit de agua en la planta se produce cuando la acumulación de agua en el suelo desciende por debajo de un nivel crítico. Para el cultivo de la papa, el estatus de humedad en el suelo se vuelve crítico cuando el porcentaje de agua cae por debajo de 60-65%.

La sequía tiene efectos negativos en la productividad o rendimiento de la planta, siendo este rendimiento una correlación con el índice de cosecha y el contenido de materia seca. Sin embargo, la sequía en la papa no sólo reduce el rendimiento, sino también la calidad del producto, por ejemplo, incrementando la incidencia de costras en el tubérculo (Mane *et al* 2008).

La pérdida en el rendimiento depende de la fase de crecimiento de la planta (Figura 3) en donde afecta la sequía, reduciendo indirectamente la tasa fotosintética, la fijación de CO₂ y finalmente resulta en menos productos asimilados para el tubérculo. Así mismo, el patrón de respuesta de la planta a la sequía se da en base a la intensidad, la duración y la velocidad de la progresión del estrés. (Obidiegwu *et al.*, 2015).

Figura 3.- Efecto del estrés hídrico en los diferentes estadios de crecimiento de la planta de papa. Si bien la planta de papa necesita mayor cantidad de agua en la etapa de inicio de la tuberización y de llenado del tubérculo, el estrés hídrico repercute en el rendimiento de la planta en todas sus etapas de crecimiento.



Fuente: Obidiegwu *et al.*, 2015

El efecto en el rendimiento es el resultado de los efectos de la sequía en determinados niveles de la planta como son el morfológico, el fisiológico y el bioquímico. A nivel morfológico, a causa del déficit de agua se reducen el número de hojas, el área foliar y hay poco crecimiento de la planta. A nivel fisiológico, la sequía afecta el proceso de fotosíntesis, limitando así la cantidad de fotosintatos que se transportan hacia los órganos receptores. Bajo condiciones de estrés leve a moderado, la disminución en la fotosíntesis es afectada principalmente por el cierre de estomas, mientras que, bajo un

estrés severo, los factores no estomáticos dominan las limitaciones. (Flexas *et al.* 2004, 2006).

El cierre de estomas ayuda a mantener un adecuado estatus de agua en la hoja, pero al mismo tiempo reduce, además de la fotosíntesis, la concentración interna de CO₂ por una reducción en la tasa de transpiración, que al mismo tiempo incrementa la temperatura de la cubierta vegetal. (Chaves *et al.*, 2002). En condiciones normales, el primer mecanismo que regula la apertura de los estomas son las rutas de transducción de señales de luz de las células de la guardia; mientras que bajo condiciones de estrés, el mecanismo del comportamiento de los estomas es influenciado por el ácido abscísico (ABA). (Liu *et al.*, 2010; Jia & Zang, 2008). ABA es una señal principal de estrés que viaja desde la raíz hacia las hojas en plantas bajo condiciones de sequía. (Davies & Zhang, 1991). Esta hormona dispara el incremento de calcio intracelular en las células de la guardia produciendo la reducción de la apertura del estoma. Otras señales hormonales enviadas a los brotes son el etileno y el ácido giberélico (GA). Mientras que ABA va hacia células de las hojas maduras, el etileno y el GA responden en células de hojas en división o expansión. (Verelst *et al.*, 2010)

A nivel bioquímico y molecular, las plantas perciben y responden al estrés por sequía dinámicamente con cambios en la transcripción de genes y en la expresión de proteínas, afectando muchas rutas metabólicas y consecuentemente a los procesos fisiológicos y de desarrollo. (Mane *et al.*, 2008). Con respecto a los cambios bioquímicos, al nivel del transporte de electrones, la disminución de la asimilación

del CO₂ lleva a una regeneración reducida de NADP⁺ en el ciclo de Calvin, resultando en una generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un potencial daño foto-inhibitorio. Por otra parte, la disminución de la concentración intracelular del CO₂, reduce la función de carboxilación de la RuBisCo y favorece la función de oxigenación, lo cual también contribuye a la producción de ROS. En respuesta a los daños oxidativos, la planta tiende a aumentar la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la glutatión-S-transferasa, entre otras. (Legay *et al.*, 2011). Por otro lado, también se altera la cantidad de metabolitos en las células. Bajo estrés hídrico los aminoácidos, como la prolina y glicina betaína, y azúcares se acumulan para mantener el balance osmótico. Al perderse dicho balance no sólo se produce un daño por desecación, sino también se ven afectadas las estructuras proteicas, por lo cual, para estabilizar sus conformaciones se induce la producción de chaperonas como son las HSPs (Heat Shock Proteins) y las LEAs (Late Embriogenesis Abundant). (Legay *et al.*, 2011).

Diferentes rutas de señalización inician cascadas de fosforilación y activan factores de transcripción apropiados que disparan una respuesta celular bajo sequía. Estas señales pueden ser independientes o dependientes a ABA y actúan sobre distintos factores de transcripción, como DREB/CBF (dehydration responsive element/C-repeat) en el primer caso, y MYC y MYB en el segundo caso. Estos factores de transcripción regulan la expresión de genes como una respuesta primaria de la planta resultando, en algunos casos, en una adaptación al estrés.

Los mecanismos descritos líneas arriba se incluyen dentro de las distintas estrategias que han desarrollado las plantas de responder a las sequías, como son: el escape, el evitamiento, la tolerancia, y la recuperación; las cuales no son mutuamente excluyentes y ofrecen al cultivo la capacidad de resistir la sequía en un período dado (Ekanayake, 1992). La estrategia de escape, permite a la planta completar su ciclo de vida durante el período de suficiente suministro de agua antes del inicio de la sequía. El evitamiento, incluye estrategias que ayudan a la planta a mantener un alto estado hídrico durante periodos de estrés, mediante una eficiente absorción de agua por las raíces o reduciendo la evapotranspiración de las partes aéreas. El mecanismo de tolerancia permite a la planta mantener el turgor y continuar el metabolismo incluso con un bajo potencial hídrico, esto por tolerancia protoplásmica o síntesis de osmoprotectores, osmolitos o solutos compatibles, ya mencionados. La recuperación, es la capacidad de la planta para reestablecer su aparato fotosintético y sus principales funciones vitales una vez que la sequía termina (Manavalan *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de que la planta ejerce esas 4 estrategias, su exposición prolongada a sequía conlleva a daños irreparables en las células de la planta, incluyendo daños en las proteínas, en los lípidos de membrana y en el ADN, que resulta en la muerte anticipada de planta.

2.3.1. El transcriptoma y la expresión génica durante la sequía

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos presentes en una célula para un estado de desarrollo o condición fisiológica específica. Entender el transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los

constituyentes moleculares de células y tejidos, y también para entender el desarrollo y las enfermedades (Wang., *et al* 2009). Se han desarrollado muchas técnicas que permiten revelar el perfil transcriptómico de una muestra bajo condiciones específicas; dentro de los más usados están lo microarreglos y el RNASeq. Este último provee una medida más precisa de los niveles de expresión de los transcritos y sus isoformas, en comparación a otros métodos (Wang., *et al* 2009).

Los estudios sobre los niveles de expresión bajo la condición de sequía muestran la activación o la represión de distintos genes que intervienen en distintas rutas metabólicas ya comentadas anteriormente. Un estudio realizado en papa en el 2011 por Legay *et al.*, empleando microarreglos, mostró la diferencia en los cambios de expresión de genes durante sequía entre una planta resistente (397077.16, una variedad mejorada que mantiene su rendimiento bajo condiciones limitada de agua) y una susceptible a sequía (Chanchan) (Legay *et al.*, 2011). La planta resistente mostró una alta expresión de genes relacionados a la síntesis de compuestos protectores, a la detoxificación de ROS, y para mantener la estructura de las proteínas, en comparación con la variedad susceptible, la cual mostró una pequeña variación en la expresión de dichos genes. Esto indicaría que la habilidad de enfrentar el desequilibrio osmótico y los daños celulares estaría relacionada con el fenotipo de tolerancia de la planta (Legay *et al.*, 2011). Por otro lado, secuenciando el transcriptoma de hoja, empleando la técnica de RNASeq y una variedad tolerante de papa bajo estrés por sequía (Loshua, de China), se mostró lo complejo que es dicha característica tolerante. Dentro de esta respuesta compleja se vio una alta expresión

de genes involucrados en la estabilización de la membrana celular y en el fortalecimiento de la pared celular, en donde se incluyen proteínas de unión a lípidos y proteínas transportadoras de lípidos, proteínas de la pared celular y sintasas de ceras. Según este resultado, y dado que las membranas sufren procesos degenerativos por la sequía, se menciona que el punto clave en el mecanismo a tolerancia es la adaptación de los lípidos de membrana a las condiciones de este estrés hídrico. Del mismo modo, los genes que codifican factores de transcripción, como MYB y AP2/ERF, WRKY; los genes relacionados al metabolismo de carbohidratos, como la chalcona sintasa; genes relacionados al ajuste osmótico en el rescate celular, como los que intervienen en la síntesis de prolina; y genes relacionados en la comunicación celular, como quinasas y fosfatasas, incrementaron su expresión bajo estrés por sequía. (Zhang *et al.*, 2014-1).

2.4. microARNs (miRNAs)

2.4.1. Concepto

Los microARNs (miRNAs) son ARNs pequeños, endógenos, y de aproximadamente 21 a 24 nucleótidos en tamaño. Estos se unen a ARNs mensajeros blanco, o también llamados “targets”, inhibiendo su expresión ya sea cortándolos o inhibiendo su traducción, en una célula específica y en un tiempo o estado de desarrollo determinado, tanto en plantas como en animales. Debido a esto, los miRNAs son considerados como importantes reguladores de la expresión a nivel post-transcripcional, regulando así la producción de un gran número proteínas. Estudios

previos han mostrado que hay miRNAs especie-específico, así como miRNAs que son conservados a través de varias especies, esto último reflejaría un origen ancestral del mecanismo regulatorio basado en estos miRNAs. (Cuperus *et al.* 2011).

El silenciamiento de los genes blanco de los miRNAs en el tiempo y lugar apropiado permite que una planta crezca y complete su ciclo de vida normalmente. De la misma manera, la regulación controlada por esto miRNAs es necesaria para la adaptación de la planta frente a diferentes tipos de estrés tanto bióticos como abióticos.

2.4.2. Descubrimiento

Hasta el año 1993 se había reportado que un gen llamado lin-4, que actúa en el desarrollo temprano larval de *Caenorhabditis elegans* y que es esencial para un control en el tiempo de diversos eventos de desarrollo post-embriónico, actuaba regulando negativamente los niveles de la proteína LIN-14 (producto del gen lin-14) (Arasu *et al.*, 1991). Así mismo se había reportado que para tal disminución de los niveles de esta proteína, que era temporal, se necesitaba, además de lin-4, de la región 3'UTR de lin-14 (Wightman *et al.*, 1991). A partir de estos datos el laboratorio liderado por Ambros, analizando la secuencia genómica del gen lin-4, descubrió que dicho gen no codifica para la formación de una proteína. Sin embargo, producía dos moléculas de ARN pequeño, uno de 22nt (lin-4S) y otro de 61nt (lin-4L), siendo ambas secuencias productos funcionales del gen. Al evaluar las estructuras secundarias de ambos ARNs, observaron que lin-4L poseía una estructura en forma

de “stem-loop”. La complementariedad encontrada entre estos ARNs con el 3’UTR de lin-14 apoyaba la idea de que los ARNs de lin-4 podrían regular la traducción de lin-14 a través de un mecanismo de antisentido. Como la concentración de lin-4S era más abundante que lin-4L, se propuso la idea de que lin-4S jugaba el rol principal en el apareamiento de bases con el ARN lin-14. (Lee *et al.*, 1993). Por su parte al mismo tiempo, el laboratorio liderado por Gary Ruvkun, demostraba que la regulación de la expresión de Lin-14 dada por lin-4 era un evento post-transcripcional y que el 3’UTR de lin-14 era suficiente para que se dé la regulación temporal en la larva. (Wightman *et al.*, 1993).

Luego de 7 años se reportó un nuevo gen cuyo producto de expresión funcionaba de manera similar a lin-4. Dicho gen, que era let-7, también controlaba una de las etapas en el desarrollo de *C. elegans*, el paso del estadio larval L4 al estadio adulto. Se observó que let-7 transcribía un ARN no codificante de 21nt y su expresión estaba relacionada negativamente con la presencia de la proteína LIN-41, como en el caso de lin-4 con lin-14. Los resultados mostraron que el ARN era el producto funcional del gen y que también necesitaba de la región 3’UTR del gen al que inhibía, en este caso lin-41. Además, se observó que la secuencia de lin-7 era muy conservada entre dos especies: *C. elegans* y *C. briggsae*. (Reinhart *et al.*, 2000). Más tarde un estudio mostró que esta conservación no sólo se daba entre estas dos especies, sino que abarcaba a un rango más amplio de animales: ascidios, hemicordados, moluscos, anélidos, artrópodos y vertebrados, en donde se incluía a los humanos. Debido a su expresión en estadios determinados, en un comienzo lo denominaron “small temporal

RNA” (stRNA). (Pasquinelli *et al.*, 2000), para un año después acuñarle el nombre de “microRNA o miRNA” en 3 publicaciones que salieron al mismo tiempo. (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001). Luego gracias a los esfuerzos realizados en su búsqueda a través del clonamiento, se reveló una abundancia de estas moléculas en Arabidopsis. (Llave *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002, Reinhart *et al.*, 2002).

2.4.3. Biogénesis

En plantas, la biogénesis de un miRNA comienza con la transcripción de su gen realizado por la RNA polimerasa II (Pol II). Se ha reportado que un gen de miRNA puede encontrarse tanto en una región intergénica como dentro de una región que alberga un gen codificante, pudiendo estar ya sea dentro de un intrón o de un exón (kim & Nam, 2006; Du & Zamore, 2005). En el segundo caso, estudios han mostrado que los niveles de expresión del miRNA y de su gen hospedero son usualmente similares (Baskerville & Bartel, 2005).

La transcripción produce un transcrito primario llamado “pri-miRNA”, que tiene una estructura en forma de de “stem-loop” imperfecto. Este pri-miRNA tienen unido un grupo grupo 7-metil-guanilato (m7G) en el extremo 5’ y una región poliadenilada en el extremo 3’ (Dong *et al.*, 2008).

El procesamiento del pri-miRNA ocurre en el citoplasma, y entre los factores involucrados en tal procesamiento se tiene a 3 proteínas: una con dominio dedo de zinc del tipo C2H2, llamada SERRATE (SE), otra proteína de unión a doble cadena llamada HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) y a un miembro de la familia Dicer que cliva ARNs de doble cadena, que viene a ser DCL1. Se piensa que HYL1 y SE estabilizan la estructura plegada del pri-miRNA y están involucradas en dar exactitud a la actividad de DCL1 para el procesamiento del pri-miRNA. (Dong *et al.*, 2008).

DCL1 realiza cortes al pri-miRNA liberando, en primera instancia, a un intermediario con estructura de “stem-loop” llamado pre-miRNA, el cual es rápidamente procesado para que a partir de éste se libere un dúplex formado por el miRNA y una cadena pasajera llamada miRNA estrella (miRNA*). Luego, una metiltransferasa de ARN pequeños llamada “Hua Enhancer1” (HEN1), reconoce el dúplex de ARNs pequeños (miRNA/miRNA*) y deposita un grupo metilo en la posición 2'-OH del terminal 3' de la ribosa de cada cadena de ARN. Se cree que este grupo 2'-O-metil estabiliza el miRNA in vivo protegiéndolo de los ataques exonucleóticos o de alguna otra modificación. (Li *et al.*, 2005).

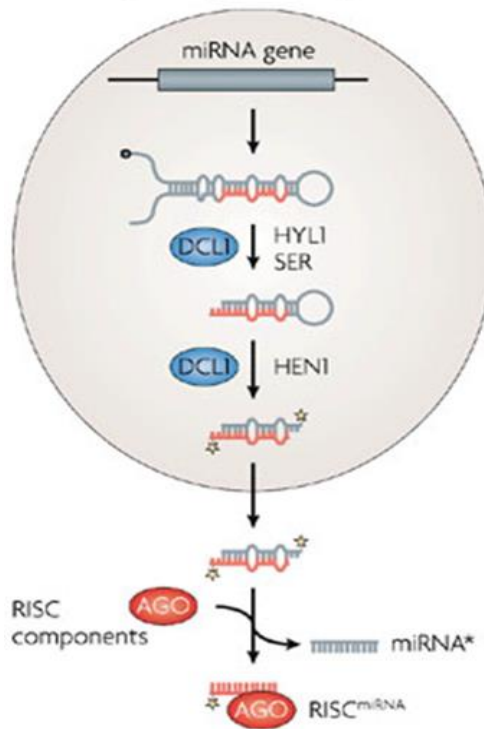
Este dúplex metilado es transportado hacia el citoplasma en donde la cadena de miRNA madura se asocia con una proteína Argonauta (AGO) para formar un complejo de silenciamiento inducido por ARN llamado RISC (“RNA-induced silencing complex”). AGO tiene un dominio PIWI que tiene una actividad catalítica

de endonucleasa capaz de clivar al ARN blanco, complementario al miRNA. (Figura 4).

En las plantas, el clivaje es el mecanismo principal por el que se da la inhibición mediada por los miRNA, los cuales tienen una alta complementariedad con sus genes blanco. Se ha observado que este alto grado de complementariedad es requerida para el clivaje del gen blanco por parte de la proteína AGO. (Mallory *et al.*, 2004). Así mismo se ha visto que los “mismatches” ocurridos en el centro de la región complementaria entre el miRNA/mRNA tiende a inhabilitar el clivaje, sin embargo, como dichos mRNAs aún están unidos al complejo RISC éstos aún quedan bloqueados impidiendo la traducción (Brodersen *et al.*, 2008).

La similitud entre las secuencias de los miRNAs maduros, ha hecho de que los miRNAs sean categorizados en diferentes grupos, llamados familias. Los miRNAs dentro de estas familias, que por lo general tienen de 0 hasta dos nucleótidos de diferencia, siendo aceptado hasta 4 nucleótidos (Meyers *et al.*, 2008), comparten genes blanco en común, y por tanto también la misma función. Mientras que los miRNAs de animales poseen una región semilla (entre la posición del nucleótido 2 y 8) que es importante para el reconocimiento de sus genes blanco (Mathelier & Carbone, 2013), en plantas la secuencia completa del miRNAs es usada para el reconocimiento de sus genes blanco, con el cual posee un alineamiento casi perfecto (Axtell & Bowman 2008).

Figura 4.- Biogénesis de los miRNAs en plantas. En planta el pre-procesamiento se da en el núcleo por acción de DCL1, en conjunto con HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1) y SER (SERRATE). El dúplex generado es metilado por HEN1 (HUA ENHANCER 1) y exportado al citoplasma en donde el miRNA maduro se asocia con el complejo RISC (RNA-induced silencing complex) para que lleve a cabo proceso de silenciamiento génico.



Fuente: Chapman E. & Carrington J. 2007.

2.4.4. miRNA en papa

Esfuerzos por identificar miRNAs en papa se vienen dando recientemente desde el año 2008, siendo una de las primeras publicaciones realizada por Zhang W. *et al.* Para ello se efectuó una búsqueda de miRNAs dentro de las secuencias de EST de papa almacenadas en la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y del servidor del “Canadian Potato Genome Project (CPGP) Genome Browser”. Empleando las secuencias de miRNAs de 9 especies de plantas

almacenadas en el “miRNA Registry Database” se encontró un total de 48 miRNAs potenciales que regulan 186 genes blanco, involucrados en el desarrollo de la flor, la hoja, la raíz y del tallo, así como en diferentes rutas metabólicas, y en respuestas a estrés (Zhang *et al.*, 2009). Luego, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciamiento, se hizo una búsqueda más precisa secuenciando todos los ARNs pequeños de *Solanum tuberosum* subesp. *Andígena* por técnica de RNASeq, provenientes de muestras de hoja y estolones. Mediante el análisis bioinformático se encontró un total de 28 familias de miRNA conservadas en otras especies de plantas. (Zhang *et al.*, 2013).

En la actualidad ya se cuenta con estudios en donde se relaciona la expresión de ciertos miRNAs de papa a diversos factores abióticos (Yang *et al.*, 2013; Bhogale *et al.*, 2014; Kitazumi *et al.*, 2015). Sin embargo, para comprender los mecanismos de resistencia de la planta, es necesario contar con más datos y profundizar más aún en su análisis, sobretodo el de los provenientes de secuenciamientos masivos, en donde se obtiene gran cantidad de secuencias que brindan una importante información acerca de la estructura genómica o de la expresión génica de la planta bajo estudio.

2.4.5. miRNAs relacionados a la sequía en papa

Hasta hace dos años los estudios en papa en relación a la identificación de miRNAs bajo condiciones de sequía dirigían su búsqueda hacia sólo un grupo de miRNAs, ya sea a una familia específica (Hwang *et al.*, 2011) o a una ruta metabólica específica (Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a lo complejo que es esta respuesta, en el

año 2014 se hizo un trabajo más completo, empleando el secuenciamiento masivo (“deep-sequencing”) para identificar los miRNAs totales presentes en plantas en condiciones de estrés a sequía empleando PEG (Polyethylene glycol) (Zhang *et al.*, 2014-2).

Para identificar miRNAs relacionados a la respuesta a sequía en papa, empleando el secuenciamiento masivo, se construyeron bibliotecas de ARNs pequeños a partir de muestras de una papa tetraploide “Zihuabei”, tratadas con PEG al 15%. El secuenciamiento por RNASeq mostró que la familia stu-miR168 y stu-miR166 tuvieron las más altas cantidades de lecturas en el control y en el tratamiento, respectivamente. Los cambios de expresión se vieron en 100 miRNAs que aumentaron su expresión y en 99 miRNAs que disminuyeron su expresión bajo estrés. Dentro de estos, 4 de ellos fueron identificados como genes relacionados a la respuesta a sequía: miR811, miR814, miR835 y miR4398. En relación a los genes blanco de los miRNAs identificados, estos mostraron estar relacionadas a diversas funciones, en donde se incluye: el metabolismo, la diferenciación celular, el crecimiento y la resistencia tanto a factores bióticos como abióticos. En base a su análisis funcional, determinaron que 9 genes blanco de los miRNAs están potencialmente asociados a la respuesta a sequía. Entre sus funciones se incluye: factores de transcripción (MYB, bZIP, WRKY), enzimas (trealosa sintasa) y proteínas funcionales (acuaporinas) (Zhang *et al.*, 2014-2). Sin embargo, este estudio no define si la variedad empleada es tolerante o susceptible a la sequía. Es necesario realizar un estudio comparativo entre plantas con estas dos características para

elucidar la importancia funcional de los miRNAs, en relación con sus genes blanco, en la tolerancia a este tipo de estrés.

3. Justificación

La papa es un cultivo milenario de gran importancia en el sistema alimentario mundial. Contiene abundantes nutrientes y puede contribuir a la mejora de la alimentación y la reducción de índices de mortandad causada por desnutrición.

La papa es además una fuente importante de ingresos para pequeños agricultores en todo el mundo. En el caso de Perú, muchas veces, son productores de muy bajos recursos, para quienes éste es el único cultivo que les produce ganancias, como es el caso en los Andes. Las utilidades de la papa son iguales a las del arroz y el doble de las recibidas por la venta del maíz y el camote. Sin embargo, últimamente los productores de papa deben enfrentarse no sólo a plagas y enfermedades sino también a problemas abióticos. Son frecuentes los reportes de productores e investigadores sobre condiciones de estrés por falta de agua, cambios en la distribución e intensidad de las precipitaciones e incrementos en la frecuencia de heladas y caídas de nieve en zonas de montaña. El aumento de estas situaciones climáticas extremas es generalmente relacionado al calentamiento global o cambio climático.

La aclimatación de las plantas frente a un estrés medioambiental es mediada por una serie compleja de redes de señales. Los mecanismos de respuesta a estrés regulan varios eventos moleculares en las plantas y en la expresión de una variedad de genes.

Dentro de esta variedad de genes se encuentran los miRNAs que tienen como función regular la expresión génica, y debido a las nuevas evidencias, estarían cumpliendo un rol importante en la resistencia a sequía. Dada la importancia de estos miRNAs se vienen dando diversos esfuerzos, empleando distintas metodologías, para identificarlos a lo largo del genoma de distintas especies.

Dentro de todas las metodologías que se tienen en la actualidad, el secuenciamiento de última generación o de alto rendimiento (Next generation sequencing o “NGS”) viene siendo ampliamente utilizado para la identificación de miRNAs en distintos cultivos de importancia, tales como el arroz, el maíz, el algodón, la uva, el tomate y la papa, entre otros. Esto por la gran cantidad de datos e información que se generan como resultado del secuenciamiento.

Por tal motivo la tesis emplea dicha metodología para secuenciar todos los ARNs pequeños expresándose bajo condiciones normales y de estrés hídrico, en una variedad de papa tolerante y otra susceptible para, a partir de estas secuencias, identificar los miRNAs relacionados a la tolerancia a este estrés abiótico.

El objetivo de identificar miRNAs relacionados a la tolerancia a sequía es proporcionar información que complemente la red compleja del fenotipo de tolerancia en la papa, aún no definida completamente, dada la brecha de información que existe entre la expresión de genes codificantes y sus reguladores, los miRNAs. Los resultados brindados podrán ser empleados en un futuro en el mejoramiento

genético de papa, para que puedan resistir las condiciones climáticas adversas que se tienen y que en futuro podrían acentuarse, trayendo beneficios a la agricultura y a la economía del país.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Identificar miRNAs candidatos que intervengan en la tolerancia al estrés hídrico en papa.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar los miRNAs que se están expresando en los diferentes tiempos de exposición a estrés hídrico, en una variedad de papa resistente y otra susceptible
- Comparar la expresión génica de los miRNAs identificados en los diferentes tiempos de exposición a sequía.
- Identificar los miRNAs que se expresan diferencialmente entre la variedad susceptible y la tolerante de papa.
- Predecir los posibles genes blancos (targets) para cada miRNA identificado.

5. Hipótesis

La diferencia entre los patrones de expresión de los miRNAs se correlaciona con la diferencia fenotípica de respuesta a estrés hídrico entre variedades tolerantes y susceptibles a sequía. Dentro de la diferencia en los patrones de expresión, se pueden encontrar que mismos miRNAs pueden expresarse de diferente manera en las dos variedades de plantas, ante la misma condición de estrés.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras provienen de plantas cultivadas bajo un diseño experimental realizado y estandarizado en el año 2013 por Torres (Torres *et al.*, 2013). Torres midió la tasa fotosintética de las dos variedades, tolerante y susceptible, de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* empleadas en esta tesis, bajo diferentes condiciones de estrés hídrico, siguiendo los parámetros dados por Vasquez-Robinet *et al.*, 2008. Según la tasa fotosintética reportada, Torres evaluó la respuesta denominada temprana al estrés, la respuesta tardía al estrés y la respuesta de recuperación de las plantas, detallada en la sección de Diseño experimental. A partir de estas plantas trabajadas por Torres, se tomaron muestras de hojas para realizar el secuenciamiento de los ARNs pequeños.

1. Material biológico

1.1. Muestra biológica

Las muestras empleadas fueron plántulas pertenecientes al banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP). Estas plántulas pertenecen a 2 variedades de papas nativas de la especie *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, una resistente a sequia (número de accesión en el CIP: 703671) y la otra susceptible a sequía (número de accesión en el CIP: 703248) (Tabla 2).

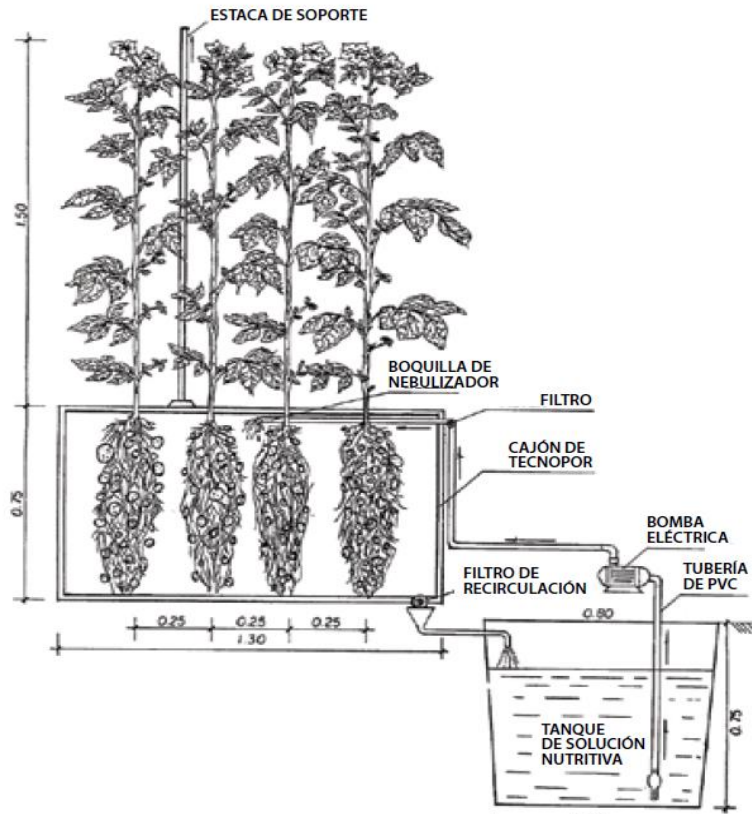
Tabla 2.- Variedades de plantas de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* evaluadas en la tesis.

Número de accesión	CIP 703671	CIP 703248
Respuesta a sequía	Resistente	Sensible
Nombre	Negrita	Wila Huaka Lajra
Género	Solanum	Solanum
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	<i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>
País de origen	Perú	Bolivia
Latitud	-7.08	-17.63
Longitud	-78.33	-65.73
Altura	3100 m.s.n.m.	3800 m.s.n.m.

1.2. Crecimiento de las plantas de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

Luego de su mantenimiento y propagación *in vitro*, las plántulas fueron trasplantadas hacia un sistema aeropónico. En este sistema las plantas son fijadas a una mesa con agujeros, de manera que las raíces crezcan libremente por debajo de la mesa en total oscuridad (Figura 5). Debajo de la mesa las raíces son rociadas con una solución nutritiva por 5 minutos, en intervalos de 15 minutos regulares durante el día. Para esto se tiene una motobomba que es controlada con un temporizador que está programado para que cada 15 minutos se prenda y se apague.

Figura 5.- Representación gráfica del sistema aeropónico de cultivo de papa (Otazú, 2010). Se muestra cómo las raíces crecen por debajo de una superficie, la cual es mantenida en oscuridad. Estas raíces son regadas con la solución nutritiva almacenada en un tanque por periodos controlados de tiempo. Para el caso del presente trabajo el riego fue de 5 minutos en intervalos de 15 minutos.



Este sistema aeropónico se instaló en la Estación Experimental Santa Ana (INIA-Huancayo), localizada en la provincia de Huancayo, en la sierra central del Perú (12°00' S, 75°13' O) a 3260 msnm y a un rango de temperatura entre 6 y 18°C. Las plantas se mantuvieron en este sistema durante tres meses, periodo después del cual se realizaron las evaluaciones fisiológicas y el experimento de sequía. Para el riego se empleó una solución nutritiva cuya composición se detalla en la Tabla 3. Dicha

solución fue aplicada a las raíces por 5 minutos en intervalos de 15 minutos. (Torres *et al.*, 2013)

Tabla 3. Composición de la Solución Nutritiva empleada para el cultivo aeropónico.

Fertilizante	Fórmula	g/l
Nitrato de Potasio	KNO ₃	0.101
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	0.08
Sulfato de Potasio	K ₂ SO ₄	0.087
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	0.247
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄	0.136
Superfosfato triple de Calcio	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.117
Fertilón Combi (*)	Micronutrientes	0.0125

(*) Fertilón combi es un nutriente foliar comercial en polvo que tiene la siguiente formulación: 9% MgO, 3% S, 4% Fe, 4% Mn, 1.5%, Cu, 1.5% Zn, 0.5% B, y 0.1% Mo.

2. Diseño experimental

Las 2 variedades de plantas de papa, resistente y susceptible a sequía, trabajadas por Torres *et al.*, 2013, crecieron 3 meses dentro del sistema aeropónico, tiempo en donde se da el inicio de la tuberización. Hasta ese momento las plantas recibieron la irrigación programada del sistema aeropónico.

Para simular el estrés por sequía se aplicaron periodos de estrés hídrico mediante el cese de riego de las plantas dentro del sistema aeropónico luego de los 3 meses de crecimiento de las plantas. Según Ramanjulu & Bartels, los genes que se expresan en las plantas bajo este estrés pueden ser divididos en dos grupos: (i) Genes de respuesta temprana, los cuales se expresan en segundos o minutos de iniciado el estrés y por

tanto serían los involucrados en la protección inicial de la planta por la amplificación de las señales y (ii) genes de respuesta tardía, los cuales se expresan en horas, días o semanas, los cuales están relacionados en la adaptación a la condición de estrés (Ramanjulu & Bartels, 2002). Dentro del primer grupo se encuentran los genes involucrados en la producción de ABA (Maathuis, 2007), y dentro del segundo grupo, que vienen a ser las respuestas de adaptación, se tiene expresión de genes involucrados en la producción de proteínas de choque térmico (HSPs), de proteínas antioxidantes y de enzimas relacionadas a la producción de osmolitos. En papa, Vasquez-Robinet et al. trabajando con diferentes variedades de papa de la subsp. andígena, observó los cambios en la respuesta de estas plantas evaluando períodos de estrés hídrico en el cual la fotosíntesis cae desde un 25% (18 días de estrés hídrico) hasta un ~60-70% (25 días de estrés hídrico). Por medio de microarreglos, al evaluar la respuesta a los 25 días de estrés, en la variedad más tolerante, observó que la expresión de los genes fueron los de respuesta tardía, que en este caso fueron la alta producción de proteínas HSPs y de genes antioxidantes (Vásquez-Robinet et al., 2008).

En base a los patrones de actividad fotosintética descrito por Vasquez-Robinet *et al.*, 2008, Torres *et al.*, 2013 determinó los períodos de estrés hídrico, cortando el riego de las plantas por diferentes períodos de tiempo, para generar una respuesta denominada temprana al estrés hídrico (25% de la disminución de la tasa fotosintética), una respuesta tardía al estrés hídrico (60% de la disminución de la tasa

fotosintética) y una respuesta de recuperación (80% de la tasa fotosintética inicial, con riego).

Torres midió la tasa fotosintética de la planta, frente al de estrés hídrico, empleando el CI-340 Handheld Photosynthesis System (CI-340). Este equipo es un analizador infrarrojo de CO₂/H₂O que posee una cámara foliar en la cual se realizan mediciones de la tasa a la cual un área foliar conocida asimila una concentración de CO₂ en un tiempo dado. Para esto se tomaron dichas mediciones, primero durante el riego normal de la planta, en donde no se tiene estrés hídrico, el cual viene a ser nuestro control, y luego durante el cese de riego.

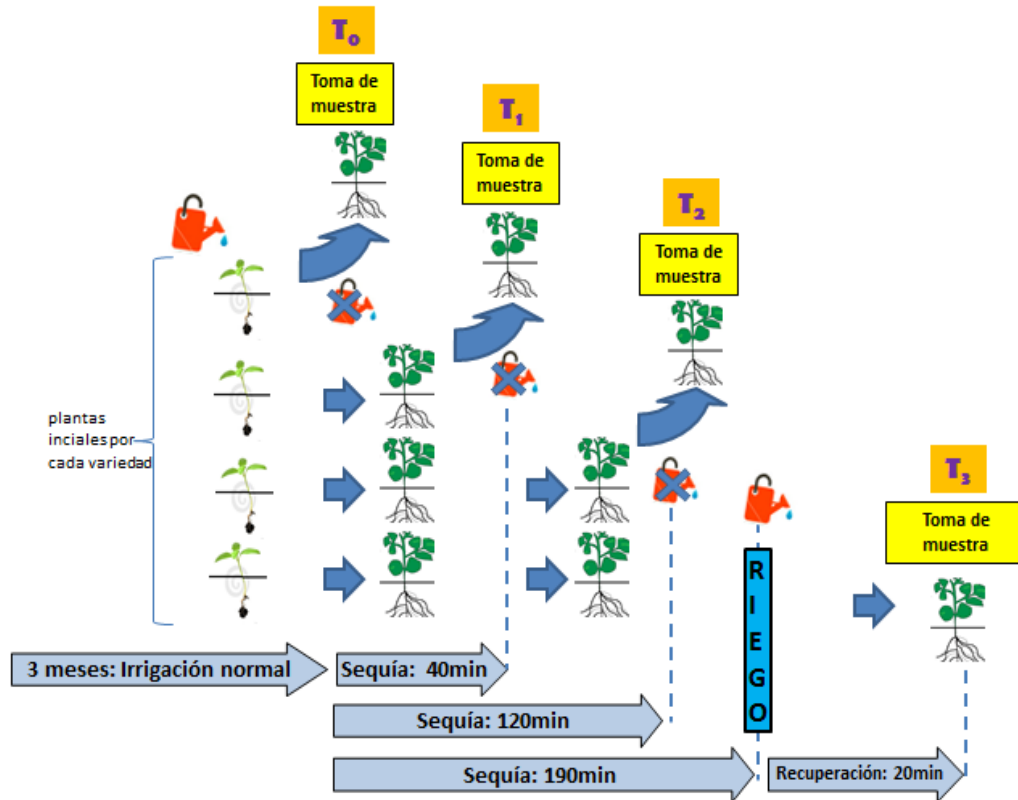
De acuerdo a la tasa fotosintética medida, los tiempos control, de respuesta temprana, tardía y de recuperación al estrés hídrico fueron los siguientes (Figura 6):

- **Tiempo Cero (t₀):** Antes de la inducción por sequía, que representa el control del experimento.
- **Tiempo 1 (t₁):** Es la respuesta temprana de la planta, ocurre 40 minutos luego de la inducción a sequía. En este momento la actividad fotosintética cae en un 25% en la tolerante.
- **Tiempo 2 (t₂):** Es la respuesta tardía de la planta, ocurre 120 minutos luego de la inducción a sequía. En este momento la actividad fotosintética cae en un 60% en la tolerante.

- **Tiempo 3 (t_3):** Es la respuesta de recuperación por riego de la planta, luego de 20 minutos después de volver a regar a la planta. En este momento la actividad fotosintética de la planta tolerante alcanza el 80% de su actividad fotosintética inicial.

Con respecto a la respuesta de la planta susceptible, la tasa fotosintética disminuyó más rápidamente en comparación con la variedad tolerante. Mientras que en la tolerante el decaimiento de la tasa fotosintética a un 60% se dio a los 120 minutos, en la susceptible este decaimiento se dio antes, a los 100 minutos. Así también, en la etapa de recuperación se observó que mientras la tolerante llegó a alcanzar el 80% de su fotosíntesis inicial (con riego), la susceptible sólo llegó a recuperar aproximadamente el 50% de su fotosíntesis inicial. (Torres *et al.*, 2013)

Figura 6.- Diseño experimental del tratamiento con estrés hídrico sobre las dos variedades de *Solanum tuberosum* subsp *andigena*. Se muestran los tiempos de exposición a sequía (40 y 120 minutos) y el tiempo que se dio para que la planta pueda recuperarse (20 minutos luego de volver a regarla). De cada uno de estos tiempos se tomaron muestras de hojas para el secuenciamiento.



Credito: Torres, Y., para el proyecto “Identificación de genes relacionados a sequía en papas nativas empleando RNA-Seq” (Torres et al., 2013).

A partir de estas plantas trabajadas por Torres et al., 2013, se tomaron muestras de una planta por cada uno de los 4 tiempos, y por cada variedad de papa, los que hicieron un total de 8 muestras para el secuenciamiento (Figura 6, Tabla 4).

Tabla 4.- Muestras evaluadas en el presente estudio. En la tabla se observa la cantidad de muestras que fueron empleadas para el secuenciamiento sumando un total de 8, 4 fueron de a variedad tolerante y los otros 4 de la variedad susceptible. Así mismo se muestra las abreviaturas (Tto, Tt1, Tt2, Tt3, St0, St1, St2 y St3) que serán empleada a lo largo de la tesis con respecto a los tiempos tomados en ambas variedades.

MUESTRA	VARIEDAD	ETAPA	TIEMPO	ABREVIATURA
1	Tolerante	Control (Con riego)	0	Tt0
2	Tolerante	Respuesta temprana (40 min de estrés)	1	Tt1
3	Tolerante	Respuesta tardía (120 min de estrés)	2	Tt2
4	Tolerante	Recuperación (20 min de riego)	3	Tt3
5	Susceptible	Control (Con riego)	0	St0
6	Susceptible	Respuesta temprana (40 min de estrés)	1	St1
7	Susceptible	Respuesta tardía (120 min de estrés)	2	St2
8	Susceptible	Recuperación (20 min de riego)	3	St3

3. Extracción de ARN total

Para la extracción se tomaron muestras de hojas en los 4 tiempos señalados anteriormente, de la variedad tolerante y susceptible a la sequía. Se tomaron de 1-2g de tejido por cada planta y se extrajo el ARN total empleando Tri@Reagent (Sigma). (Anexo 1). Luego, para eliminar la presencia de ADN se hizo un tratamiento con DNAsa empleando el kit DNA-freeTM (Ambion). La calidad de los ARNs fue observada en geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio y la concentración empleando el espectrofotómetro NanoDropTM 1000.

4. Secuenciamiento

Las muestras de ARN total fueron enviadas a Michigan State University para que puedan ser secuenciados los ARNs pequeños o “small RNAs” (sRNAs) por RNASeq, empleando la metodología de Illumina® con el secuenciador HiSeq 2500.

En la preparación de las muestras para el secuenciamiento de los sRNAs, primero se ligaron los adaptadores en la región 3' de cada secuencia. Esta región contiene un grupo hidroxil como resultado del clivaje enzimático hecho por DICER u otras enzimas que procesan ARNs. Seguidamente se hace una selección de tamaños (~30-50bp) mediante geles de poliacrilamida al 6%, se ligan adaptadores a los extremos 5', se generan ADN complementarios (cDNAs) y se hacen reacciones de PCR para el secuenciamiento por Illumina.

5. Análisis de secuencias

Todo el análisis se hizo en un servidor instalado en el área de Hardware, Redes y Sistemas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que tiene instalado el sistema operativo Linux, específicamente la distribución Ubuntu, versión 14.04 LTS de 64-bits, sobre el cual se ejecutaron todos los programas empleados, bajo líneas de comando.

5.1. Pre-procesamiento de los datos obtenidos.

Este análisis involucra (1) la verificación de la calidad de las lecturas procedentes del secuenciamiento, (2) la eliminación de las secuencias de los adaptadores que se ligaron a los ARNs pequeños para su secuenciamiento, y (3) el filtro de las secuencias de ARNs pequeños que no son miRNAs, como son los rRNAs, tRNAs, snRNA y snoRNAs.

(1) Primero, para observar la calidad de las lecturas resultantes del secuenciamiento se empleó el programa FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Éste es un programa en Java que toma como entrada los datos procedentes de los archivos FASTQ generados por el secuenciador y produce gráficos en formato HTML. FastQC cuenta con varios módulos de análisis que se utilizan para hacer una revisión rápida y general de los datos. Con respecto a la calidad de las lecturas, el secuenciador asigna un valor de calidad a cada base de cada lectura. Dicho valor es llamado “Phred score” (Q), que viene a estar relacionada logarítmicamente con la probabilidad (P) de que una base sea errónea:

$$Q = -10 \log_{10} P$$

Dichos valores los da el secuenciador empleando códigos ASCII, y el programa Fastqc los interpreta y lo convierte en un rango de calidad que va

desde 0 a 40. A mayor valor, menor probabilidad de error, y por tanto la base asignada por el secuenciador resulta ser más confiable. El umbral mínimo empleado para realizar el filtro de calidad de las lecturas fue de 28.

Para ejecutar el programa FASTQC se empleó el comando:

➤ `./fastqc biblioteca.fq`

(2) Segundo, para eliminar los adaptadores presentes en los extremos de las secuencias se empleó el programa Cutadapt (<http://code.google.com/p/cutadapt/>). Ejecutando este programa se retuvieron las secuencias que contaban con los adaptadores, las otras que carecían de los adaptadores se descartaron. Con este programa también se seleccionaron las secuencias de un tamaño de 17 y 30 nucleótidos luego de la remoción de los adaptadores.

El comando que se empleó para correr todas estas opciones dentro del programa fue:

➤ `cutadapt -b TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG --discard-untrimmed -O 8
-m 17 -M 30 libreria.fastq > libreria_cut.fq`

La secuencia “TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG” corresponde a la secuencia del adaptador que se empleó para el secuenciamiento.

(3) Tercero, como dentro de las bibliotecas se encuentran todos los sRNAs, pueden también estar presentes ARNs ribosomales, ARN de transferencia, snoRNAs entre otros. Por esta razón, es necesario remover estas secuencias que no son miRNAs. Para esto se descargaron las secuencias almacenadas en las bases de datos de SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) y de tRNA de Arabidopsis (<http://trna.bioinf.uni-leipzig.de/DataOutput/Search>). Se juntaron todas estas secuencias en un archivo llamado: “noncoding.fa”. Mediante alineamiento, se identificaron estas secuencias dentro de cada una de las bibliotecas y se eliminaron. Para esto se empleó el programa Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>).

Primero se generaron “archivos índices” con el “noncoding.fa”, esto para que el alineamiento sea más efectivo en tiempo, con el comando:

➤ `bowtie-build nocodedefile.fa nocodedefile`

Luego se generaron los alineamientos con el archivo “biblioteca_cut.fq” (archivo de salida del anterior programa) y se retuvieron las secuencias que no alineaban, empleando el siguiente comando:

➤ `bowtie -p 8 -t noncoding -q libreria_cut.fq --un biblioteca_filtrada.fq`

5.2. Mapeo genómico.

Para este procedimiento se empleó la última versión de las secuencias ensambladas del genoma de la papa (v4.03). Estos datos fueron generados por el “*Potato Genomic Sequencing Consortium*” a partir del secuenciamiento de DM1-3 516R44 (*Solanum tuberosum* Grupo *phureja*), y están almacenadas en la base de datos llamada “Potato Genome Resource” (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml). Las lecturas fueron mapeadas a este genoma de referencia para ubicarlas dentro de los 12 cromosomas de papa. Para esto también se empleó el programa Bowtie. Esto también permitió descartar las secuencias ajenas al genoma de la papa, lo cual también resulta ser un filtro.

Se generaron los “archivos índices” con del genoma de la papa (archivo: “genome.fa”):

➤ `bowtie-build genoma.fa genoma`

Y luego se alinearon con el genoma, empleando el comando:

➤ `bowtie -t -p 8 genoma -q libreria_filtrada.fq -al outputmap.fq`

Luego se generaron archivos no redundantes con el comando:

- `fastx_collapser -v -i outputmap.fq -Q 33 -o mapNR.fa`

5.3. Predicción de los miRNAs.

A partir de las secuencias de los sRNAs mapeados, primero se identificaron qué secuencias son miRNAs ya identificados en papa, para luego, a partir de las secuencias restantes, identificar nuevos miRNAs aún no anotados en este genoma.

5.3.1.- Identificación de miRNAs anotados en papa

Para esto se empleó el archivo de anotación de los miRNAs de papa, descargado de la página del “Potato Genome Resource” (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml). Este archivo de anotación en formato *.gff fue convertido a formato BAM, para poder extraer las posiciones de cada miRNA. Con estas coordenadas, empleando un script “extract_fasta_2.pl” se extrajeron todas las secuencias de los miRNAs a partir del genoma de la papa y se creó un archivo multifasta que contenga todas las secuencias de los miRNAs (“miRNApapa-mature.fa”).

- `cat miRNApapa.gff | grep -v '#' | grep -v "^$" | sed 's"/"/g' | awk '{print $1"\t"$4"\t"$5"\t"$7"\t"$9}' > miRpapaBED`
- `perl extract_fasta_2.pl -b CoordI -e CoordF -c CHR PGSC_DM_v4.03 archive_out1`
- `cat archive_out* > miRNApapa-mature.fa`

Para identificar si dentro de nuestro archivo de secuencias no redundantes (salidas del mapeo genómico (trabajando con el archivo no redundante “mapNR.fa”)) se encuentra algún miRNA anotado que está dentro de este último multifasta generado, se alinearon ambos archivos empleando el programa “blastn”.

Primero, con el multifasta “miRNApapa-mature.fa” se generaron archivos para que “blastn” lo reconozca como una base de datos:

- `makeblastdb -in miRpapa-mature.fa -dbtype 'nucl' -out miRpapa-mature`

Y luego se hizo el alineamiento en sí:

- `blastn -task 'blastn-short' -evaluate 1.00E-007 -word_size 7 -db miRpapa-mature -query mapNR.fa -outfmt 6 -out OUT_blast -max_target_seqs 1 -num_threads 3`

5.3.2.- Identificación de miRNAs nuevos

Este análisis partió de las secuencias restantes de sRNAs que no fueron identificados como miRNAs ya anotados. Con los datos provenientes de sus alineamientos al genoma, se observó si las secuencias pueden provenir de un precursor en forma de horquilla con una estructura característica de un precursor de miRNA de planta.

Dichas características involucran que (1) los miRNA y miRNA* son derivados a partir de regiones opuestas de los brazos de la horquilla formando un duplex con dos nucleótidos sobresalidos en el extremo 3' , (2) el apareamiento entre el miRNA y el otro brazo de la horquilla, que incluye al miRNA*, es extensivo de tal manera que se tenga 4 o menos mismatches en la región del miRNA, y (3) las protuberancia o “bulges” asimétricos son mínimos en tamaño (una o dos bases) y frecuencia (típicamente no más a uno) especialmente en la región del miRNA/miRNA* . (Meyers B. *et al.*, 2008).

Para estas predicciones se empleó el programa miREvo (Wen. *et al.*, 2012) que emplea como algoritmo núcleo el programa miRDeep2 (Friedlander *et al.*, 2012) para identificar nuevos miRNAs. miRDeep2 emplea un método basado en el modelo probabilístico para descubrir miRNAs en animales, el cual ha sido demostrado en muchos estudios que es sensible y preciso.

Para la identificación de los miRNAs de plantas miREvo ajusta los parámetros de acuerdo a las características estadísticas de los sus miRNAs, como son la energía libre mínima y la estabilidad de la estructura secundaria (Meyers *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2011; Yang & Li *et al.*, 2011). Del mismo modo, ya que las plantas poseen típicamente grandes familias de miRNAs, en comparación con los animales, miREvo permiten más alineamientos repetidos (Wen. *et al.*, 2012).

El algoritmo que se emplea para la identificación de los miRNAs es el siguiente: Después de alinear las lecturas al genoma de referencia, se extrae la secuencia genómica que abarca estos alineamientos y se analiza una posible estructura secundaria. Se identifican miRNAs precursores y se calcula la probabilidad de que sean precursores reales. Al final, como archivo de salida se tiene una lista scoreada de miRNAs conocidos y nuevos con sus respectivos precursores (Friedlander *et al.*, 2012).

En detalle, el algoritmo inicia investigando la estructura secundaria de cada precursor potencial, a partir de cada región extraída. Esta extracción se realiza cortando 276nt corriente arriba y 22nt corriente abajo, y viceversa, del lugar de alineamiento entre la lectura (posible miRNA maduro) y el genoma. Luego, empleando el programa “bowtie”, miREvo alinea las lecturas (posibles miRNAs maduros) con las secuencias extraídas (posibles precursores o precursores potenciales). El siguiente paso es predecir la estructura secundaria de los precursores potenciales empleando el programa RNAfold, luego se calcula la estabilidad de la estructura empleando el programa randfold el cual calcula valores de p-value para cada uno de las posibles maneras de plegarse. Luego se descartan precursores potenciales que tienen menos del 60% de nucleótidos apareados en la región del miRNA maduro.

En un siguiente filtro, se descartan precursores potenciales que son inconsistentes con la biogénesis de los miRNAs, basado en el modelo de procesamiento de los miRNAs precursores por DICER. Si la secuencia es un miRNA precursor real, se espera que las lecturas que lo alinean correspondan a uno o más de los tres (el miRNA maduro,

el miRNA* y el loop) productos liberados cuando el precursor es cortado por DICER. El algoritmo integra esta información y si el transcrito no es parte de algún producto de DICER, el algoritmo lo descarta.

Todos los pasos analizados por miREvo reciben un puntaje final, en base a la probabilidad de que una una lectura sea un miRNA, sobre la probabilidad de que no lo sea (Friedlander *et al.*, 2012). Como valor mínimo de probabilidad de tomó el valor de 0.8.

Para toda esta predicción de los miRNAs nuevos se ejecutó el siguiente comando:

```
➤ ./miREvo predict -o STU -r miREVO-inputs/genome -M miREVO-inputs/  
miRNApapa-mature.fa -s miREVO-inputs/miRNA-Sly.fa -m 3 -k 15
```

5.4. Identificación de los miRNAs relacionados a la respuesta de tolerancia ante el estrés hídrico.

5.4.1.- Cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs

Para normalizar los valores de expresión de los miRNAs identificados entre todas las bibliotecas, la cantidad de lecturas de cada secuencia fue convertida en valores de TPM (transcript per millions), que tiene como fórmula, según Ji *et al.*, 2012:

Expresión normalizada (en TPM) = $\frac{\text{Cantidad de lecturas de un miRNA} * 1'000,000}{\text{Cantidad total de lecturas después del pre-procesamiento}}$

A partir de estos valores se determinó los cambios de expresión de los miRNAs identificados entre los 4 tiempos de exposición a sequía, en las dos variedades de papa trabajadas (tolerante y susceptible). Estos cambios de expresión, denominados “fold”, fueron realizados empleando la siguiente fórmula, según Ji *et al.*, 2012:

$$\text{Fold_change} = \log_2(\text{tiempo_después} / \text{tiempo_antes})$$

5.4.2.- Generación de grupos de co-expresión génica.

Como primer paso se filtraron los miRNAs que tuvieron un coeficiente de variación menor de 0.4, usando un script de Perl, para reducir el número de genes para el procesamiento final, eliminando genes que no varíen su expresión a lo largo de los tratamientos; o que no tengan expresión durante los 4 tiempos.

Luego los miRNAs fueron agrupados en base a la similaridad del patron de expresión durante los 4 tiempos analizados. Para esto se empleó el programa GeneCluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>), el cual genera grupos o clusters en base al coeficiente de correlación de Pearson de los genes.

A partir de estos grupos, empleando el programa R, se seleccionaron los miRNAs que cambiaron su expresión de manera distinta entre la variedad susceptibles y la variedad tolerante.

5.4.3.- Identificación de miRNAs relacionados a la tolerancia a estrés hídrico

A partir de los miRNAs que tienen un coeficiente de variación mayor a 0.4 en sus expresiones durante los 4 tiempos, se seleccionaron los miRNAs que responden de manera opuesta entre la variedad tolerante y susceptible. Estos miRNAs al tener una expresión diferencial entre ambas variedades, generarían una expresión diferencial de sus secuencias blanco y por tanto estarían involucrados en la distinta respuesta, frente a estrés hídrico, entre la variedad tolerante y susceptible. Siendo los cambios más marcados los que tienen “fold-change” más alto, mayores a 2.

5.5. Identificación de genes blancos o targets de los miRNAs secuenciados.

Para la identificación de los genes blanco se empleó el programa psRNATarget que se ejecuta de manera online (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/?function=1>). Para esta tesis, dentro del programa se eligió la opción de identificar los genes blanco a partir de las secuencias de los transcritos de papa DM1-3, versión 3.4. Este programa detectó los genes blanco, evaluando:

- (1) La complementariedad de los miRNAs y los transcritos, para lo cual alinea los miRNAs contra la base de datos, en este caso, del transcriptoma de papa. Luego el programa aplica el esquema de escoreo de miRU (**Zhang *et al.*, 2005**), para delimitar el número de desapareos (o mismatches), ya que el alineamiento entre miRNAs de planta y sus genes blanco es casi perfecto en la totalidad de la secuencia del miRNA. miRU clasifica los “mismatches” en 3 categorías que tiene diferente puntaje: (a) G:U tiene un puntaje de 0.5, (b) las delecione/inserciones tienen un valor de 2 y (c) el resto de mismatches un valor de 1. Como valor de umbral (“*maximum expectation*”) se dio 2.0. Si en la complementariedad se tiene un valor mayor a este umbral, se descarta al transcrito como posible gen blanco.

- (2) La accesibilidad hacia la región de complementaridad del gen blanco, para lo cual se calcula, empleando RNAup (Muckstein U. *et al.*, 2006), la energía de desapareamiento (UPE) requerida para abrir la estructura secundaria del mRNA alrededor de la región de complementariedad con el miRNA. A menor cantidad de energía, más posibilidad de que el miRNA sea capaz de hacer contacto con el mRNA blanco. Como valor umbral se dio un valor de 25.0.

- (3) El tipo de inhibición, que puede ser por clivaje o por inhibición de la traducción. Frecuentemente ocurre lo segundo si se encuentra algún “mismatch” alrededor del sitio de complementariedad, ya que esta es una región esencial para el clivaje (Brodersen *et al* 2008).

5.6. Descripción de la funcionalidad de los genes blanco.

Para asociar a los miRNAs con los genes blanco dentro de alguna ruta metabólica se hizo un análisis funcional de las secuencias de los genes blanco. Para esto se empleó la base de datos del Gene Ontology (Ashburner *et al*, 2000) y el programa blas2go (Conesa & Gotz, 2008).

La base de datos de Gene Ontology (GO) provee términos biológicos que permiten clasificar genes en base a las propiedades de los productos génicos. Estos términos denotan 3 dominios: componente celular, función molecular y proceso biológico.

El programa blast2go emplea esta base de datos de GO para realizar las anotaciones respectivas. Para esto se siguen 3 pasos:

- (1) “BLASTing”: Mediante un BLAST se alinearon las secuencias de los genes blanco con las secuencias almacenadas en la base de datos del NCBI.
- (2) “Mapping”: El programa mapea las secuencias que alinearon a los genes blanco con la base de datos del “gene ontology” para asignar las marcas funcionales, en términos de GO.
- (3) “Annotation”: Devuelve las anotaciones de las secuencias de los genes blanco en términos de GO.

IV. RESULTADOS

1. Extracción de ARN total

Como resultado de la extracción con Tri®Reagent, se obtuvo adecuada cantidad y calidad de ARN para el secuenciamiento. En la corrida de electroforesis en geles de agarosa al 1%, se observaron las bandas correspondientes a los rRNA 28S, 18S y 5S, lo que indica que los ARNs extraídos no están degradados (Figura 7). Los cocientes de los valores de absorbancia: A260/A280 y A260/A230, indicaron que las muestras se encontraban puras, sin contaminantes, ya que resultaron estar dentro de los rangos aceptados ($A_{260}/A_{280} \sim 2$ y $A_{260}/A_{230} > 1.5$) (Tabla 5).

Figura 7.- Corrida electroforética de los ARNs extraídos a partir de hojas de plantas de papas resistentes y susceptibles a sequía. Se tomaron 3 μL de muestra y se corrió por electroforesis a 90V por 40 minutos en geles de agarosa al 1%.

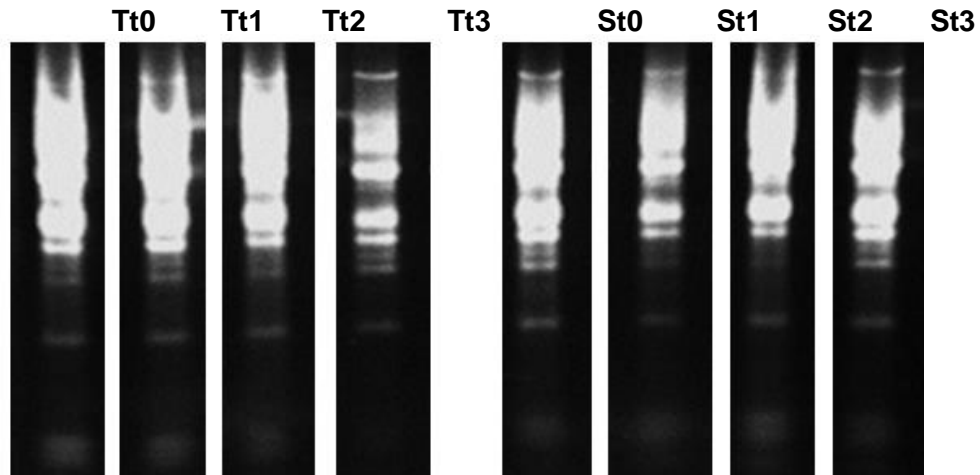


Tabla 5.- Concentración y coeficiente de los rangos de absorbancia obtenidos de la extracción de ARN con trizol.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/ul)	260/280	260/230
Tt0	4879.14	1.81	1.83
Tt1	4416.55	1.91	1.98
Tt2	3017.72	1.99	2.02
Tt3	3487.54	1.82	1.82
St0	4559.63	1.98	2.01
St1	3042.89	2.05	2.05
St2	3875.48	2.02	2.1
St3	3824.2	2.04	2.08

2. Análisis de secuencias

2.1. Pre-procesamiento de los datos obtenidos.

Las secuencias de las 8 bibliotecas de ARN pequeños, visualizados en el FastQC, mostraron valores altos de calidad (umbral: mayor a 28). Por lo tanto, no fue necesario realizar un filtrado en base a este parámetro. (Anexo 2).

Se removieron los adaptadores (TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) de todas las bibliotecas. Se filtraron en base al tamaño de las lecturas, se removieron secuencias de otros pequeños ARNs que no eran miRNAs (rRNAs, tRNAs, snRNA y snoRNAs). Como resultado se obtuvo las siguientes cantidades de lecturas por bibliotecas (Tabla 6):

Tabla 6.- Cantidad de lecturas durante el pre-prosecamiento de las muestras.

Biblioteca	NÚMERO DE LECTURAS		
	Inicial	sRNAs de entre 17 - 30 nucl	Sin tRNA, rRNA, etc
Tt0	20'859,852	11'024,086	9'022,052
Tt1	20'005,147	7'824,997	2'733,265
Tt2	17'024,255	7'375,819	3'331,790
Tt3	16'036,910	6'384,644	4'163,854
St0	22'208,898	8'354,264	2'830,209
St1	16'837,681	7'001,238	2'791,071
St2	14'027,916	7'131,987	5'807,470
St3	20'100,295	7'231,672	4'594,214

2.2. Mapeo genómico.

Luego del mapeo la cantidad de secuencias resultantes estuvieron entre el 1.3% y el 10% de la cantidad inicial proveniente del secuenciamiento. La cantidad total de secuencias resultantes fueron agrupadas para obtener secuencias únicas (secuencias no redundantes) por cada biblioteca empleando el programa FASTX (Tabla 7). En el nombre de cada secuencia única estaba añadido el correspondiente número de lecturas que se secuenció de cada una de ellas.

Tabla 7.- Cantidad de lecturas mapeadas en el genoma de la papa.

Biblioteca	NÚMERO DE LECTURAS		% de secuencias con respecto al tamaño de biblioteca inicial
	Mapeados	No redundantes	
Tt0	7'213,403	2'085,520	10.0
Tt1	2'523,926	361,901	1.8
Tt2	2'642,087	519,221	3.0
Tt3	3'487,290	1'124,684	7.0
St0	2'535,572	285,444	1.3
St1	2'442,997	410,617	2.4
St2	4'032,976	1'166,647	8.3
St3	3'755,381	1'114,974	5.5

Al graficar la distribución de tamaños de las secuencias únicas en cada biblioteca, se observó que la mayor cantidad de ARN pequeños, resultantes del pre-procesamiento y del mapeo, estaban en el rango de tamaños de 21 a 24 nucleótidos, siendo los de 24 nucleótidos el grupo más abundante y el de 21nt, el segundo más abundante (**Figura 10**).

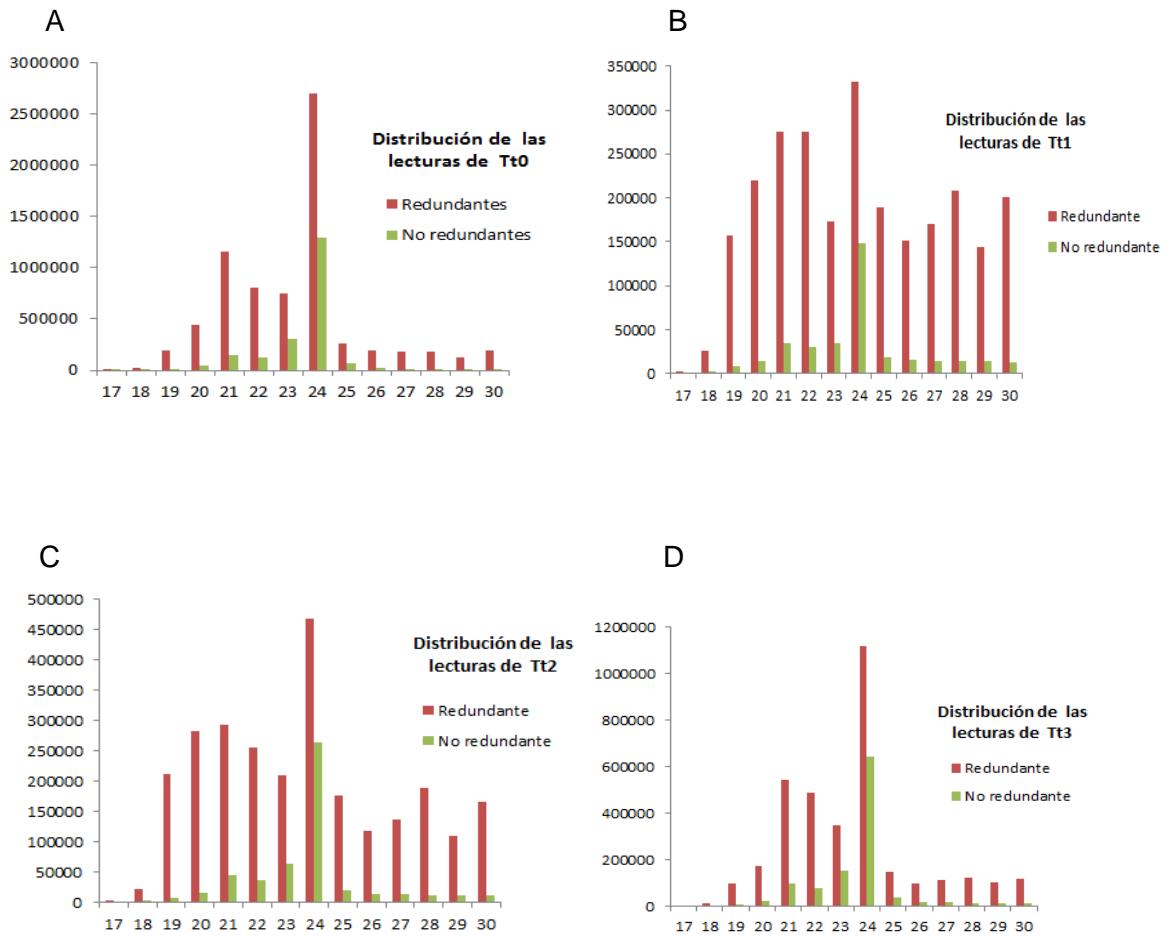
Este resultado también fue obtenido en reportes previos en donde se trabajaron con otras especies de plantas, tales como *Medicago trunculata*, *Oriza sativa*, *Solanum lycopersicum* y *Populus trichocarpa*, en donde se secuenciaron bibliotecas de sRNAs para identificar miRNAs (Szittyá *et al.*, 2008, Yi *et al.*, 2013, Fan *et al.*, 2015, Shuai *et al.*, 2013)

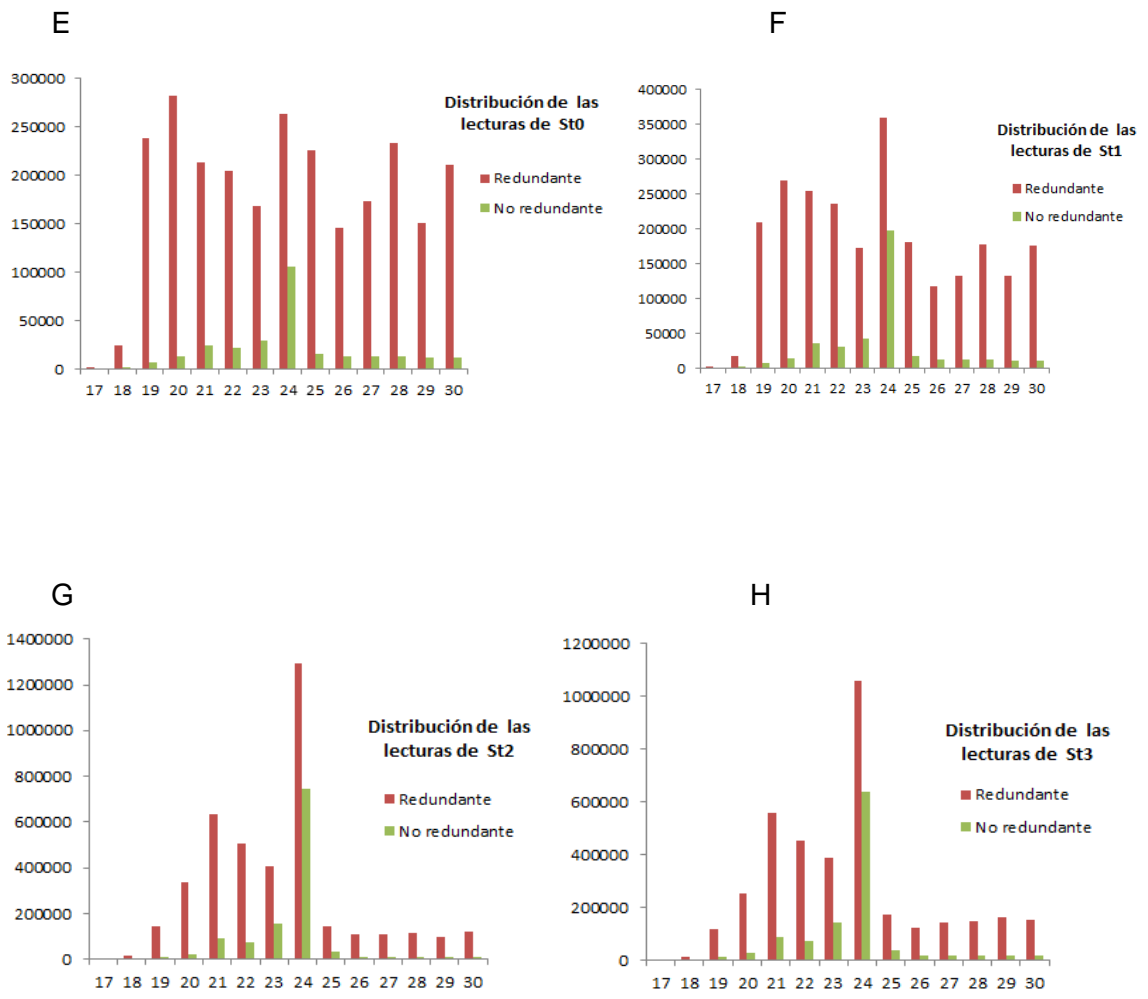
En planta, mientras que la mayoría de miRNAs tienen un rango de tamaño de 21 a 24nt, siendo la más abundante los de 21nt, la mayoría de siRNAs tiene un tamaño de 24nt (Liu *et al.*, 2014). Estos últimos generan a un silenciamiento postranscripcional mediante la modificación de histonas y la metilación de la citosina en el ADN (Kim V., 2005, Zilberman *et al.*, 2003).

El rango de 21 a 24 nt corrobora que la mayoría de secuencias retenidas, luego del filtro, corresponde a miRNAs, en donde se observa un pico mayor en el de 24nt porque se estarían sumando las secuencias de siRNAs (Figura 8).

Los archivos de salida de las secuencias únicas fueron empleados para realizar la identificación de los miRNAs.

Figura 8.- Distribución de las secuencias mapeadas por tamaños de 17 a 30 nucleótidos en las variedades tolerante en tiempo 0 (A), tiempo 1 (B), tiempo 2 (C) y tiempo 3 (D); y en la variedad susceptible en el tiempo 0 (E), tiempo 1 (F), tiempo 2 (G) y tiempo 3 (H). En el eje X se observa la distribución de los tamaños de lecturas presentes en cada una de las bibliotecas y en el eje Y se observa la cantidad de lecturas encontradas por cada tamaño de lectura. Las barras de color verde representan la distribución tomando en cuenta sólo secuencias únicas de cada lectura (no redundantes) y las barras en rojo la distribución de las secuencias con todas sus repeticiones (redundantes).





2.3. Identificación de miRNAs

Empleando el archivo de anotación de miRNAs en papa, almacenado en el “Potato Genome Resource”, se identificaron, trabajando en conjunto con las secuencias de ambas variedades de papa, 211 miRNAs conservados. Según el archivo de anotación con el que se trabajó, estos miRNAs se encontraron agrupados en 107 familias (Tabla 8).

Tabla 8.- miRNAs identificados, en conjunto, dentro de las 8 bibliotecas analizadas. No todos se expresaron en todas las bibliotecas.

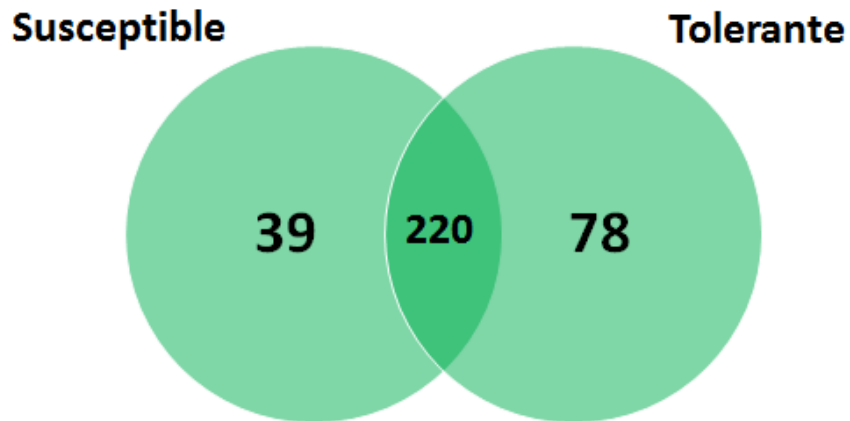
Familias de miRNAs identificados					
stu-miR156	stu-miR408	stu-miR6149	stu-miR7996	stu-miR8015	stu-miR8033
stu-miR160	stu-miR477	stu-miR7122	stu-miR7997	stu-miR8016	stu-miR8035
stu-miR162	stu-miR479	stu-miR7979	stu-miR7998	stu-miR8017	stu-miR8036
stu-miR164	stu-miR482	stu-miR7980	stu-miR7999	stu-miR8018	stu-miR8037
stu-miR166	stu-miR530	stu-miR7981	stu-miR8000	stu-miR8019	stu-miR8038
stu-miR167	stu-miR827	stu-miR7982	stu-miR8001	stu-miR8020	stu-miR8039
stu-miR169	stu-miR1886	stu-miR7984	stu-miR8003	stu-miR8021	stu-miR8041
stu-miR171	stu-miR1919	stu-miR7985	stu-miR8004	stu-miR8022	stu-miR8042
stu-miR172	stu-miR3627	stu-miR7986	stu-miR8005	stu-miR8023	stu-miR8043
stu-miR319	stu-miR4376	stu-miR7987	stu-miR8006	stu-miR8024	stu-miR8044
stu-miR384	stu-miR5303	stu-miR7988	stu-miR8007	stu-miR8025	stu-miR8045
stu-miR390	stu-miR5304	stu-miR7989	stu-miR8008	stu-miR8026	stu-miR8046
stu-miR393	stu-miR6022	stu-miR7990	stu-miR8009	stu-miR8027	stu-miR8047
stu-miR395	stu-miR6023	stu-miR7991	stu-miR8010	stu-miR8028	stu-miR8048
stu-miR396	stu-miR6024	stu-miR7992	stu-miR8011	stu-miR8029	stu-miR8049
stu-miR397	stu-miR6025	stu-miR7993	stu-miR8012	stu-miR8030	stu-miR8050
stu-miR398	stu-miR6026	stu-miR7994	stu-miR8013	stu-miR8031	stu-miR8051
stu-miR399	stu-miR6027	stu-miR7995	stu-miR8014	stu-miR8032	

Por otro lado, a parte de los 211 miRNAs conservados, el programa miREvo pudo predecir, también trabajando en conjunto con las secuencias de ambas variedades de papa, un total de 126 miRNAs nuevos analizando las 8 bibliotecas secuenciadas. De acuerdo a la similitud que presentaron las secuencias de algunos miRNAs maduros (no mayor a 4 nucleótidos de diferencia), se agruparon en 101 familias de miRNAs (ver anexo 4). Todos los pre-miRNAs predichos tuvieron valores de p-value de randfold significativo y un score de miREvo mayor a 0.8.

Según la base de datos de miRBase los miRNAs predichos por miREvo no tuvieron similitud con alguna secuencia almacenada en miRBase, por lo que estos miRNAs vendrían a ser específicos de las variedades de papa empleadas en el experimento. Por otro lado, miREvo permitió discriminar si las secuencias predichas corresponden a la secuencia del miRNA o del miRNA*, esto lo hace de acuerdo a la cantidad de lecturas que tiene cada secuencia. Normalmente la secuencia de los miRNA* son degradados en el citoplasma, sin embargo, en algunos casos, algunas de estas secuencias aún no degradadas podrían o pueden ser secuenciadas. miREvo emplea la cantidad de lecturas que se tienen por secuencia para discriminar cuales son miRNAs y cuales miRNA*, ya que estas últimas aparecen con menor cantidad de lecturas en el secuenciamiento.

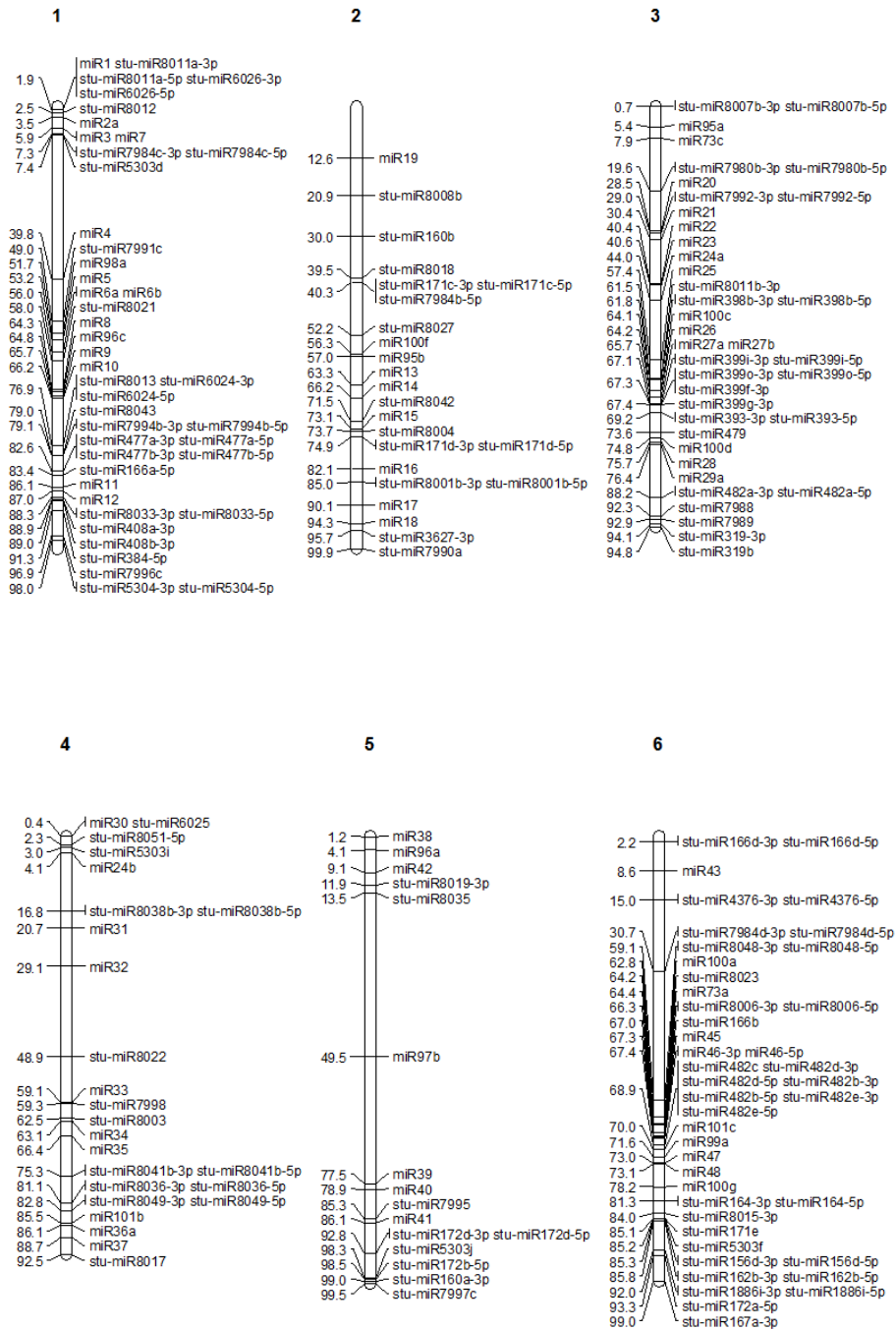
Es decir, en total se identificaron 337 miRNAs, entre conservados y específicos. De estos, 39 se encontraron sólo en la variedad tolerante, 78 en la variedad susceptible y en ambas variedades 220 miRNAs (Figura 9).

Figura 9.- Cantidad de miRNAs identificados en total en la variedad susceptible y tolerante de papa. Los valores mostrados dentro del diagrama de Venn son las cantidades de miRNAs, la suma de conservados y específicos, encontrados solo en la susceptible, en ambas variedades y sólo en la tolerante.

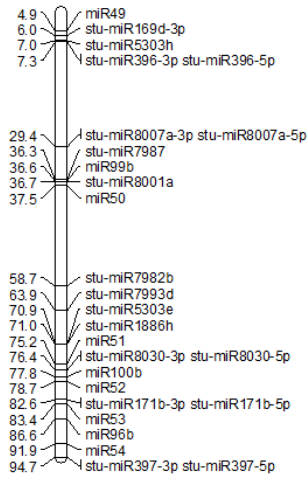


Todos los miRNAs identificados, tanto conservados como nuevos, fueron posicionados gráficamente a lo largo de los 12 cromosomas de papa (Figura 10). Se encontró que en promedio cada cromosoma contiene 23 miRNAs, siendo los cromosomas 1 y 10 en donde se encontró la mayor y menor cantidad de miRNAs, respectivamente.

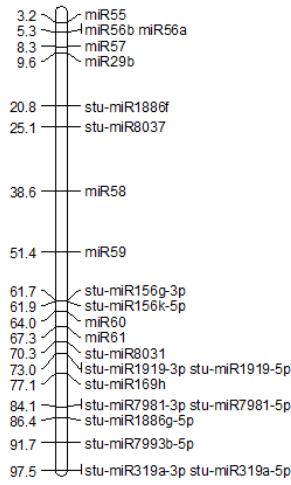
Figura 10.- Representación de las posiciones de los miRNAs identificados a lo largo de los 12 cromosomas. Los números de la izquierda son las posiciones relativas de los miRNAs en el genoma.



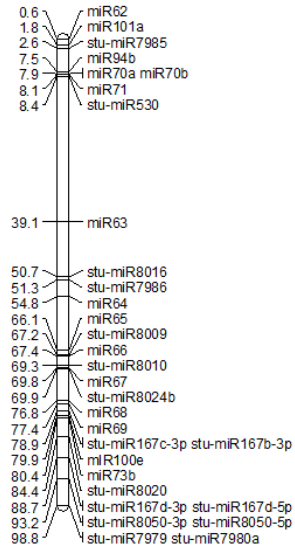
7



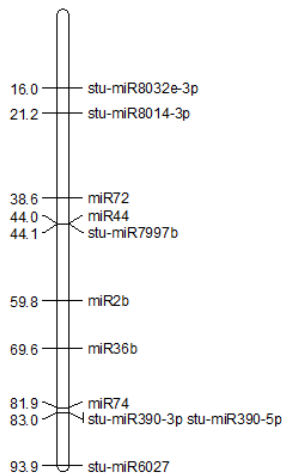
8



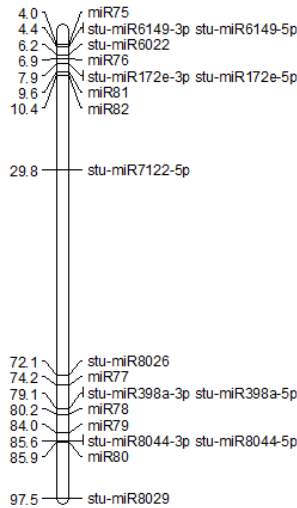
9



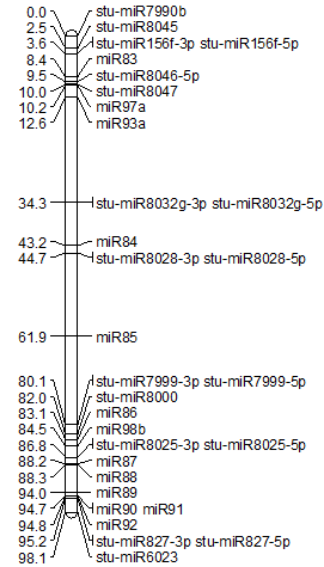
10



11



12



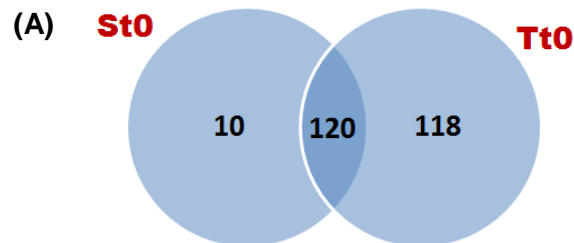
2.4. Identificación de los miRNAs relacionados a la respuesta de tolerancia ante el estrés hídrico.

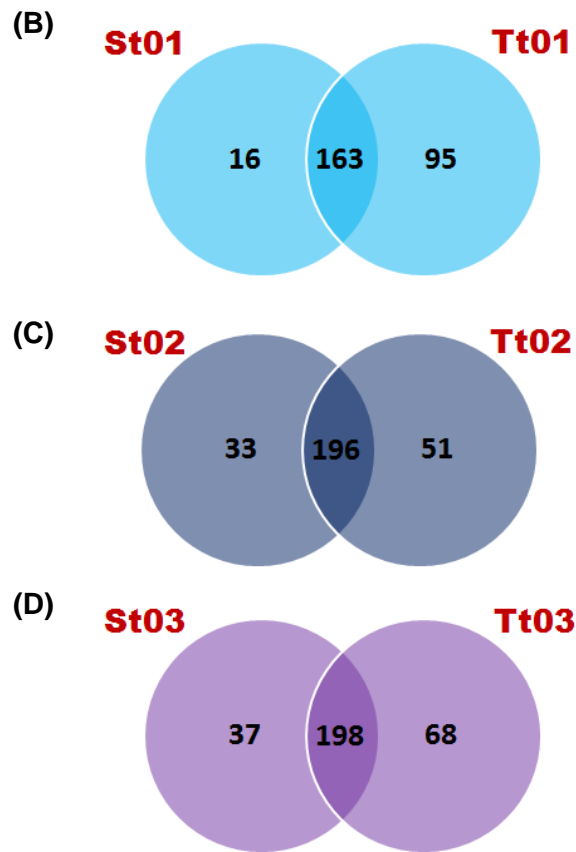
2.4.1.- Cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs.

La comparación de los niveles de expresión de todos los 337 miRNAs entre las bibliotecas, en donde se incluyen tanto a los miRNAs conservados como a los nuevos identificados, se dio en base a los valores de TPM. Según estos valores se calculó la cantidad de miRNAs que bajaron su expresión, que subieron o que se mantuvieron durante los 4 tiempos analizados.

Con respecto a la respuesta general de la planta, la cantidad de miRNAs que variaron su expresión fue distinta entre cada uno de los 4 tiempos. Conforme pasó el tiempo de exposición a estrés y de recuperación, la cantidad de miRNAs que se expresó aumentó en relación al tiempo control. Se observaron cambios en la cantidad de miRNAs presentes sólo en la variedad susceptible como sólo en la variedad tolerante, y también los expresados, a su vez, en ambas variedades. (Figura 11).

Figura 11.- Cantidad de miRNAs que variaron su expresión entre la planta control sin estrés y los tratamientos seguidos, con respecto al control. (A) Cantidad de miRNAs expresados en el tiempo 0, es decir, sin estrés. (B) Cantidad de miRNAs que variaron su expresión con la respuesta temprana al estrés hídrico. (C) Cantidad de miRNAs que variaron su expresión con la respuesta tardía al estrés hídrico. (D) Cantidad de miRNAs que variaron su expresión con la respuesta de recuperación al estrés hídrico.



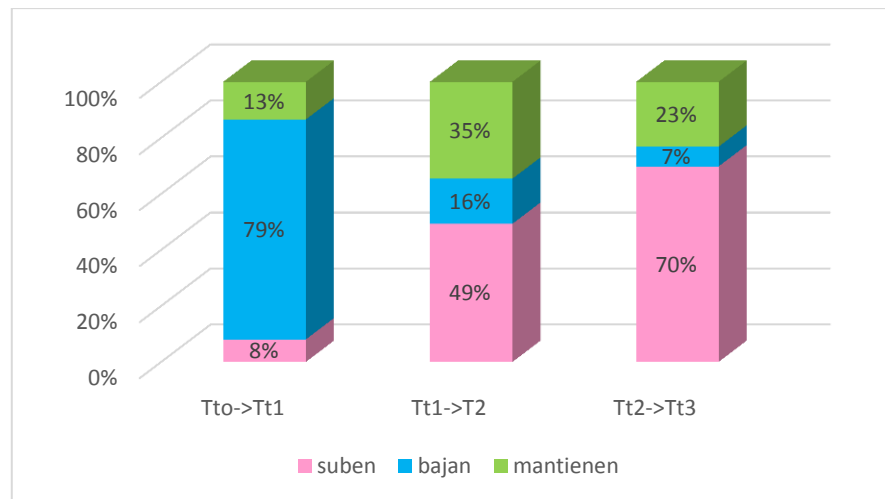


Más detalladamente, a los 40 minutos de falta de riego, en la planta tolerante, la mayor cantidad de miRNAs disminuyeron su expresión, mientras que, en la susceptible, la mayoría de ellos o mantuvieron su expresión o la incrementaron. Con la exposición más prolongada de estrés hídrico (120 minutos), la tolerante mantuvo o incrementó la expresión de sus miRNAs, mientras que, en la susceptible, la mayoría de ellos recién aumentó su expresión. En relación a la respuesta de recuperación, en la planta tolerante hubo un aumento en la expresión de los miRNAs, lo que da un indicio de que varios miRNAs que se inhibieron en un comienzo vuelven a su

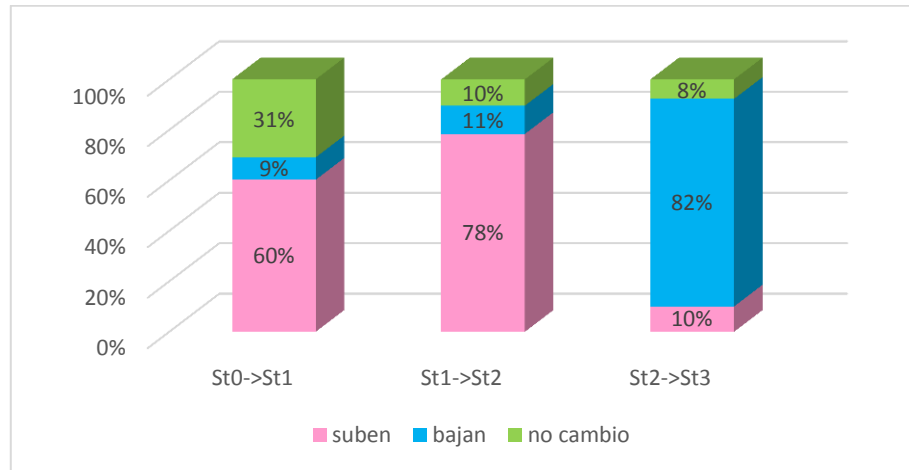
expresión inicial durante la recuperación aumentando su nivel de expresión. Lo contrario sucede en la variedad susceptible en la etapa de recuperación, en donde se tiene una gran cantidad de miRNAs que disminuyen su expresión, lo que es una respuesta contraria al estrés temprano en la planta. (Figura 12).

Figura 12.- Histograma que muestra el número de miRNAs que cambiaron (subieron y bajaron) y no cambiaron su expresión durante los 4 tiempos evaluados. (A) Histograma para la variedad tolerante. (B) Histograma para la variedad susceptible. En el eje X se indica la variación de tiempo 0 a tiempo 1 ($t_0 \rightarrow t_1$), de tiempo 1 a tiempo 2 ($t_1 \rightarrow t_2$) y de tiempo 2 a tiempo 3 ($t_2 \rightarrow t_3$). Los números dentro de los cuadros indican el porcentaje de miRNAs que cambiaron de un tiempo a otro, según si suben, bajan o mantienen su expresión.

(A)



(B)



Dentro de todos estos miRNAs, los que tuvieron mayor expresión son: stu-miR396-5p, stu-miR156d-5p y stu-miR162b-3p. Sin embargo, estos tuvieron un coeficiente de variación menor a 0.4.

2.4.2.- Generación de grupos de co-expresión génica.

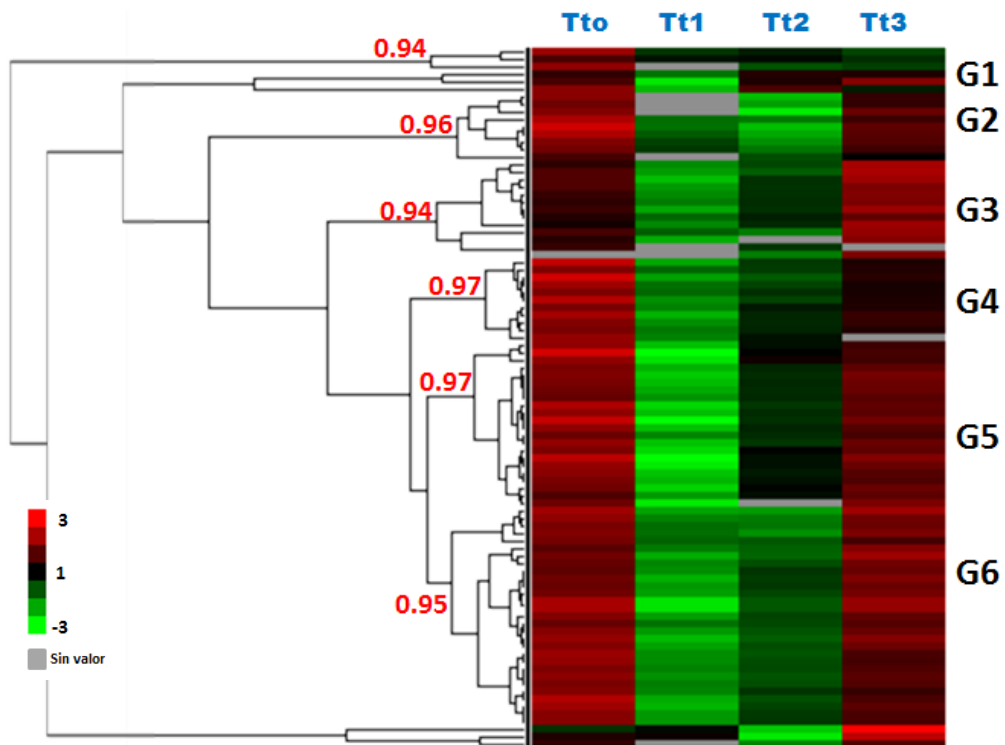
Como resultado del GeneCluster 3.0 se obtuvo dos dendogramas, junto con sus “heatmaps”, uno para la variedad susceptible y el otro para la variedad tolerante. Cada dendograma mostró grupos de miRNAs que tenían una alta correlación.

Los grupos que tuvieron una correlación mayor a 0.94 conformado por más de 3 miRNA, fueron 6 en la tolerante y 4 en la susceptible. Al graficar los patrones de expresión de cada grupo, en base a los “Z-score” de todos los valores de expresión, se

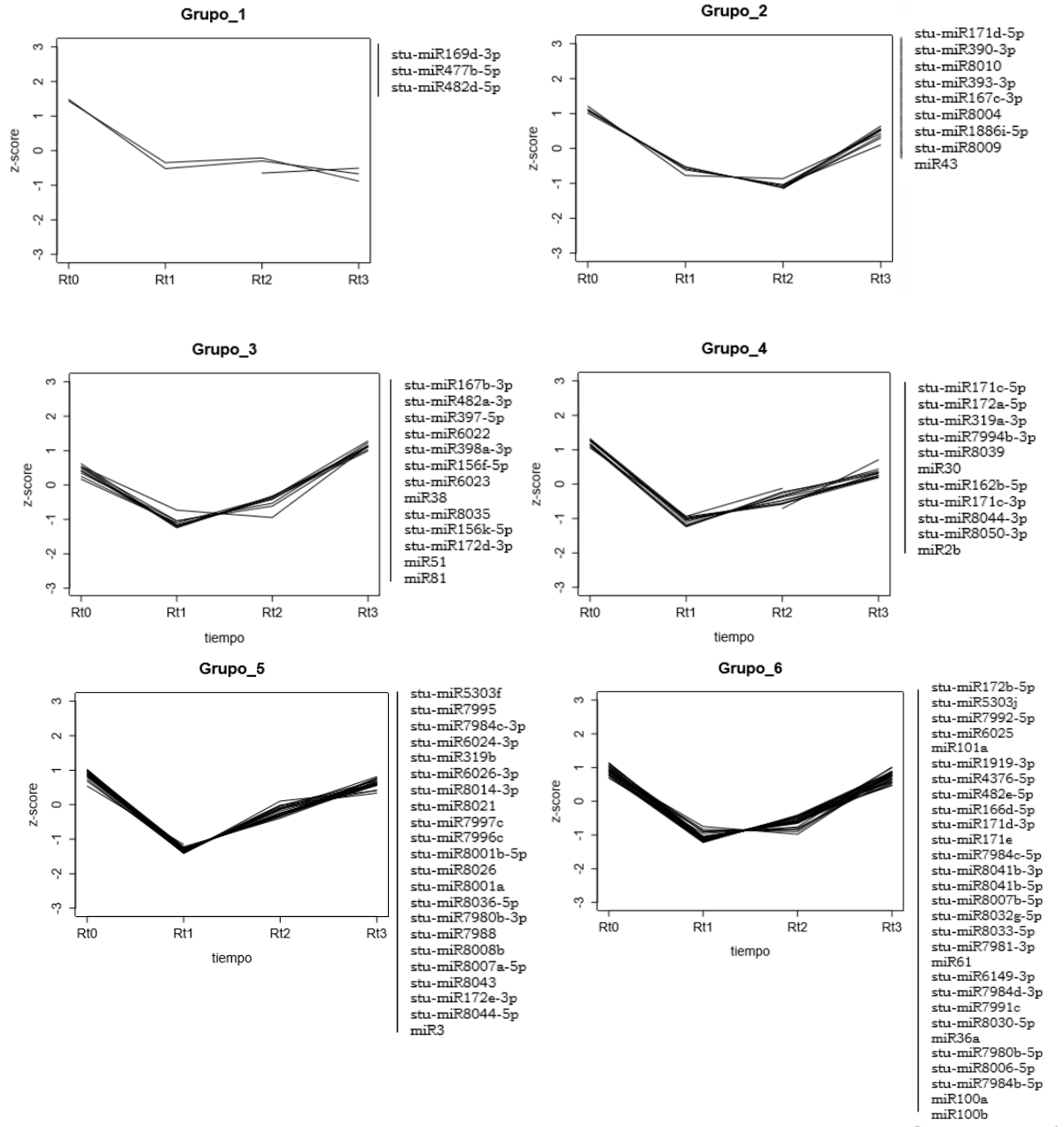
observó una marcada diferencia en el comportamiento de los miRNAs a lo largo de los 4 tiempos, entre los miRNAs de la planta tolerante y los de la planta susceptible. El comportamiento de los miRNAs en la planta tolerante fue el de disminuir drásticamente su expresión como respuesta temprana (Tt1) al estrés, para luego disminuir levemente su expresión en la respuesta tardía (Tt2), y aumentar la expresión de sus miRNAs en la etapa de recuperación (Tt3). Por el contrario, en la variedad susceptible se observó que hubo un aumento en la expresión de los miRNAs con la exposición al estrés, tanto como respuesta temprana (St1) y tardía (St2), para luego disminuir levemente su expresión durante la etapa de recuperación (St3) (Figura 13).

Figura 13.- Grupos de co-expresión génica. La barra al costado de los grupos de co-expresión que están juntos con los heatmaps representan la escala de los niveles de expresión, en base al logaritmo de 2 del valor del TPM. (A) Grupos de co-expresión génica de miRNAs encontrados en la variedad tolerante junto con el heatmap de la expresión de los genes. En rojo se muestra los valores de coeficiente de Pearson encontrados para cada grupo. (B) Patrón de expresión de los 6 grupos de co-expresión génica de la variedad tolerante durante los cuatro tiempos trabajados, en base a los z-score de los valores de expresión (TPM). (C) Grupos de co-expresión génica de miRNAs encontrados en la variedad susceptible junto con el heatmap de la expresión de los genes. En rojo se muestra los valores de coeficiente de Pearson encontrados para cada grupo. (D) Patrón de expresión de los grupos de co-expresión génica de la variedad susceptible durante los cuatro tiempos trabajados, en base a los z-score de los valores de expresión (TPM).

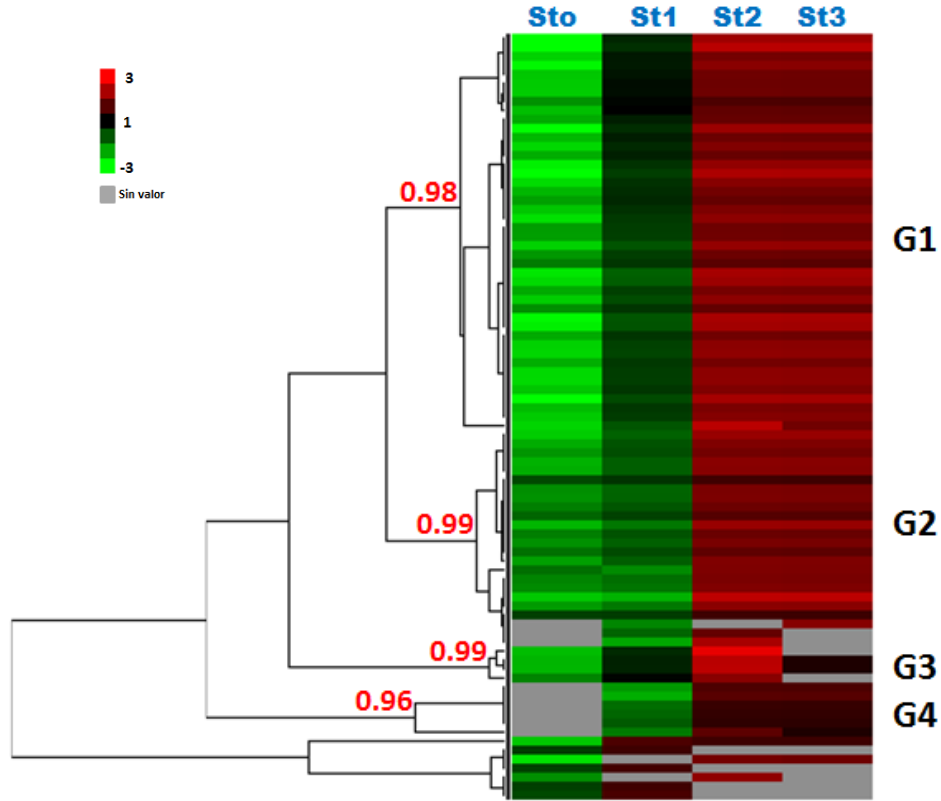
(A)



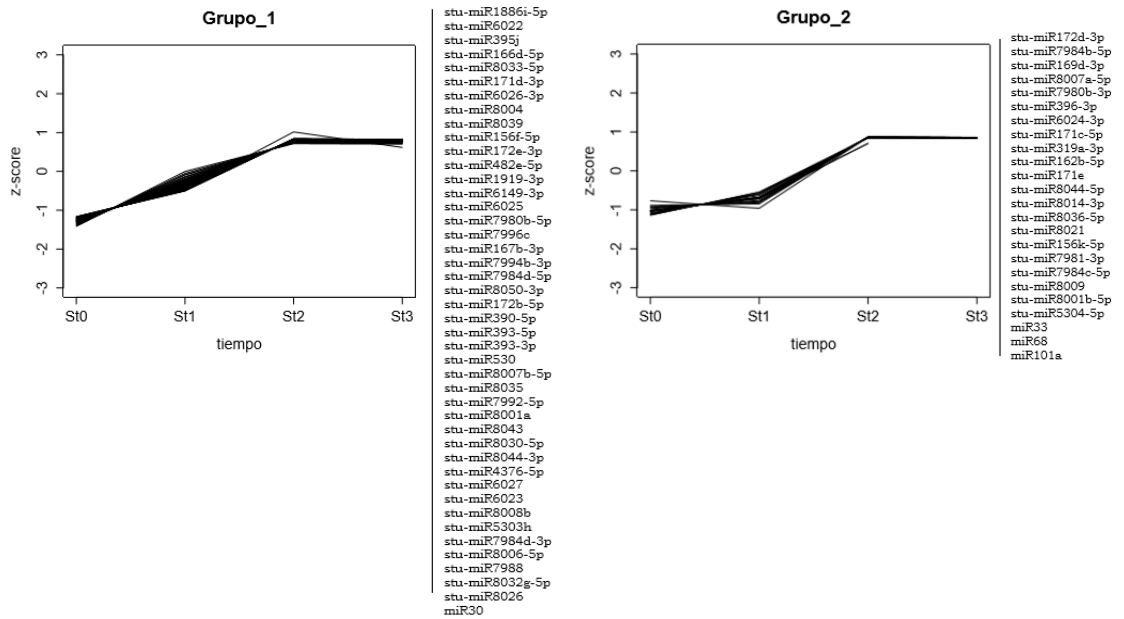
(B)

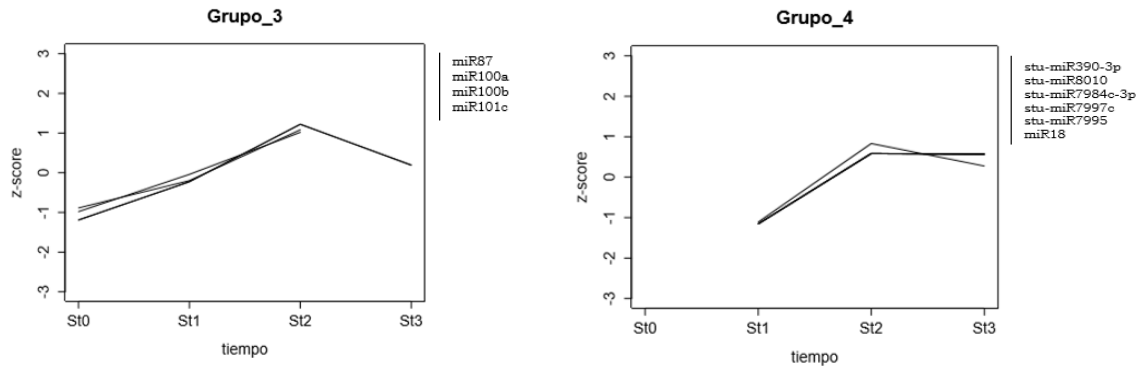


(C)



(D)



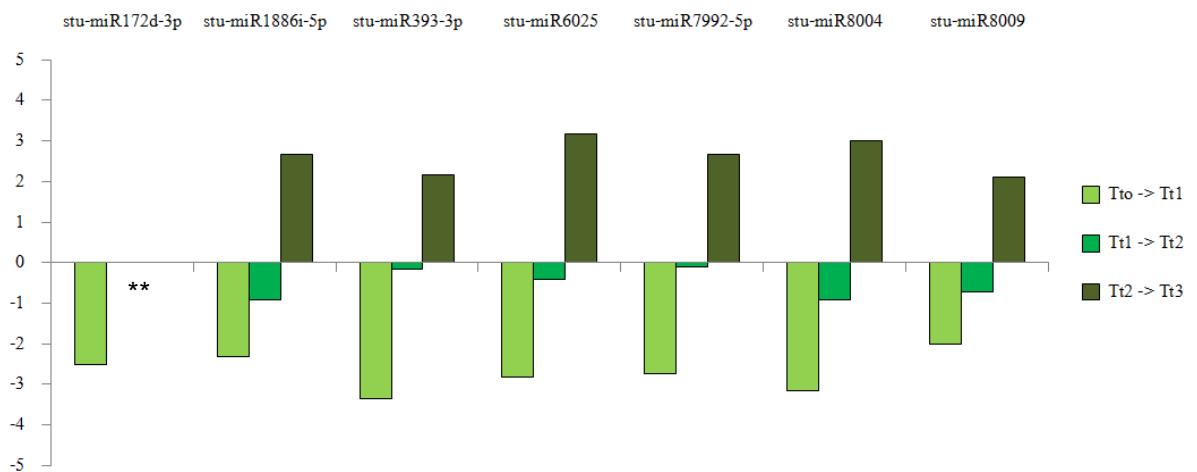


2.4.3.- Identificación de miRNAs relacionados a la tolerancia a estrés hídrico

Según las variaciones observadas en los grupos de co-expresión, los genes seleccionados fueron los que tuvieron cambios de expresión completamente diferentes entre la susceptible y la tolerante, a la vez que tuvieron valores de fold alto (>2). Estos altos valores de fold fueron observados en la tolerante en el paso del tiempo 0 al tiempo 1 ($t_0 \rightarrow t_1$), los mismos que variaron de manera contraria con la etapa de recuperación ($t_2 \rightarrow t_3$). De acuerdo a estos parámetros los miRNAs seleccionados fueron 7 miRNAs: stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009 (Figura 14, Figura 15).

Figura 14.- Cambios de expresión de los miRNAs candidatos a ser parte del fenotipo de tolerancia al estrés hídrico en papa, durante los tiempos evaluados. En el eje X se indican los cambios de tiempo 0 a tiempo 1 ($t_0 \rightarrow t_1$), de tiempo 1 a tiempo 2 ($t_1 \rightarrow t_2$) y de tiempo 2 a tiempo 3 ($t_2 \rightarrow t_3$) de cada uno de los miRNAs seleccionados. En eje Y se muestra los fold-change encontrados en cada cambio de tiempo indicado, en el eje X. Los valores positivos del fold-change indican un aumento de expresión, mientras que los valores negativos, indican disminución. (A) Comportamiento de los miRNAs en la variedad tolerante. En el caso de miR172d-3p se observa que sólo hay una barra que indica el cambio de $t_0 \rightarrow t_1$, esto debido a que en el tiempo 2 el valor de TPM fue igual a cero y por tanto no se pudo calcular el fold change de $t_1 \rightarrow t_2$ ni de $t_2 \rightarrow t_3$ (). (B) Comportamiento de los miRNAs en la variedad susceptible.**

(A)



(B)

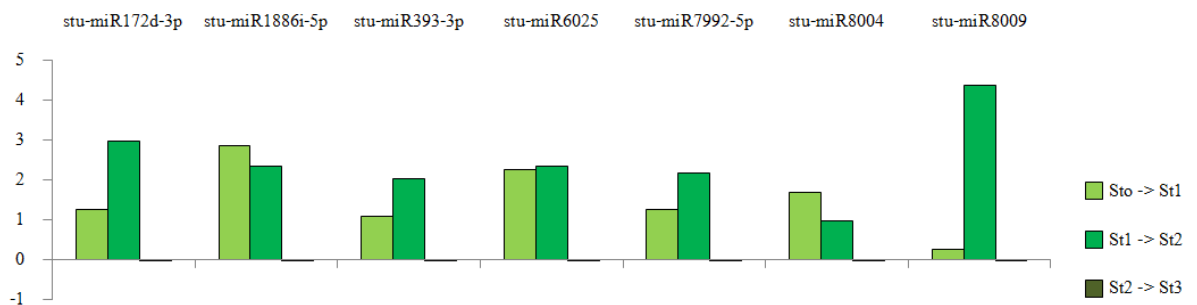
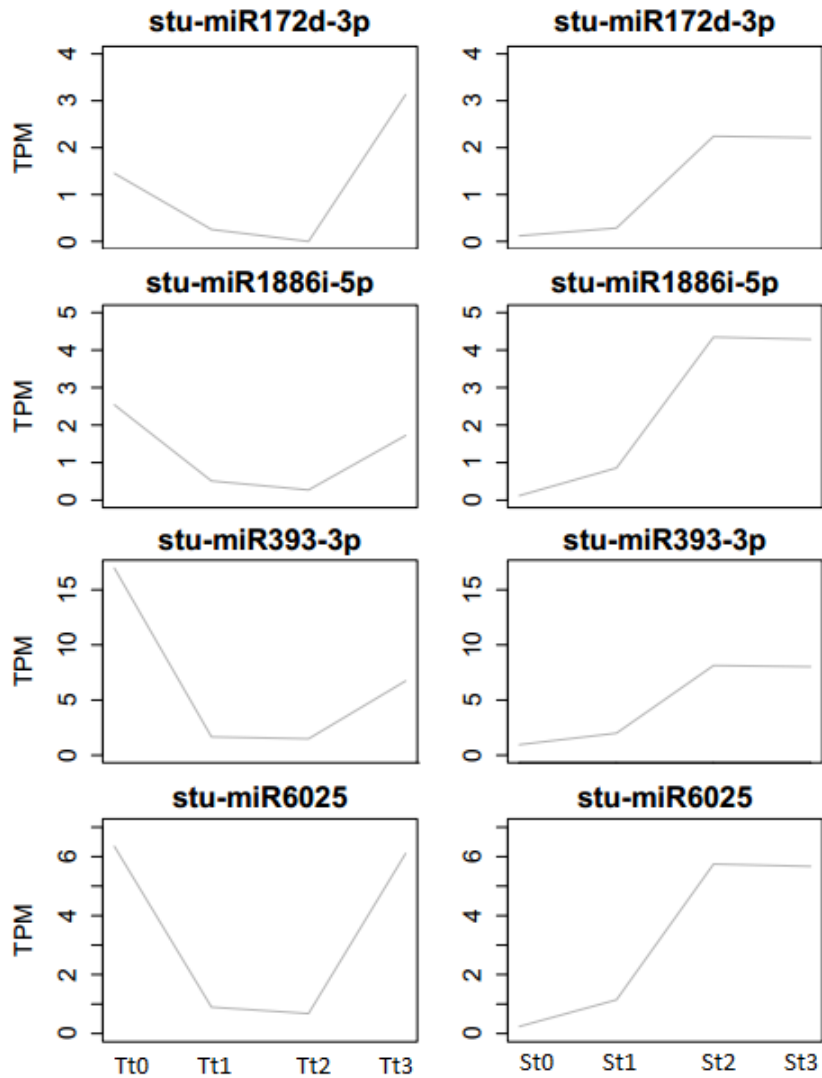
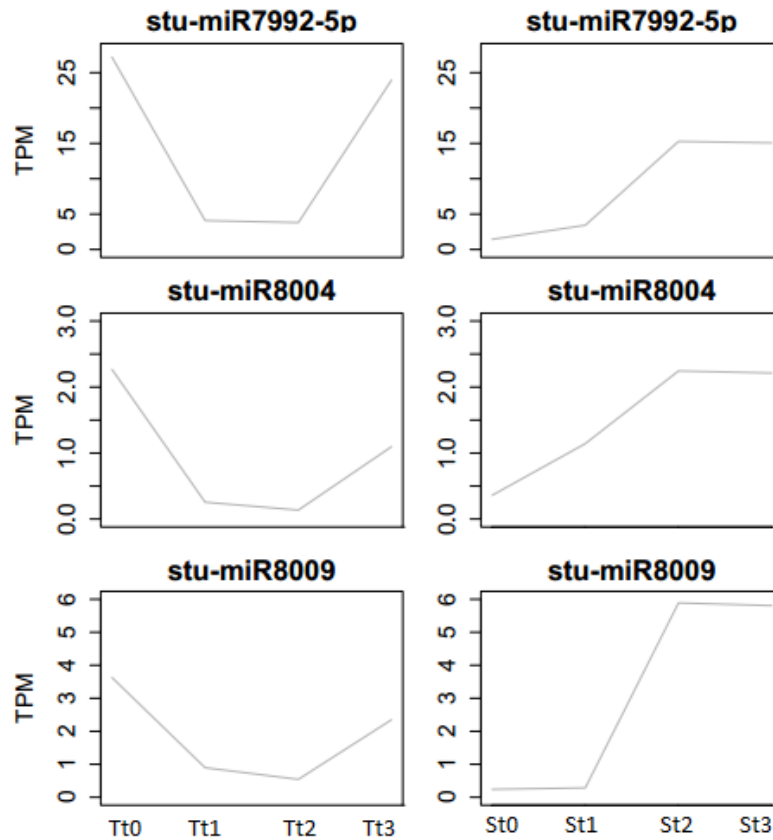


Figura 15.- Plots de los valores de TPM (eje Y) de los 7 miRNAs candidatos a ser parte del fenotipo de tolerancia al estrés hídrico durante los 4 tiempos evaluados (eje X). Izquierda: Gráficas para la variedad tolerante. Derecha: Gráficas para la variedad susceptible.





2.5. Identificación de los genes blanco de los miRNAs secuenciados.

La cantidad de genes blanco obtenidos por cada miRNA fue muy variable, encontrándose como un mínimo de cero y un máximo de 116 genes blanco por miRNA. Estos genes blanco encontrados tanto en la variedad susceptible y tolerante incluyen diversos genes asociados a factores de transcripción, enzimas y otras proteínas funcionales (Tabla 9).

Tabla 9.- Genes blanco de los miRNAs candidatos a dar el fenotipo de tolerancia contra el estrés hídrico. Se encontraron más de una secuencia blanco por cada miRNA, en esta tabla se muestra algunos de los genes blanco identificados para cada miRNA seleccionado, la lista completa se encuentra en el anexo 6.

miRNA	Nombre del gen blanco
stu-miR172d-3p	APETALA2 Auxin-induced protein 5NG4 Zinc finger, RING-type KANADI like transcription factor
stu-miR1886i-5p	GRAS family transcription factor Auxin response factor 1 Acyl-CoA synthetase
stu-miR393-3p	Ccd1 Kinase F-box family protein
stu-miR6025	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 2 Peroxisomal membrane protein pmp34 Regulator of chromosome condensation/beta-lactamase-inhibitor protein II Vacuolar protein sorting-associated protein 2 homolog 2 Acetyl-CoA synthetase Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase, chloroplastic
stu-miR7992-5p	Polygalacturonase Auxin efflux carrier family protein Actin binding protein Zinc finger family protein ARF domain class transcription factor Alpha amylase Amino acid transporter
stu-miR8004	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol Starch branching enzyme Calmodulin
stu-miR8009	(S)-2-hydroxy-acid oxidase DNA binding protein Pyruvate dehydrogenase Peroxidase

2.6. Descripción de la funcionalidad de los genes blanco.

La anotación funcional, los cuales no son mutuamente excluyentes, se realizó en los genes blanco de los miRNAs que se comportaron de manera diferente en la variedad tolerante en relación a la variedad susceptible. Esta anotación mostró que, en relación a los procesos biológicos, la gran mayoría de los genes blanco de los miRNAs estuvieron relacionados a procesos metabólicos. Los siguientes dos procesos más abundantes no denotan especificidad en la función (proceso celular y proceso específico de un organismo, esto último denota que es un proceso biológico que involucra solo un organismo). Dentro de los procesos específicos encontrados, se tiene el de señalización, proceso de desarrollo, proceso de regulación biológica, proceso de respuesta a estímulo, entre otros (Figura 16). En relación a la función molecular, la gran mayoría tenía una función de unión no específica (“binding”), el resto de los genes blanco correspondían a una función de actividad catalítica y de factor de transcripción (Figura 17).

Figura 16.- Anotación funcional de los genes blanco en base a los procesos biológicos en donde intervienen.

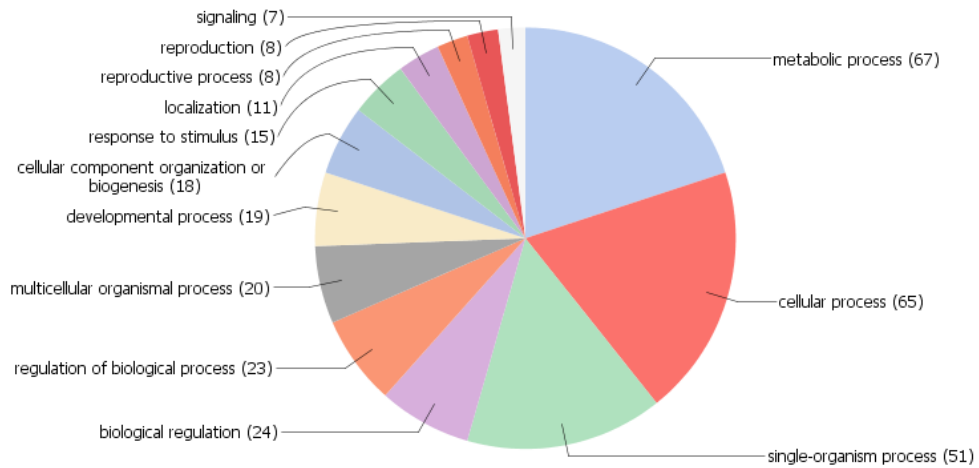
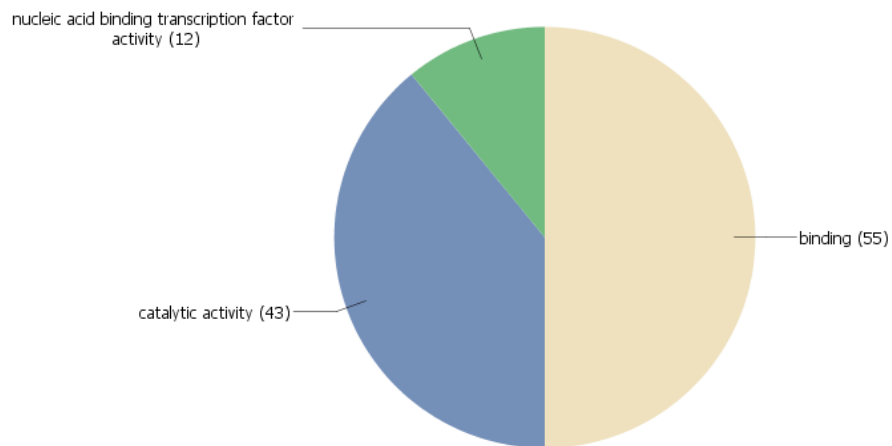


Figura 17.- Anotación funcional de los genes blanco en base a su función molecular.



V. DISCUSIÓN

La sequía es un fenómeno natural que se da progresivamente dentro de un periodo largo, provocando la pérdida del contenido de agua en el suelo. Una vez que la planta detecta una baja disponibilidad de agua, esta expresa una respuesta temprana, que sucede a los segundos o minutos de la detección. Esto a su vez, desencadena respuestas tardías que en algunos casos llegan a formar parte de una respuesta adaptativa de la planta.

En la mayoría de los experimentos relacionados a sequía, este estrés es simulado mediante el corte del riego por varios días, o por medio de la utilización de compuestos como el polietilenglicol, para que en el ambiente de la planta se genere un déficit hídrico, que dispare la respuesta que se dan en una sequía.

En nuestro caso, la simulación de la sequía fue realizada por estrés hídrico generado dentro de un sistema aerónico. Bajo esta metodología, se observó que a los 25 minutos de exposición a estrés, la planta ya mostraba ligeros cambios en la disminución de la tasa fotosintética, lo cual es una respuesta generada al inicio del estrés por sequía, en donde la planta detecta la disminución de agua disponible en su ambiente. Así mismo, según la tasa fotosintética registrada, las plantas respondieron a los 120 minutos de estrés hídrico de manera similar a una respuesta tardía a la sequía. Normalmente estas respuestas, se dan luego de varios días de exposición a estrés en plantas que crecen en suelo. Esto debido a que en la sequía natural la pérdida de agua

en el suelo se da gradualmente, mientras que en aeroponía el corte de riego genera una pérdida total de agua al instante. Es así que la respuesta de la planta dentro del sistema aeropónico viene a ser una ventaja en la metodología, con respecto a otras, ya que bajo tiempos más cortos podemos obtener respuestas que usualmente son generadas a largo plazo, dado en días o semanas.

Entre todas las distintas condiciones (control, respuesta temprana, respuesta tardía y recuperación) a las que se expuso las dos variedades de plantas de *S. tuberosum subsp. Andigena*, se encontraron 259 miRNAs en la variedad susceptible y 298 miRNAs en la variedad tolerante, entre conservados y nuevos identificados. Dentro de los miRNAs conservados, en la variedad tolerante se encontraron 298 familias, mientras que en la susceptible 185 familias. Estos miRNA conservados fueron identificados empleando el archivo de anotación obtenido de la base de datos de la papa del “Potato Genome Resource”. Dentro de este archivo de anotación se encuentran los miRNAs anotados por Zhang *et al.*, 2013, el cual, por su parte trabajando también con una variedad de papa de la subespecie Andígena, identificó 259 miRNAs agrupados en su momento dentro de 28 familias conservadas. En la tesis, a pesar de que se haya trabajado con la misma subespecie de papa con la que Zhang *et al* trabajaron, estas no pertenecen a la misma variedad, además de que las condiciones de trabajo no fueron las mismas. Zhang *et al*, trabajaron con estolones y hojas de plantas bajo crecimiento sin estrés, mientras que en la tesis se trabajó con hojas de plantas de papa bajo distintas condiciones de estrés hídrico (Zhang *et al.*, 2012), por lo que se identificaron nuevos miRNAs no anotados previamente. Estos

miRNAs no anotados, podrían formar parte de lo miRNAs evolutivamente nuevos, o también llamados “Young miRNAs” (Nozawa *et al.*, 2012). El rol de los young miRNAs fue estudiado en dos especies muy cercanas de *Arabidopsis*, en donde como resultado se propuso que estos se originan por duplicación de los genes codificantes y que muchos de estos no tienen una función que llegara a ser relevante (Ma *et al.* 2010). En el caso de la presente tesis, muchos de los miRNAs no conservados, o nuevos, no tuvieron un coeficiente de variación mayor a 0.4, los cuales fueron descartados a ser candidatos en dar la resistencia a las plantas. Esto daría a entender que, al igual que en *Arabidopsis*, estos no tendrían una función relevante, pero para el caso de la tesis sería en relación a la resistencia a la sequía

Por otro lado, los miRNAs identificados en la tesis en las dos variedades de papa, poseen genes blanco cuya función forma parte de la respuesta a sequía de otras especies, tales como *Arabidopsis thaliana* (Harb *et al.*, 2010), arroz (Kumar *et al.*, 2014), cebada (Wang *et al.*, 2015) y en la misma papa (Vasquez-Robinet *et al.*, 2008). Todos estos estudios muestran que, como respuesta a la sequía, se altera la expresión de genes de proteínas funcionales, relacionados a la detoxificación, a la biosíntesis de osmolitos, a la protección de macromoléculas, a la síntesis de transportadores y proteasas; y de genes de proteínas reguladoras, como son los factores de transcripción, fosfatasa, quinasas, los relacionados al metabolismo de fosfolípidos y a la biosíntesis de ABA (Shinozaki *et al.*, 2007). Esto reflejaría una respuesta general compartida de rutas metabólicas frente al estrés hídrico entre distintas especies de plantas.

Sin embargo, a pesar de esto, en los estudios previamente mencionados, se ha observado que el comportamiento de la expresión de los genes en sí, son distintos entre especies y dentro de la misma especie. Bartel y Sunkar mencionan que es muy probable que una planta resistente a la sequía no haya adquirido genes únicos, ya que los genes relacionados al estrés, tal y como muestran los resultados previos, están presentes en el reino vegetal. Frecuentemente al fenotipo de tolerancia se le asocia con patrones de expresión lo cual hasta el momento se desconoce cómo es que se logra (Bartels & Sunkar, 2005). Se tienen evidencia de que los miRNAs juegan un rol importante en la regulación de la expresión de distintos genes, dando patrones particulares de las expresiones de sus genes blanco frente a la respuesta al estrés por sequía. En la tesis, claramente se refleja la diferencia en las expresiones de los miRNAs entre la variedad tolerante y susceptible, lo cual conllevaría a una respuesta diferencial de sus genes blanco. Estos miRNAs serían parte de los causantes que provocan diferencias en los patrones de expresión de los genes codificantes entre las variedades resistente y susceptible, que estaría conllevando a generar la resistencia en una de ellas.

En el presente trabajo, en relación a la respuesta general de la planta con respecto a los 337 miRNAs identificados, la respuesta temprana frente al estrés hídrico de la planta tolerante mostró que la mayor cantidad de miRNAs bajaron su expresión drásticamente, mientras que, en la susceptible, la mayoría de ellos bajaron o subieron levemente su expresión. Sin, embargo, con la exposición prolongada a falta de riego,

la tolerante mantuvo o subió levemente la expresión de sus miRNAs, mientras que en la susceptible la mayoría de ellos recién aumentaron su expresión drásticamente. Esto indicaría que, frente a la sequía, la planta resistente respondería activando sus genes codificantes mediante la represión de sus miRNAs, (lo cual también se observa en los gráficos de grupos de co-expresión); mientras que, en la planta susceptible, esta respuesta es contraria. Zhang *et al.* 2014, por su parte trabajando con una variedad de papa llamada “Zihuabei” y empleando la técnica de “Deep sequencing”, obtuvo una igual cantidad de miRNAs que disminuían e incrementaban su expresión frente al estrés por sequía. Sin embargo, al comparar el comportamiento de los miRNAs encontrados en ambos trabajos, se observó que stu-miR811, stu-miR814, stu-miR169, stu-miR319 y stu-miR395 en la variedad tolerante de la tesis y en la variedad trabajada por Zhang bajaban su expresión durante el estrés, mientras que el comportamiento de stu-miR477 fue similar en la variedad susceptible de la tesis y en la variedad trabajada por Zhang (Zhang *et al.*, 2014-2). Lamentablemente Zhang *et al.*, no especifica si la variedad con la que trabajó era tolerante o susceptible a la sequía (Zhang *et al.*, 2014-2).

Con respecto a la etapa de recuperación, la variedad resistente incrementó la expresión de su miRNAs, indicando que varios genes codificantes volvieron a inhibir su expresión, para volver a un estado inicial, donde no hay exposición a estrés. Por el contrario, en la planta susceptible, muchos de los miRNAs bajaron su expresión levemente, indicando que aún se estaba dando la inactivación de varios genes codificantes.

Por otro lado, en contraste al presente resultado de la tesis, en un estudio realizado en *Vigna unguiculata* (el frijol de Castilla), trabajando con hojas de variedades tolerantes y susceptibles, se observó que en la variedad tolerante la mayoría de los miRNAs inducían su expresión como respuesta a la sequía, mientras que en la variedad susceptible los patrones de expresión mostraron una supresión de los miRNAs (Shui *et al.*, 2013). Dentro de los miRNAs que se identificaron se encuentra la familia conservada de miR156 y miR164, cuyas expresiones bajaron en la variedad tolerante y subieron en la variedad susceptible de papa utilizadas en la presente investigación, mientras que en la especie utilizada por Shui *et al.* fue lo opuesto.

Dentro de cada variedad se encontraron grupos que compartían un patrón de expresión, 6 grupos en la variedad tolerante y 4 grupos en la variedad susceptible. Este indicaría que cada grupo muy probablemente esté jugando un papel importante en la regulación sobre una vía en común. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos sobre sus genes blanco, estos muestran tener distintas funciones, las cuales necesitan ser validadas.

Así también los resultados muestran que dentro de los miRNAs que tuvieron mayor expresión fueron el stu-miR396-5p, stu-miR162b-3p y stu-miR156d-5p, pero los que cambiaron más su fold en la tolerante del t0 al t1 y en la susceptible del t1 al t2, fueron 7 miRNAs: stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009, los cuales fueron seleccionados como

miRNAs relacionados al fenotipo de tolerancia al estrés hídrico en *Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*, mostrando un comportamiento completamente opuesto entre la variedad tolerante y la variedad susceptible.

Estos miRNAs seleccionados estuvieron presentes, tanto en la variedad tolerante y susceptible, bajo riego (control) y sin riego (estrés). Cuando se analizan datos de expresión los resultados se basan en los cambios de expresión ante la respuesta al estrés, no sólo en la ausencia o presencia del gen. Estos 7 miRNAs al tener comportamientos opuestos generarían una respuesta opuesta, que en este caso entre las dos variedades trabajadas, podría ser la tolerancia al estrés hídrico.

Al comparar el comportamiento de los miRNAs identificados en la tesis frente a estrés hídrico en otras especies de plantas se puede observar, más adelante, que el patrón de expresión en algunos casos es distinto. La diferencia de estas respuestas entre distintas especies frente a la sequía, estaría relacionada al requerimiento de agua que tiene cada una de ellas. Mientras que se tiene cultivos que son altamente sensibles al déficit hídrico, como es el caso de la papa, el maíz, caña de azúcar, el tomate y el trigo, hay otras que son más tolerantes como es el caso del algodón y la soya (FAO, 2012). Esto es básicamente dado por las diferencias en la fenología de las plantas, en la cobertura del dosel y la profundidad de raíces que tienen las plantas (FAO, 2012).

Según un estudio previo en papa, miR396 estaría interviniendo en a la respuesta a sequía por medio de su participación en la ruta metabólica para la síntesis de prolina

regulando al gen P5CS. (Yang *et al.*, 2013). Dicho gen codifica una enzima cuya expresión es crítica para la síntesis de prolina bajo condiciones de estrés hídrico y salino. (Kishor *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 2005). Tanto en las 4 variedades trabajadas por Yang *et al.*, (en cuyo estudio no se especifica la tolerancia de las variedades), como en el presente estudio (en la variedad tolerante), se observa que miR396 disminuye su expresión cuando se expone a sequía, con respecto al tiempo control (riego normal), lo cual corrobora la participación de miR396 frente al estrés por sequía en papa.

La expresión diferencial de miR162 bajo estrés hídrico ha sido reportada en maíz, en una variedad tolerante. (Li *et al.*, 2013). En ese estudio se registró que dicho miRNA aumentaba su expresión con la exposición al estrés hídrico, mientras que en el caso del presente estudio el alza de la expresión bajo sequía fue observada en la variedad susceptible. Sin embargo, en algodón bajo un estrés por salinidad, se ha visto que disminuye su expresión a concentraciones altas de sal, lo cual fue observado en la variedad tolerante de papa (Wang *et al.*, 2013).

miR156 es uno de los miRNAs más evolutivamente conservados en las plantas. Dentro de sus genes blanco, se tienen a factores de transcripción llamados “SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKES” (SPLs) (Cardon *et al.*, 1999; Rhoades *et al.*, 2002), lo cual también fue encontrado en este estudio (Anexo 8). En nuestros resultados, el miRNA156 más resaltante viene a ser miR156d, cuyo comportamiento en una variedad de *Phaseolus vulgaris* (frejol común), una especie

muy tolerante a sequía, mostró que a altas condiciones de estrés hídrico aumentó significativamente su expresión con un fold de 1.7. (Nageshbabu *et al.*, 2013). Sin embargo, en arroz este miRNA disminuyó su expresión con la exposición a sequía (Zhou *et al.*, 2010).

En dicho estudio trabajando con arroz también se observó que miR172 disminuía su expresión frente a la sequía, y fue uno de los 4 miRNAs más abundante identificado. (Zhou *et al.*, 2010). Por otro lado, un estudio realizado en papa en el 2011 (en una variedad no identificada como tolerante o susceptible), identificó y mostró el comportamiento de la familia de miR172 bajo distintos tratamientos con PEG para generar estrés hídrico. Como resultado, se observó que miR172d incrementó su expresión conforme aumentaba el tiempo de exposición estrés (Hwang *et al.*, 2011). Mientras que el comportamiento de miR172 observado en la variedad tolerante de la presente tesis se correlaciona con la respuesta en arroz, el comportamiento de miR172 en la variedad susceptible se correlaciona con el comportamiento obtenido en la variedad de papa trabajada por Hwang *et al.* 2011. Esto último podría indicar que la variedad empleada por Hwang viene a ser una variedad susceptible a la sequía.

Tanto miR156 como a miR172, que tienen como genes blanco validados experimentalmente a los factores de transcripción CNR (que codifica una proteína de unión al promotor squamosa) y AP2, respectivamente, se les asocia con el desarrollo floral en *A. thaliana* (Spanudakis & Jackson, 2014; Wollmann *et al.*, 2010), y con el desarrollo y la maduración del fruto en tomate (Karlova *et al.*, 2013); y de los dos

miRNA, a miR172 se la asocia con la etapa de tuberización en papa (Martin *et al.*, 2009). Sin embargo, todos los resultados obtenidos aquí y descritos anteriormente sostienen que tanto la familia de miR156 como miR172 no sólo está asocia con el desarrollo de la planta, sino también a una respuesta bajo estrés.

Con respecto a stu-miR1886i-5p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009 estos no han sido reportados en otras especies, hasta el momento sólo en papa en un estudio en donde se secuenció masivamente todos los ARN pequeños de hoja y estolones de *Solanum andigena* (Zhang *et al.*, 2013). Mientras que stu-miR6025 fue identificado por Li *et al.*, 2012, estudiando la regulación la respuesta inmune de papa, no estando implicado en este proceso. Si bien estos resultados corroboran la presencia de estos miRNAs en papa, lo estudios previos no han mostrado su participación frente al estrés hídrico, con lo cual el presente trabajo vendría a ser el primer reporte de estos miRNAs frente a la respuesta a sequía.

En el estudio realizado por Zhang *et al.*, empleando también el secuenciamiento masivo de ARN pequeños totales, se identificó 4 miRNAs principales que fueron fuertemente regulados por el estrés a sequía: miR811, miR814, miR835 y miR4398, cuyas expresiones disminuyeron con un fold mayor a dos bajo el estrés. (Zhang *et al.*, 2014-2). Sin embargo, dicha lista de miRNAs difiere con los resultados de la presente tesis, en donde se encontró que los miRNAs más relacionados a la tolerancia a sequía fueron stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009, los cuales tuvieron un patrón de expresión

dependiendo de la variedad con la que se trabajó. La diferencia entre ambos estudios, se debe primero a que Zhang *et al.* trabajaron con sólo una variedad de papa (una papa tetraploide llamada “Zihuabei”), mientras que nosotros trabajamos con una variedad tanto resistente y susceptible. Segundo, el estadio de la planta a la que se la sometió a estrés fue distinto. Mientras que ellos trabajaron con una planta de 30 días de crecimiento (etapa antes de la tuberización), nosotros trabajamos con una planta de 3 meses de crecimiento, que es el inicio de la tuberización. Tercero, la simulación de la sequía fue durante 20 días empleando 15% de solución de PEG, no mostrando cuánto fue la caída de la fotosíntesis en este lapso de tiempo, mientras que en nuestro caso la sequía fue simulada dejando el riego por un periodo máximo de 120 minutos, en donde la caída de la fotosíntesis en la tolerante fue del 60% de la fotosíntesis bajo condiciones normales de riego. Mientras que Zhang *et al.*, buscaba encontrar los miRNAs más influenciados por la sequía, mientras que en esta tesis el objetivo es encontrar los miRNAs relacionados a la tolerancia al estrés por sequía.

Se observa que, al comparar los resultados de la tesis con respecto a los resultados obtenidos en estudios previos, bajo sequía el comportamiento de distintos miRNAs puede variar entre distintas especies. Un ejemplo adicional es el de miR169, que disminuye su expresión en *Arabidopsis*, mientras que en arroz aumenta, y en *M. trunculata* no se muestra alteración (Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007; Trindade *et al.*, 2010).

Además, tal y como lo dijo Ferdous *et al*, los mismos miRNAs pueden tener comportamientos diferentes también dentro de la misma especie. (Ferdous *et al.*,

2015). Por ejemplo, además de estudios realizados en papa, también se tiene a miR398a/b en *M. trunculata* el cual aumentó su expresión bajo sequía en un estudio (Trindade *et al.*, 2010), mientras que bajo su expresión en otro estudio (Wang *et al.*, 2011); o miR169 que no varió su expresión en *M. trunculata* (Trindade *et al.*, 2010), mientras que, en otro estudio, en la misma especie, bajo su expresión (Wang *et al.*, 2011). Wang sugiere que esta diferencia es causada por el grado de estrés a la que se expone la planta. (Wang *et al.*, 2011). En nuestro caso, hemos observado que, aunque aumente el tiempo de exposición bajo estrés, en la respuesta de los miRNAs de la variedad tolerante no hay tendencia a correlacionarse con la respuesta en la variedad susceptible, la respuesta sigue siendo distinta. Estas diferencias, más bien, reflejarían una diferencia en la regulación de la expresión del miRNA.

Con respecto a esto último, la transcripción de los genes de miRNAs es dada, al igual que los genes codificantes, por la RNA polimerasa II y es también controlada por factores en trans, que vienen a ser los factores de transcripción que modulan la expresión de miRNAs. En dicha acumulación del miRNA, también intervienen factores en cis (modificaciones de la cromatina), que pueden estar tanto corriente arriba o corriente abajo del gen miRNA, (Meng *et al.*, 2011). Los promotores de los miRNAs presentan características típicas de los promotores controlados por la RNA polimerasa II. Dentro de esta región promotora del gen de los miRNAs se han encontrado SNPs los cuales influyen la expresión de estos miRNAs (Schmeier *et al.*, 2011). En humanos se ha reportado que el SNP rs57095329 localizado en la región promotora del MIR146A, inhibe la expresión de este gen y esta relacionado con la

enfermedad del lupus eritematoso sistémico (Luo *et al.*, 2011). Sin embargo, en planta sólo se ha llegado a la identificación de los SNPs en los promotores de los miRNAs en *Arabidopsis* y arroz, siendo aún necesario estudiar cómo estos repercuten en la transcripción del miRNA y por tanto en la respuesta en la planta (Shao *et al.*, 2013). Por otro lado, la acción de los miRNAs no sólo depende de su expresión, sino también de su decaimiento. En *A. thaliana* y *N. benthamiana* se han identificado “long non coding RNAs” (long ncRNAs) que poseen regiones de unión o complementaridad a los miRNAs, como lo poseen sus respectivos genes blanco. Como consecuencia, estos long ncRNAs funcionan como “esponjas” y secuestran a los miRNAs, inactivando su funcionalidad (Banks *et al.*, 2012). Sin embargo, para tener una mejor comprensión sobre el proceso regulatorio de la acción de los miRNAs aún hacen falta más estudios.

Si la variación de la expresión de los miRNAs, encontrados en la variedad tolerante y susceptible, se diera a causa de variaciones en las regiones reguladoras del gen, podríamos encontrar alelos distintos por cada uno de los 7 miRNA, un alelo presente en la variedad tolerante y otro alelo en la variedad susceptible. La importancia de encontrar estos alelos, radica en que los marcadores moleculares generados a partir de estas secuencias servirían de herramienta para identificar, en base a su presencia y ausencia, variedades tolerantes frente a un estrés hídrico, sin necesidad de evaluar las respuestas fisiológicas de las plantas, que según la metodología empleada demanda un costo de tiempo significativo.

Dentro de los posibles genes blanco de los miRNAs identificados se encontraron diversos genes codificantes involucrados en la respuesta a estrés. En el caso de stu-miR172d se encontró que uno de sus genes blanco era *Apetala2*, el cual es el nombre de una familia de factores de transcripción, en donde se incluyen a las proteínas DREB que son proteínas que se unen a elementos de respuesta a deshidratación (“Dehydration Response Element” o DRE) y controlan la respuesta de genes bajo diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, via la ruta independiente de ABA (Agarwal P. *et al.*, 2006). Son inducidos por baja temperatura, por sal y por deshidratación. Para el caso de DREB1A se ha observado que su sobreexpresión resulta en un aumento a altas concentraciones de sal y bajo estrés hídrico, mientras que DREB1AB aumenta su expresión bajo estrés por frío (Dubouzet *et al.*, 2003). En papa, empleando la técnica de microarreglos, se observó que bajo estrés hídrico, reduciendo el riego por 21 días en un 50% del estado inicial con riego, DREB1 tenía una alta expresión en la variedad tolerante de papa en comparación con la variedad susceptible, ambas con ~51 días de crecimiento en maceta (Legay *et al.*, 2011). Este aumento de expresión se correlaciona con la baja expresión de stu-miR172d en la variedad tolerante expuesta a estrés hídrico por 40 y 120 minutos en el sistema aeropónico. Esto reflejaría que el aumento de la expresión de AP2 que da la tolerancia a sequía en papa, se daría por la represión de miR172, el cual se encarga de regular negativamente la expresión de esta familia de factores de transcripción.

Para stu-miR1886i se encontró como gen blanco a un factor de transcripción de la familia GRAS. Estas proteínas juegan diversos roles en la planta en la traducción de

señales de giberilina, en el desarrollo de la raíz y meristemas, en respuesta a estrés biótico y abiótico (Bolle C., 2004). Un miembro de esta familia de genes, el gen OsGRAS23, localizado en un intervalo de un QTL de resistencia a sequía en arroz, fue aislado, introducido y sobreexpresado en variedad de arroz. Si bien la sobreexpresión no conlleva a cambios morfológicos significativos en comparación con la planta silvestre (no transformada) en la etapa adulta de la planta, bajo deshidratación la variedad transformada mostró menor grado de marchitez y mejor recuperación del estrés en comparación a la variedad silvestre. Para este experimento se evaluaron plantas de ~2 semanas antes de entrar a la etapa de florecimiento y para el estrés se dejó de suplir agua hasta que las hojas lleguen a enrollarse. Además del menor grado de marchitez, se observó que había una mayor cantidad de plantas transformadas que sobrevivieron al estrés hídrico en comparación a las silvestres. La respuesta de esta planta transformada muestra como la sobreexpresión del gen OsGRAS23 conlleva a la planta de arroz a aumentar su resistencia a sequía (Xu *et al.*, 2015). Como respecto al resultado de la tesis, la baja expresión de stu-miR1886i como respuesta al estrés hídrico en la variedad tolerante de papa, generaría más expresión de su gen blanco GRAS. Lo opuesto ocurre en la variedad susceptible en donde la expresión de este miRNA se induce bajo el estrés hídrico. Por lo tanto, esto indicaría que el resultado obtenido en arroz podría ajustarse al modelo de tolerancia en papa obtenida en la tesis.

Para stu-miR393 se observó a Ccd1, “CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 1” como uno de sus genes blanco. Ccd1 pertenece al grupo de

proteínas con actividad 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), los cuales son enzimas que clivan carotenoides para la producción de ABA. NCED ha sido involucrado en la respuesta a sequía en *Populus* (Viger *et al.*, 2011). En el caso de papa, según el resultado obtenido en el presente trabajo, la expresión de NCED incrementaría por la disminución de su represor *stu-miR393*. Esta respuesta dada sólo por la variedad tolerante, reflejaría que la mayor producción de ABA, dado por NCED, es una respuesta no sólo a la sequía, como en *Populus*, sino también de tolerancia en papa.

Uno de los genes blanco de *stu-miR6025* viene a ser la ribulosa-1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO), el cual Legay *et al.*, 2011 observó que en papa, bajo sequía, su expresión disminuye por represión de su activador, la enzima Rubisco activasa, generando una disminución en la asimilación de CO₂ en la planta (Legay *et al.*, 2011). Según el resultado obtenido en la tesis, la disminución de RuBisCO no sólo vendría a darse por inhibición de su activador, la rubisco activasa, sino también por aumento de su represor *stu-miR6025*, lo cual ocurriría en la variedad susceptible, trabajada en la tesis. Sin embargo, en la variedad tolerante, la expresión de RuBisCO se incrementaría por la baja expresión de su represor *stu-miR6025*, dada drásticamente en la respuesta temprana a la sequía. Una de las primeras respuestas de la planta viene a ser el cierre de estomas, con lo cual se evita la pérdida de agua por evotranspiración, limitando también la entrada de CO₂ a la planta. Ante esto, la planta tolerante podría responder aumentando la cantidad RuBisCO para asimilar la mayor cantidad de CO₂ en la planta, su fuente de energía, durante la sequía. Si bien en la

respuesta temprana, en las plantas estudiadas ya se tiene una disminución en a la tasa fotosintética, ésta aún no cesa, por lo que aún hay una entrada limitada de CO₂, siendo la actividad fotosintética mayor en la variedad tolerante, en comparación a la variedad susceptible (datos no mostrados), lo cual podría explicarse por la mayor cantidad de RuBisCO producida en la primera, por menor expresión de su represor stu-miR6025.

Dentro de los genes blanco de stu-miR7992 se tiene al factor de transcripción con dominio ARF (“Auxin response factor”). Estos se encuentran involucrados en la traducción de señales de auxina, uniéndose a los elementos cis de los genes inducidos por auxina, siendo el desarrollo de la raíz bajo estrés a sequía una acción coordinada/regulada entre la auxina, ABA y citokininas (Van Ha C. *et al.*, 2013). Dicha respuesta de crecimiento de la raíz viene a ser una respuesta de adaptación bajo estrés hídrico ya que esto le permita a la planta llegar a lo más profundo del suelo para que pueda absorber agua. En la variedad tolerante de papa empleada en la presente tesis, la disminución de la expresión de stu-miR7992, aumentaría la expresión de su gen blanco, que vienen a ser los factores de transcripción con dominio ARF, con lo cual muy probablemente aumentaría el tamaño de las raíces de la planta para generar más absorción de agua.

Otro gen blanco encontrado para stu-miR7992 viene a ser la alfa amilasa, la cual incrementa su expresión bajo estrés hídrico en plantas de cebada, observado mediante hibridización de cDNAs de alfa amilasa, marcados radiactivamente, con la fracción

de ARN extraído de plantas estresadas y bajo condiciones de riego (Jacobsen J. *et al.*, 1986). Legay *et al.*, menciona que en su trabajo con variedades de papa tolerantes y resistentes a sequía, en ambos se da una disminución de carbohidratos bajo el efecto de la sequía lo cual explican que puede deberse por una reducción en la fijación de carbono y la disminución en la expresión de genes que intervienen en el ciclo de Calvin. Sin embargo, también se menciona que, contrariamente, en muchas otras especies la concentración de carbohidratos es aumentada por efecto de la sequía (Legay *et al.* 2011, Xue *et al.*, 2008). La planta ante el déficit de agua responde con el cierre de estomas, lo cual conlleva a una reducción de la fijación de CO₂ alterando el metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, a pesar de esto, la planta tiende a acumular una gran cantidad de carbohidratos solubles, tales como glucosa, fructosa, manitol entre otros. Estos carbohidratos solubles son usados como osmolitos para mantener el turgor de las hojas, para proteger la integridad de la membrana y prevenir la denaturación de proteínas (Bartels & Sunkar *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2008) por lo que el aumento en la concentración de azúcares es considerado una respuesta adaptativa a la sequía en algunas especies, lo cual vendría a ser concordante con un aumento en la expresión de una alfa amilasa por la disminución de su represor, el stu-miR7992., dado por la variedad tolerante, y contrariamente visto en la variedad susceptible.

Por otro lado, stu-miR8004 tiene como gen blanco a una calmodulina, el cual es un sensor de Ca²⁺, que en planta es nombrado como “proteínas similares a calmodulinas” (calmodulin-like protein o CML). En arabidopsis, por medio de PCR

en tiempo real y microarreglos, se ha observado que confiere tolerancia a sequía a través de la ruta mediada por ABA (Xu G. *et al.*, 2011). En el presente trabajo realizado en papa, la variedad tolerante tiene una baja expresión de stu-miR8004 bajo estrés hídrico, con lo cual aumentaría la expresión de su gen blanco la calmodulina, y por tanto el Ca²⁺ sería captado más eficazmente. Como proteína de unión a calmodulina se ha encontrado a atMYB, para regular la expresión de genes bajo condiciones de estrés hídrico y salino (Ranty *et al.*, 2006).

A pesar de que se tenga identificado de manera *in silico* las secuencias blanco de cada miRNA, es necesario validar su acción sobre sus respectivos genes blanco en la mismas plantas trabajadas. Sunkar *et al.*, menciona que hay mutaciones en los ARNm dentro de las regiones que son sitios de unión para los miRNAs, que afectan la unión miRNA:gen blanco (Allen & Millar, 2012). Por ejemplo, en Arabidopsis se han encontrado alelos dominantes con variaciones de simple nucleótido en la región de unión al miR165/miR166 de genes que codifican factores de transcripción de la clase PHB (McConnell et al. 2001), PHV (McConnell et al.2001), REV (Emery et al. 2003) y ATHB-15 (Kim et al. 2005). Dichas mutaciones conllevan a defectos en el desarrollo vascular de la planta (Allen & Millar, 2012). Sin embargo hasta el momento no se tienen estudios en donde se correlaciona las variaciones en la región de unión de los genes blanco con el miRNA, con respecto a una variación de la respuesta antes un estrés abiótico entre diferentes variedades plantas. Debido a estos casos, es importante validar la unión de los miRNAs con los genes blanco para

determinar si realmente el miRNA ejerce la función esperada, en este caso, en relación al estrés hídrico.

En esta tesis, los miRNAs encontrados como asociados a la tolerancia a sequía son miRNAs que incluyen familias de miRNAs asociados también a sequía en otras especies al igual que sus genes blanco. Así mismo, los resultados muestran en general, que la expresión de los miRNAs se altera de acuerdo al tiempo de exposición a estrés hídrico, respondiendo a patrones diferentes en base a la variedad analizada. Estos datos exploratorios indicarían la participación de los miRNAs en la respuesta a la tolerancia a la sequía, como parte de la regulación génica durante la exposición a este estrés.

VI. CONCLUSIONES

La respuesta de las dos variedades de plantas frente al estrés hídrico mostró patrones diferentes de expresión de sus miRNAs. Mientras que la planta tolerante responde, principalmente, con una disminución en la expresión de sus miRNAs como respuesta al estrés, la planta susceptible la aumenta.

Con respecto a la etapa de recuperación, en la planta tolerante se observa que los miRNAs tienden a aumentar su expresión, lo cual indicaría que hay una tendencia a alcanzar el estado inicial de expresión de sus genes, antes de iniciar el estrés. Dicho comportamiento no se muestra en la variedad susceptible, en donde la expresión, si bien ya no sigue en aumento, tiende a mantenerse.

Como resultado del análisis de expresión, los miRNAs candidatos a formar parte del grupo de genes que dan el fenotipo de la tolerancia al estrés hídrico, vienen a ser: stu-miR172d-3p, stu-miR1886i-5p, stu-miR393-3p, stu-miR6025, stu-miR7992-5p, stu-miR8004 y stu-miR8009. Algunos de ellos han sido involucrados en el desarrollo de la planta, sin embargo, nuestros resultados, así como algunas referencias anteriores, muestran su participación frente a una respuesta a sequía.

VII. REFERENCIAS

- Adams, M., Kelley, J., Gocayne, J., Dubnick, M., Polymeropoulos, M., Xiao, H., Merril, C., Wu, A., Olde, B., Moreno, R., et al. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252(5013):1651-6.
- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25(12), 1263–1274.
- Arasu, P., Wightman, B., & Ruvkun, G. (1991). Temporal regulation of antagonistic action of two other heterochronic genes. *Genes Dev.* 5. 1825-1833.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., & Sherlock, G. (2000). The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, 25(1), 25–29.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J., Davis, A., Dolinski, K., Dwight, S., Eppig, J., Harris, M., Hill, D., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J., Richardson, J., Ringwald, M., Rubin, G., Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 25(1):25-9.
- Axtell, M. & Bowman, J. 2008. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci.* 2008 Jul;13(7):343-9.
- Banks, I., Zhang, Y., Wiggins, B., Heck, G., Ivashuta, S (2012). RNA decoys: an emerging component of plant regulatory networks? *Plant Signal Behav.* 7(9):1188-93.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23–58.
- Baskerville, S., & Bartel, D. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(3), 241–7.
- Bhardwaj, A., Joshi, G., Kukreja, B., Malik, V., Arora, P., Pandey, & R., Agarwal, M. (2015). Global insights into high temperature and drought stress regulated genes by RNA-Seq in economically important oilseed crop Brassica juncea. *BMC Plant Biology*, 15(1), 9.
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H., & Banerjee, A. K. (2014). MicroRNA156: A Potential Graft-Transmissible MicroRNA That Modulates Plant Architecture and Tuberization in Solanum tuberosum ssp. andigena. *Plant Physiology*, 164(2), 1011–1027.
- Bohnert, H., Nelson, D., & Jensen, R. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7(7), 1099–1111.

- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta*, 218(5), 683–692.
- Boyer, J. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443–448
- Bradeen & Kole. (2011). Genetics, Genomics and Breeding of Potato. *CRC Press. Taylor & Francis Group*.
- Bradshaw, J.E., Bryan, G.J. & Ramsay, G. (2006). Genetic Resources (Including Wild and Cultivated Solanum Species) and Progress in their Utilization in Potato Breeding. *Potato Research* 49, 49-65.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185–1190.
- Cardon G., Hohmann, S., Klein J., Nettessheim K., Saedler H., Huijser P. (1999). Molecular characterization of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene* 237:91-104.
- Chapman E. & Carrington J. 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8, 884-896
- Chaves, M. (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany*, 89(7), 907–916.
- Conesa, A., & Gotz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11(1), 163.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431–442.
- Davies, W. J., & Zhang, J. (1991). Drying Soil Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 55–76.
- Denoeud, F., Carretero-Paulet, L., Dereeper, A., Droc, G., Guyot, R., Pietrella, & M., Lashermes, P. (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6201), 1181–4.
- Dong, Z., Han, M.-H., & Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 9970–9975.
- Du, T. & Zamore P. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132(21), 4645–4652.
- Dubouzet, J., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 33:751–763

- Ekanayake, I. J., & Midmore, D. J. (1992). Genotypic variation for root pulling resistance in potato and its relationship with yield under water-deficit stress. *Euphytica*, 61(1), 43–53.
- Emery, J., Floyd, S., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N., Izhaki, A., Baum, S., Bowman, J.(2003). Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol.*, 13, pp. 1768–1774
- Ewing, E., & Struik, P. C. (1992). *Tuber formation in potato: induction, initiation, and growth. Horticultural Reviews* (Vol. 14).
- Fan, S., Li, Q., Guo, G., Gao, J., Wang, X., Guo, Y., John, C., & Du, Y. (2015). Identification of microRNAs in two species of tomato, *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*, by deep sequencing. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(1), 42–49.
- Ferdous, J., Hussain, S. S., & Shi, B. (2015). Role of microRNAs in plant drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, (December), 1–13.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and Metabolic Limitations to Photosynthesis under Drought and Salinity in C₃ Plants. *Plant Biology*, 6(3), 269–279.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., & Medrano, H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, 172(1), 73–82.
- Food and Agriculture Organization (FAO) and the International Institute of Applied Systems Analysis. (2007). Mapping biophysical factors that influence agricultural production and rural vulnerability. ENVIRONMENT AND NATURAL RESOURCES, SERIES 11.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2008): <http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/cultivation.html>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2012) FAOSTAT.
- Food and Agriculture Organization. FAO (2012). Crop yield response to water. FAO irrigation and drainage paper.
- Friedlander, M. R., MacKowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2012). MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 37–52.
- Gabriel, J., Ancasi G., Angulo, A., Magne J., La Torre, J., & Mamani, P. (2012). Genetically-induced drought resistance in potato hybrids (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Latinoamericana de la Papa*. Vol. 17 (1): 97 – 124.
- Gong, L., Zhang, H., Gan, X., Zhang, L., Chen, Y., Nie, F., & Song, Y. (2015). Transcriptome Profiling of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. *PloS One*, 10(5), e0128041.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M. M. R., & Pereira, A. (2010). Molecular and Physiological Analysis of Drought Stress in Arabidopsis

Reveals Early Responses Leading to Acclimation in Plant Growth. *Plant Physiology*, 154(3), 1254–1271.

- Hawkes J, (1990). The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resource. Belhaven Press, London, England. Pag. 733-735.
- Hawkes, J. (1978). History of the Potato. The Potato Crop: The scientific basis for improvement. History of Potato. Springer-Science. Pag. 1-12. Edited by P. M. Harris
- Hijmans, R. J. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*, 80(4), 271–279.
- Hirakawa, H., Shirasawa, K., Miyatake, K., Nunome, T., Negoro, S., Ohyama, A., & Fukuoka, H. (2014). Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 21(6), 649–60.
- Huamán, Z. (1983). The breeding potential of native Andean cultivars. Research for the potato in the year 2000. Proceedings of the 10th Anniversary of the International Potato Center, 22-27 February 1983, Lima, Peru. Edited by W.J. Hooker. CIP, Lima, Peru. Pp 96-97.
- Hwang, E., Shin, S.-J., & Kwon, H. (2011). Identification of MicroRNAs and Their Putative Targets that Respond to Drought Stress in *Solanum tuberosum*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(3), 317–324.
- Jacobsen J., Hanson A., Chandler P. (1986). Water stress enhances expression of an α -amylase gene in barley leaves. *Plant Physiology* 80, 350-359.
- Jaillon, O., Aury, J., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., & Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463–7.
- Ji, Z., Wang, G., Xie, Z., Wang, J., Zhang, C., Dong, F., & Chen, C. (2012). Identification of Novel and Differentially Expressed MicroRNAs of Dairy Goat Mammary Gland Tissues Using Solexa Sequencing and Bioinformatics. *PLoS ONE*, 7(11), 1–12.
- Jia, W., & Zhang, J. (2008). Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 772–777.
- Karlova, R., van Haarst, J. C., Maliepaard, C., van de Geest, H., Bovy, A. G., Lammers, M., & de Maagd, R. A. (2013). Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1863–1878.
- Kesaulya, H., Baharuddin, Zakaria B. & Syaiful S. 2015. Morphological Characteristics of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Variety Hartapel Origin South Buru-Moluccas. Vol. 2(2): 15-21
- Kim, J., Jung, J., Reyes, J., Kim, Y., Kim, S., Chung, K., Kim, J., Lee, M., Lee, Y., Narry Kim, V. et al. (2005) microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J* 42:84–94

- Kim, V. N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells*, 19(1), 1–15.
- Kim, V., & Nam, J. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in Genetics*, 22(3), 165–173.
- Kishor, P., Hong, Z., Miao, C., Hu, C., & Verma D. (1995). Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1 394
- Kitazumi, A., Kawahara, Y., Onda, T. S., Koeyer, D. De, & de Los Reyes, B. G. (2015). Implications of miR166 and miR159 induction to the basal response mechanisms of an andigena potato (*Solanum tuberosum* subsp. andigena) to salinity stress, predicted from network models in Arabidopsis. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil National de Recherches Canada*, 58(1), 13–24.
- Kramer, P. 1983. Water deficits and plant growth. pp: 342-389. In: P.J. Kramer (ed.). *Water Relations of Plants*. Academic Press, New York.
- Kumar, A., Dixit, S., Ram, T., Yadaw, R. B., Mishra, K. K., & Mandal, N. P. (2014). Breeding high-yielding drought-tolerant rice: genetic variations and conventional and molecular approaches. *Journal of Experimental Botany*, 65(21), 6265–6278.
- Lagos-Quintana, M. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), 858–62.
- Le Houérou, H. N. (1996). Climate change, drought and desertification. *Journal of Arid Environments*, 34(2), 133–185.
- Lee & Ambros. (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 862–864.
- Lee, R. & Ambros V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & II-14, 75, 843–854.
- Legay, S., Lefèvre, I., Lamoureux, D., Barreda, C., Luz, R. T., Gutierrez, R., & Schafleitner, R. (2011). Carbohydrate metabolism and cell protection mechanisms differentiate drought tolerance and sensitivity in advanced potato clones (*Solanum tuberosum* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 11(2), 275–291.
- Li, F., Zuo, R., Abad, J., Xu, D., Bao, G., Li, R. (2012). Simultaneous detection and differentiation of four closely related sweet potato potyvirus by a multiplex one-step RT-PCR. *J Virol Methods*. 186(1-2):161-6
- Li, J. S., Fu, F. L., an, M., Zhou, S. F., She, Y. H., & Li, W. C. (2013). Differential Expression of MicroRNAs in Response to Drought Stress in Maize. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(8), 1414–1422.

- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15: 1501 – 1507.
- Li, W., Oono, Y., Zhu, J., He, X., Wu, J., Iida, K., & Zhu, J. (2008). The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. *The Plant Cell Online*, 20(8), 2238–2251.
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Zheng, Y., Li, G., Yu, L., & Yang, R. (2010). Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering. *Physiologia Plantarum*, 139(1), 39–54.
- Liu, H., Tian, X., Li, Y., Wu, C., & Zheng, C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(5), 836–43.
- Liu, Y. X., Wang, M., & Wang, X. J. (2014). Endogenous Small RNA Clusters in Plants. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 12(2), 64–71.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., & Carrington, J. C. (2002). Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *Society*, 14(July), 1605–1619.
- Luo, X., Yang, W., Ye, D., Cui, H., Zhang, Y., Hirankarn N., et al. (2011). A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*. 7.
- Ma, Z., Coruh, C., & Axtell, M. 2010. Arabidopsis lyrata small RNAs: transient MIRNA and small interfering RNA loci within the Arabidopsis genus. *Plant Cell* 22:1090–1103.
- Maathuis (2007). Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. Root signaling in response to drought and salinity. Pag. 317-328.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal*, 23(16), 3356–64.
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L., & Nguyen, H. T. (2009). Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1260–1276.
- Mane, S. P., Robinet, C. V., Ulanov, A., Schafleitner, R., Tincopa, L., Gaudin, A., & Grene, R. (2008). Molecular and physiological adaptation to prolonged drought stress in the leaves of two Andean potato genotypes. *Functional Plant Biology*, 35(8), 669–688.
- Martin, A., Adam, H., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., González-Schain, N. D., & Suárez-López, P. (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development (Cambridge, England)*, 136(17), 2873–2881.

- Mathelier A. & Carbonet A. 2013. Large scale chromosomal mapping of human microRNA structural clusters. *Nucleic Acids Res* 41, 4392-4408.
- McConnell, J., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., Barton, M. (2001). Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature*, 411, pp. 709–713
- Meier U (2001). Estadíos de las plantas mono-y dicotiledóneas. BBCH Monografía. Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura. Cidade País 149 p.
- Meng, Y., Shao, C., & Chen, M. (2011). Toward microRNA-mediated gene regulatory networks in plants. *Briefings in Bioinformatics*, 12(6), 645–659.
- Meyers, B., Axtell, M., Bartel, B., Bartel, D., Baulcombe, D., Bowman, J., & Zhu, J. (2008). Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, 20(12), 3186–3190.
- Monneveux, P., Ramírez, D., & Pino, M. (2013). Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.). Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant Science*, 205-206, 76–86.
- Muckstein, U., Tafer, H., Hackermuller, J., Bernhart, S. H., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2006). Thermodynamics of RNA-RNA binding. *Bioinformatics*, 22(10), 1177–1182.
- Nageshbabu, R., Jyothi, M. N., Sharadamma, N., Sarika, S., Rai, D. V, & Devaraj, V. R. (2013). Expression of miRNAs regulates Growth and Development of French bean (*Phaseolus vulgaris*) under Salt and Drought Stress conditions. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(1), 52–56.
- Nozawa, M., Miura, S., & Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biology and Evolution*, 4(3), 230–239.
- Obidiegwu, J. E. (2015). Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in Plant Science*, 6(July), 1–23.
- Otazu, V. (2010). *Manual on quality seed potato production using aeroponics*. International potato Centre (CIP). Lima, Peru. 44pp.
- Pardo, D., & Castillo, L. (2013). Informe Nacional del Perú. Las condiciones de sequía y estrategias de gestión en el Perú. Autoridad Nacional del Agua.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 12(17), 1484–1495.
- Pasquinelli, A., Reinhart, B., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), 86–89.
- Pennisi, E. (2008). PLANT GENETICS: The Blue Revolution, Drop by Drop, Gene by Gene. *Science*, 320(5873), 171–173.
- PREDES (2011): <http://www.predes.org.pe/sequias>

- Prochnik, S., Marri, P. R., Desany, B., Rabinowicz, P. D., Kodira, C., Mohiuddin, M., & Rounsley, S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biology*, 5(1), 88–94.
- Ranty, B., Aldon, D., & Galaud, J. (2006). Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. *Plant Signaling & Behavior*, 1(3), 96–104.
- Ray, S., & Satya, P. (2014). Next generation sequencing technologies for next generation plant breeding. *Frontiers in Plant Science*, 5(July), 1–4.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, a E., Bettinger, J. C., Rougvie, a E., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., & Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Dev.* 16: 1616–1626.
- Rhoades M., Reinhart B., Lim L., Burge C., Bartel B., Bartel D. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513–520.
- Ritter, E., Barandalla, L., Lopez, R. & de Galarreta, J.I. (2008). Exploitation of exotic, cultivated *Solanum* germplasm for breeding and commercial purposes. *Potato Res.* 51: 301-311.
- Robert, S. & Millar, A. (2012). Signaling and Communication in Plants. MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. Genetic and Molecular Approaches to Assess MicroRNA Function. Pag. 123- 143. Edited by Sunkar.
- Ross, H. (1986). *Potato breeding – problems and prespectives*. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
- Schapendonk, A., Spitters, C., & Groot, P. (1989). Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *European Association of Potato Research*, 32(1), 17–32.
- Schmeier, S., Schaefer, U., Cameron, MacPherson, R., Bajic, V. (2011). dPORE-miRNA: Polymorphic Regulation of MicroRNA Genes. *PLoS ONE* 6(2): e16657.
- Shaoa, C., Wang H., & Meng, Y. (2013). Global survey on sequence characteristics of plant microRNA genes: Cis-regulatory SNPs in promoters and microRNA precursors. *Plant Biosystems*. Volume 147, Issue 2, 2013.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 221–227.
- Shuai, P., Liang, D., Zhang, Z., Yin, W., & Xia, X. (2013). Identification of drought-responsive and novel *Populus trichocarpa* microRNAs by high-throughput sequencing and their targets using degradome analysis. *BMC Genomics*, 14(1), 233.
- Shui, X., Chen, Z., & Li, J. (2013). MicroRNA prediction and its function in regulating drought-related genes in cowpea. *Plant Science*, 210, 25–35.

- Smith, O., & Rappaport, L. (1961) Endogenous gibberellins in resting and sprouting potato tubers. *Adv Chem Ser* 28: 42–48
- Spanudakis, E., & Jackson, S. (2014). The role of microRNAs in the control of flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 365–380.
- Spooner, D. M., Núñez, J., Trujillo, G., Herrera, M. D. R., Guzmán, F., & Ghislain, M. (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19398–19403.
- Spooner, D., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., & Bryan, G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14694–9.
- Steyn, H., Schumann, P. & Van der Mescht, A. (1992). The effect of drought stress on protein synthesis of *Nicotiana tabacum*. *S.A. Soc. Crop. Prod.*
- Strand, L. 2006. Integrated Pest Management for Potatoes in the Western United States, 2nd Edition. University of California-Agriculture and Natural Resource Publication 3316.
- Sunkar, R., & Zhu, J. (2004). Novel and Stress-Regulated MicroRNAs and Other Small RNAs from *Arabidopsis*, 16, 2001–2019.
- Suttle, J. (1998) Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol* 118: 843–848
- Suttle, J. (2004). Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment. *Journal of Plant Physiology*, 161(2), 157–164.
- Szittyá, G., Moxon, S., Santos, D. M., Jing, R., Fevereiro, M. P. S., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008). High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC Genomics*, 9, 593.
- Tapia, M. E., & Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos. Fao; Anpe-Perú.*
- Thakur, V., Wanchana, S., Xu, M., Bruskiwich, R., Quick, W., Mosig, A., & Zhu, X. (2011). *Characterization of statistical features for plant microRNA prediction. BMC Genomics*, 12(1), 108.
- The Potato Genome Sequencing Consortium (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195.
- The Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641.
- Torres, Y., Lozano, R., Merino, C., & Orjeda, G. 2013, *Identificación de genes relacionados a sequía en papas nativas empleando RNA-Seq. Revista Peruana de Biología. Vol 20 (3).*
- Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereiro, M., & dos Santos, D. (2010). miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231(3), 705–716.

- Tuan, D., & Bonner, J. (1964). Dormancy associated with repression of genetic activity. *Plant Physiology*, 768–772.
- Unamba, C., Nag, A., & Sharma R. (2015). Next Generation Sequencing Technologies: The Doorway to the Unexplored Genomics of Non-Model Plants. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 6(1074).
- Van Ha C, Le, D., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Sulieman, S., Tran, U., Mochida, K., Van Dong, N., Yamaguchi-shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. (2013). The auxin response factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 20(5), 511–24.
- van Loon, C. (1981). The effect of water stress on potato growth, development, and yield. *American Journal of Potato Research*, 58(1), 51–69.
- Vasquez-Robinet, C., Mane, S., Ulanov, A., Watkinson, J., Stromberg, V., De Koeber, D., & Grene, R. (2008). Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2109–2123.
- Verelst, W., Skirycz, A., & Inzé, D. (2010). Abscisic acid, ethylene and gibberellic acid act at different developmental stages to instruct the adaptation of young leaves to stress. *Plant Signaling Behavior*, 5(4), 473–475.
- Viger, M. (2011). Physiology, genetics and genomics of drought adaptation in *Populus*. Doctoral Thesis, University of Southampton, Centre for Biological Sciences, Southampton, UK. 258 pp.
- Viola, R., Pelloux, J., van der Ploeg, A., Gillespie, T., Marquis, N., Roberts, A., & Hancock R. 2007. Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Plant Cell Environ.* 30, 973-983.
- Wang, D., Pan, Y., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., & Li, Z. (2011). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC Genomics*, 12(1), 149.
- Wang, M., Wang, Q., & Zhang, B. (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 26–32.
- Wang, M., Zhang, X., & Liu, J. H. (2015). Deep sequencing-based characterization of transcriptome of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) in response to cold stress. *BMC Genomics*, 16(1), 555.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57–63.
- Wen, M., Shen, Y., Shi, S., & Tang, T. (2012). miREvo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 140.
- Wery J., Silim, S., Knights, E., Malhotra, R., Cousin, R. 1994. Screening techniques and sources of tolerance to extremes of moisture and air temperature in cool season food legumes. *Euphytica* 73: 73-83

- Wightman B., Btirglin, T. R., Gatto, J., Arasu, P., & Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the h-74 3' - untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhab- ditis elagans development. *Genes. Dev.* 5, 1813-1824.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855–862.
- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J. A., & Weigel, D. (2010). On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development*, 137(21), 3633–3642.
- Xie, F., Frazier, T. P., & Zhang, B. (2011). Identification, characterization and expression analysis of MicroRNAs and their targets in the potato (*Solanum tuberosum*). *Gene*, 473(1), 8–22.
- Xu, G. Y., Rocha, P. S. C. F., Wang, M. L., Xu, M. L., Cui, Y. C., Li, L. Y., & Xia, X. (2011). A novel rice calmodulin-like gene, OsMSR2, enhances drought and salt tolerance and increases ABA sensitivity in Arabidopsis. *Planta*, 234(1), 47–59.
- Xu, K., Chen, S., Li, T., Ma, X., Liang, X., Ding, X., & Luo, L. (2015). OsGRAS23, a rice GRAS transcription factor gene, is involved in drought stress response through regulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biology*, 15, 141.
- Xue, G. P., McIntyre, C. L., Glassop, D., & Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 67(3), 197–214.
- Yamada, M., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Yoshida, Y. (2005). Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1975–1981.
- Yang, J., Zhang, N., Ma, C., Qu, Y., Si, H., & Wang, D. (2013). Prediction and verification of microRNAs related to proline accumulation under drought stress in potato. *Computational Biology and Chemistry*, 46, 48–54.
- Yang, X., & Li, L. (2011). miRDeep-P: A computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatics*, 27(18), 2614–2615.
- Yi, R., Zhu, Z., Hu, J., Qian, Q., Dai, J., & Ding, Y. (2013). Identification and Expression Analysis of microRNAs at the Grain Filling Stage in Rice (*Oryza sativa* L.) via Deep Sequencing. *PLoS ONE*, 8(3).
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2003). Plant Responses to Drought and Stress Tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol*, 187–206.
- Zhang, N., Liu, B., Ma, C., Zhang, G., Chang, J., Si, H., & Wang, D. (2014). Transcriptome characterization and sequencing-based identification of drought-responsive genes in potato. *Molecular Biology Reports*, 41(1), 505–517.

- Zhang, N., Yang, J., Wang, Z., Wen, Y., Wang, J., He, W., & Wang, D. (2014). Identification of novel and conserved microRNAs related to drought stress in potato by deep sequencing. *PloS One*, 9(4), e95489.
- Zhang, R., Marshall, D., Bryan, G. J., & Hornyik, C. (2013). Identification and characterization of miRNA transcriptome in potato by high-throughput sequencing. *PloS One*, 8(2), e57233.
- Zhang, W., Luo, Y., Gong, X., Zeng, W., & Li, S. (2009). Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. *Computational Biology and Chemistry*, 33(1), 84–93.
- Zhang, Y. (2005). miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W701–704.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., & Jin, Y. (2007). Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585–590.
- Zhao, H., Lou, Y., Sun, H., Li, L., Wang, L., Dong, L., & Gao, Z. (2016). Transcriptome and comparative gene expression analysis of *Phyllostachys edulis* in response to high light. *BMC Plant Biology*, 16(1), 34.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4157–4168.
- Zilberman, D. (2003). ARGONAUTE4 Control of Locus-Specific siRNA Accumulation and DNA and Histone Methylation. *Science*, 299(5607), 716–719.

VII. ANEXOS

1. Protocolo de extracción de ARN

Protocolo empleando TriReagent de Sigma. Hacer todos los pasos en hielo y usar centrífuga a 4°C. Además, se necesita: cloroformo, isopropanol, alcohol 75% y agua miliQ autoclavada (o Nuclease-Free). Emplear tips y tubos autoclavados. Poner a enfriar en nitrógeno líquido los tubos para colectar las muestras pulverizadas.

Homogenizado:

- Pulverizar las muestras en nitrógeno líquido
- Inmediatamente homogenizar el pulverizado con TriReagent
- (1mL por 50 - 100mg)
- Poner en hielo.

Fase de separación:

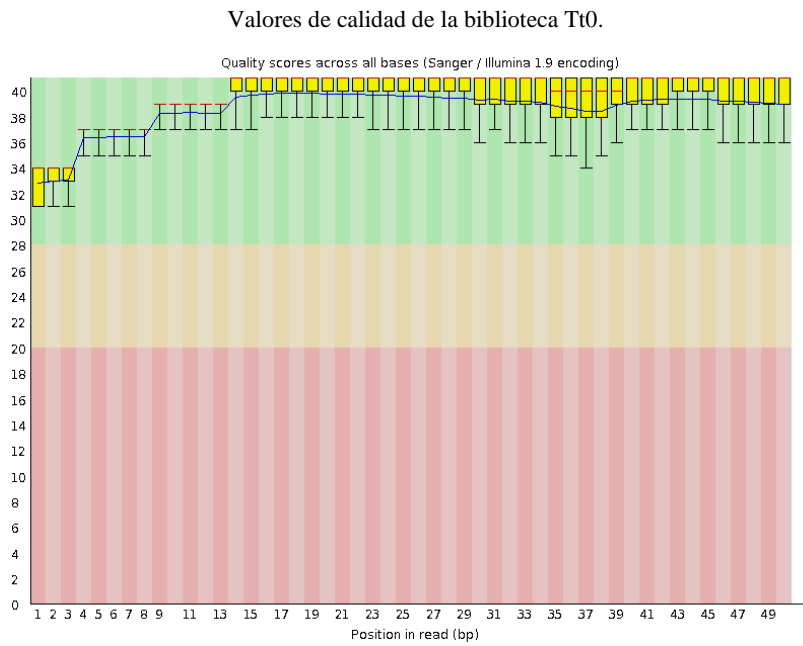
- Agregar 200uL de cloroformo por cada mL de TriReagent empleado.
- Incubar 5-10 minutos en hielo.
- Centrifugar: 12 000g por 15min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa en un tubo nuevo.

Precipitación:

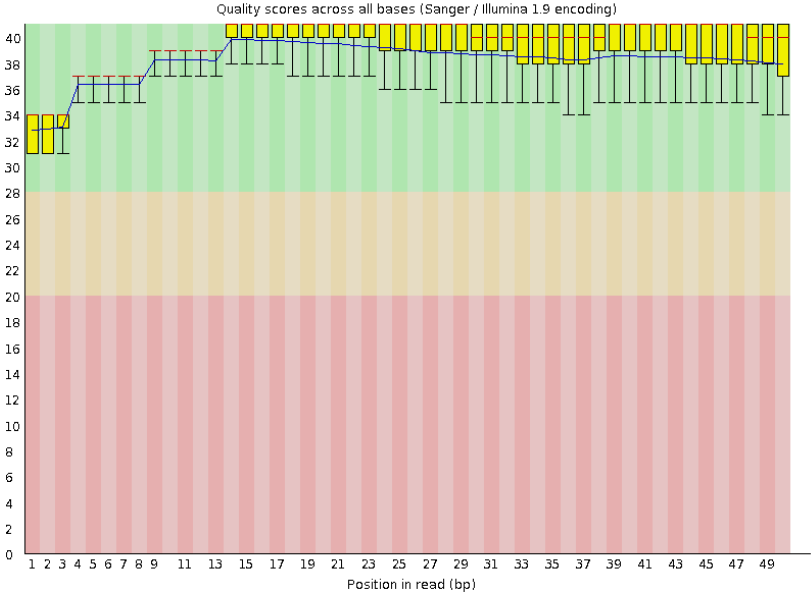
- Agregar 500uL de isopropanol (o un volumen igual al trasferido)
- Dejar 1hora a -20°C o dejarlo overnight.
- Centrifugar: 12000g por 10 minutos a 4°C.
- Remover el sobrenadante, descartarlo.
- Agregar 1mL de etanol 75%
- Lavar el pellet.
- Centrifugar 7500g por 5minutos a 4°C.
- Secar el pellet por 10 minutos.
- Agregar agua miliQ autoclavada.
- Guardar a -20°C

2. Distribución de los valores de calidad de las lecturas obtenidas en el secuenciamiento.

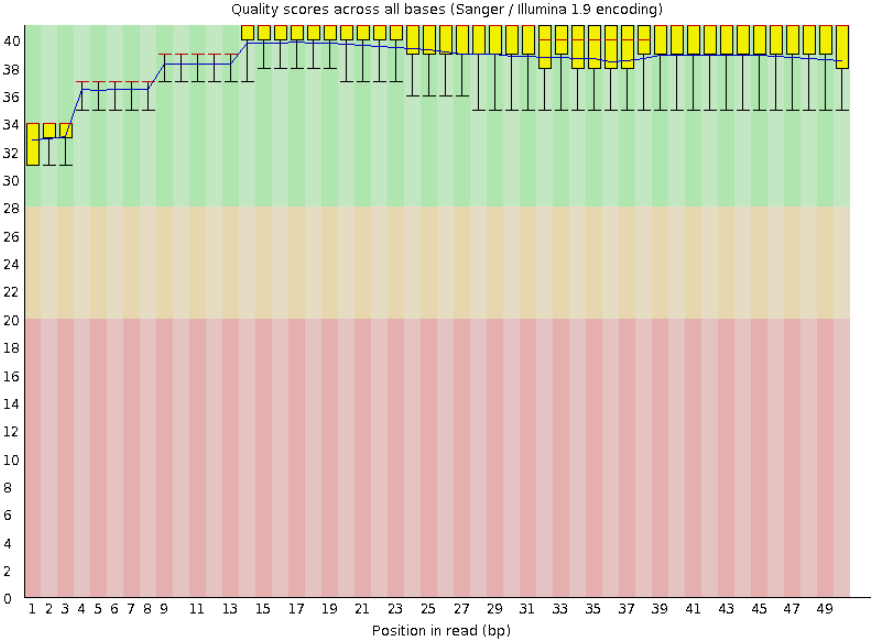
El eje horizontal muestra la posición dentro de la secuencia (número de base) y el eje vertical, el score de calidad. Se observa que todas las bibliotecas tienen un score de alta calidad (región verde).



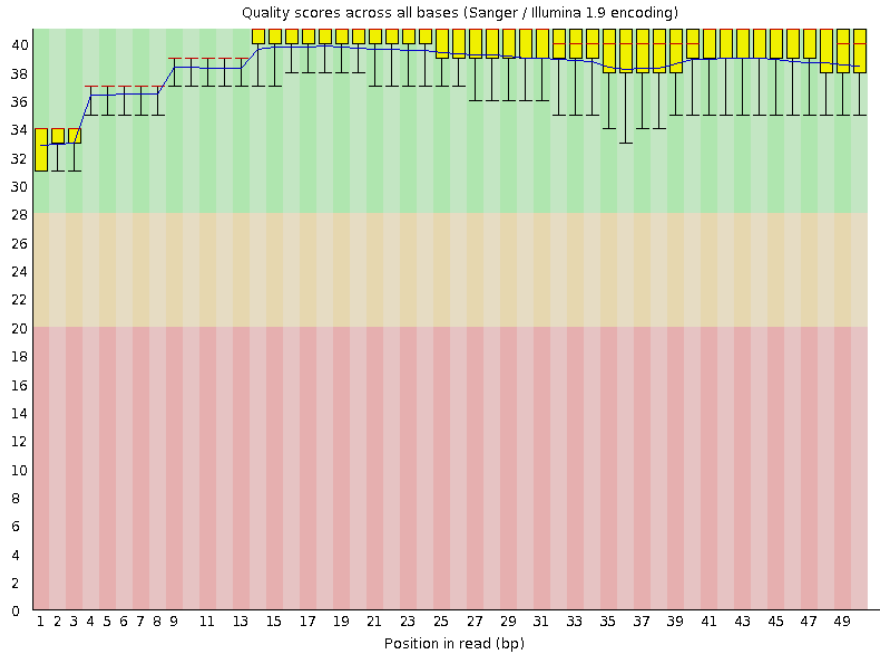
Valores de calidad de la biblioteca Tt1.



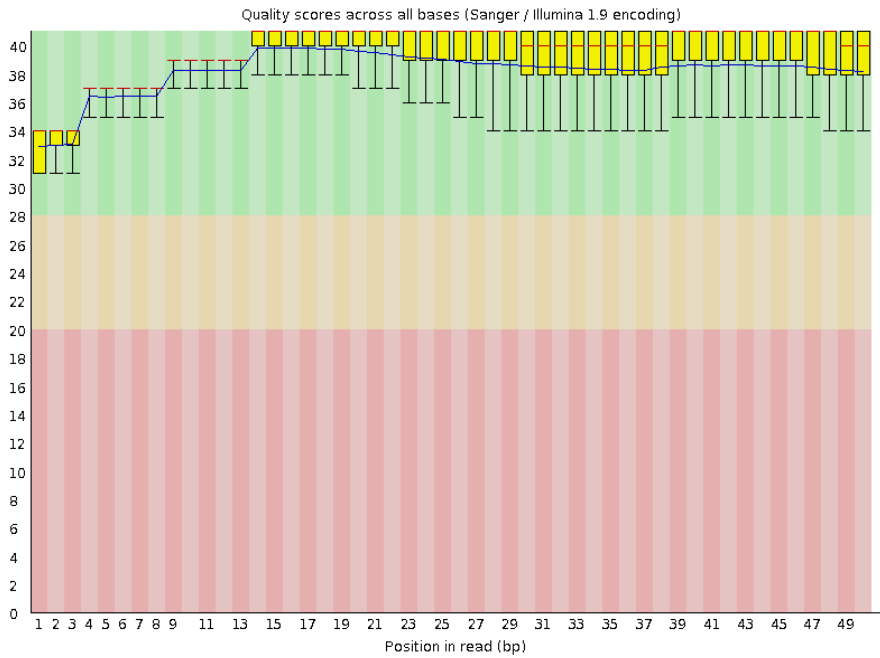
Valores de calidad de la biblioteca Tt2.



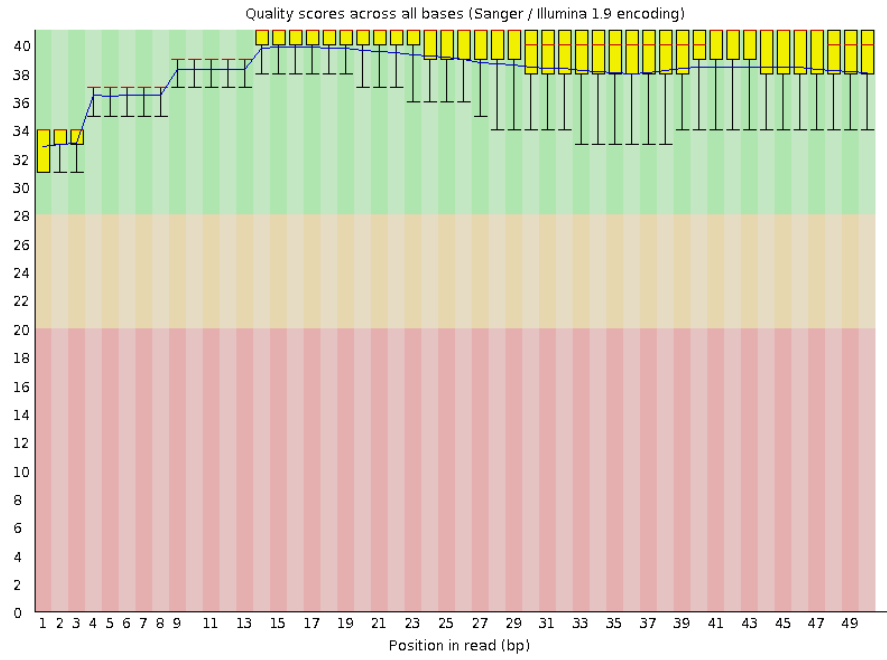
Valores de calidad de la biblioteca Tt3.



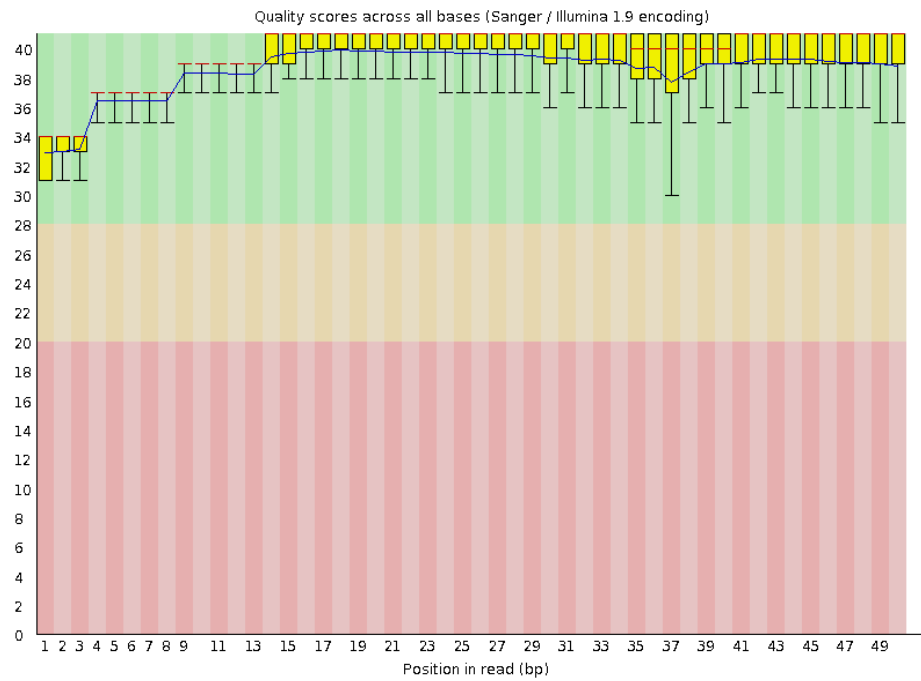
Valores de calidad de la biblioteca St0.



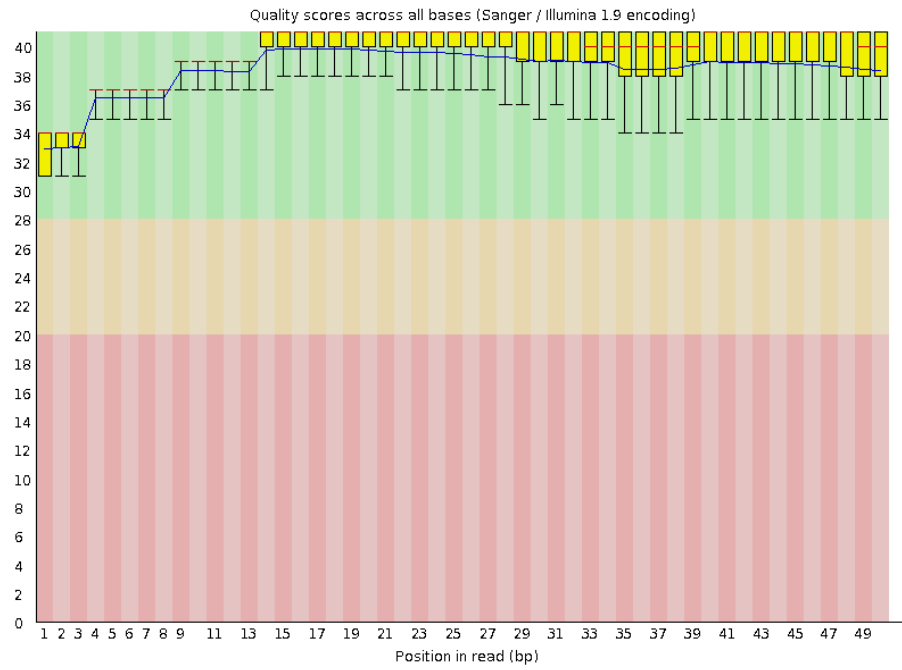
Valores de calidad de la biblioteca St1.



Valores de calidad de la biblioteca St2.



Valores de calidad de la biblioteca St3.



3. miRNA conservados, identificados en las variedades de *Solanum tuberosum* subsp *andigena*.

Se muestra los miRNAs identificados en las 8 bibliotecas secuenciadas, junto con su posicionamiento en el genoma.

miRNA identificado	Secuencia	Posición en el genoma	
		Posición del miRNA maduro	Posición del pre-miRNA
stu-miR156d-3p	TGATGACAGAAGCATAGAGAGC	ST4.03ch06:50754636-50754657	ST4.03ch06:50754636-50754728
stu-miR156d-5p	GTGCTCTCTATCTTCTGTCAA	ST4.03ch06:50754708-50754728	ST4.03ch06:50754636-50754728
stu-miR156f-3p	CTCACTTCTCTTTCTGTCAATC	ST4.03ch12:2221846-2221867	ST4.03ch12:2221755-2221867
stu-miR156f-5p	CTGACAGAAGAGAGTGAGCA	ST4.03ch12:2221755-2221774	ST4.03ch12:2221755-2221867
stu-miR156g-3p	GGTGACAGATAGAGAGTAAGC	ST4.03ch08:35111989-35112009	ST4.03ch08:35111989-35112075
stu-miR156k-5p	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	ST4.03ch08:35213825-35213844	ST4.03ch08:35213825-35213912
stu-miR160a-3p	TATGCTTGGCTCCTCATAACGC	ST4.03ch05:51565204-51565224	ST4.03ch05:51565204-51565288
stu-miR160b	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	ST4.03ch02:14558239-14558259	ST4.03ch02:14558239-14558320
stu-miR162b-3p	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	ST4.03ch06:51060101-51060121	ST4.03ch06:51060030-51060121
stu-miR162b-5p	GGAGGCAGCGGTTTCATCGATC	ST4.03ch06:51060030-51060050	ST4.03ch06:51060030-51060121
stu-miR164-3p	GCTGGAGAGCTAGAGCACATG	ST4.03ch06:48394846-48394866	ST4.03ch06:48394846-48394922
stu-miR164-5p	AGCATGTGCCCTGCTTCTCCA	ST4.03ch06:48394902-48394922	ST4.03ch06:48394846-48394922
stu-miR166a-5p	GGAATGTTGTCTGGCTCGAGG	ST4.03ch01:73926875-73926895	ST4.03ch01:73926875-73926981
stu-miR166b	TCGGACCAGGCTTCATTCCCTC	ST4.03ch06:39908066-39908086	ST4.03ch06:39907996-39908086
stu-miR166d-3p	TCGGACCAGGCTTCATTCCCC	ST4.03ch06:1291397-1291417	ST4.03ch06:1291341-1291417
stu-miR166d-5p	AGAATGTCGTCTGGTTCGAGA	ST4.03ch06:1291341-1291361	ST4.03ch06:1291341-1291417
stu-miR167a-3p	GGTGAGGCTGCCACATGATC	ST4.03ch06:58906320-58906339	ST4.03ch06:58906320-58906401
stu-miR167b-3p	GATCATGTGGCAGCATCACC	ST4.03ch09:48580530-48580549	ST4.03ch09:48580476-48580549
stu-miR167c-3p	GGTCATGCTCGGACAGCCTCACT	ST4.03ch09:48570973-48570995	ST4.03ch09:48570907-48570995
stu-miR167d-3p	GATCATGTGGTTGCTTCACC	ST4.03ch09:54561787-54561806	ST4.03ch09:54561732-54561806
stu-miR167d-5p	TGAAGCTGCCAGCATGATCTA	ST4.03ch09:54561732-54561752	ST4.03ch09:54561732-54561806
stu-miR169d-3p	GCAGGTCATCTTTAGCTAACT	ST4.03ch07:3407528-3407548	ST4.03ch07:3407458-3407548

stu-miR169h	TAGCCAAGGATGACTTGCCCT	ST4.03ch08:43873228-43873247	ST4.03ch08:43873228-43873308
stu-miR171b-3p	TTGAGCCGCGTCAATATCTCT	ST4.03ch07:46855805-46855825	ST4.03ch07:46855742-46855825
stu-miR171b-5p	AGATATTGATGTGGCTCAATC	ST4.03ch07:46855742-46855762	ST4.03ch07:46855742-46855825
stu-miR171c-3p	GATATTGACACGGCTCAATCA	ST4.03ch02:19595519-19595539	ST4.03ch02:19595519-19595577
stu-miR171c-5p	TCTGAGTGAACCAGGCCAATA	ST4.03ch02:19595557-19595577	ST4.03ch02:19595519-19595577
stu-miR171d-3p	CGTGATATTGGCACGGCTCAA	ST4.03ch02:36391625-36391645	ST4.03ch02:36391625-36391706
stu-miR171d-5p	AATTGAACCGCACCAATATCT	ST4.03ch02:36391686-36391706	ST4.03ch02:36391625-36391706
stu-miR171e	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	ST4.03ch06:50643819-50643839	ST4.03ch06:50643762-50643839
stu-miR172a-5p	GTAGCATAATCAAGATTCACA	ST4.03ch06:55560144-55560164	ST4.03ch06:55560144-55560247
stu-miR172b-5p	GCAGCACCATCAAGATTCACA	ST4.03ch05:51290090-51290110	ST4.03ch05:51290090-51290180
stu-miR172d-3p	GGAATCTTGATGATGCTGCAG	ST4.03ch05:48318296-48318316	ST4.03ch05:48318225-48318316
stu-miR172d-5p	GGAGCATCATCAAGATTCACA	ST4.03ch05:48318225-48318245	ST4.03ch05:48318225-48318316
stu-miR172e-3p	ATGCAGCATCATCAAGATTCT	ST4.03ch11:3604339-3604359	ST4.03ch11:3604339-3604462
stu-miR172e-5p	TGTGAATCTTGATGATGTTGC	ST4.03ch11:3604442-3604462	ST4.03ch11:3604339-3604462
stu-miR1886f	GCTGATTCATCTCACGATACCAT	ST4.03ch08:11862719-11862742	ST4.03ch08:11862673-11862742
stu-miR1886g-5p	ATGTCCAAACATTGATCTCATCTC	ST4.03ch08:49199614-49199637	ST4.03ch08:49199588-49199637
stu-miR1886h	ATTTTACGTTGATTCATCTCATG	ST4.03ch07:40313354-40313377	ST4.03ch07:40313326-40313377
stu-miR1886i-3p	TTTACGTTGATTCATCTCATGA	ST4.03ch06:54786658-54786680	ST4.03ch06:54786627-54786680
stu-miR1886i-5p	ATGAGATGAAATTAGCGTTTGGAT	ST4.03ch06:54786627-54786650	ST4.03ch06:54786627-54786680
stu-miR1919-3p	ACGAGAGTCATCTGTGACAGG	ST4.03ch08:41545354-41545374	ST4.03ch08:41545279-41545374
stu-miR1919-5p	TGTCGCAGATGACTTTCGCC	ST4.03ch08:41545279-41545299	ST4.03ch08:41545279-41545374
stu-miR319-3p	TTGGACTGAAGGGTTCCTTC	ST4.03ch03:58600857-58600877	ST4.03ch03:58600701-58600877
stu-miR319a-3p	AGGGAGCTCCCTTCAGTCCAA	ST4.03ch08:55496027-55496047	ST4.03ch08:55496027-55496198
stu-miR319a-5p	GTGTGGACCGAAGAAAGCTCT	ST4.03ch08:55496178-55496198	ST4.03ch08:55496027-55496198
stu-miR319b	AGGAGCTCCCTTCAGTCCAA	ST4.03ch03:59024278-59024297	ST4.03ch03:59024278-59024450
stu-miR3627-3p	TGTCGAAAGACAGAGGCACTT	ST4.03ch02:46514315-46514335	ST4.03ch02:46514315-46514397
stu-miR384-5p	TTGGCATTCTGTCCACCTCC	ST4.03ch01:80989766-80989785	ST4.03ch01:80989766-80989825
stu-miR390-3p	TAAAACTCAAGATGGATAGCG	ST4.03ch10:49609599-49609619	ST4.03ch10:49609599-49609668
stu-miR390-5p	GGTGCTATCCCTCCTGAGCTT	ST4.03ch10:49609648-49609668	ST4.03ch10:49609599-49609668
stu-miR393-3p	ATTCCGAAGAGATCGCATGAT	ST4.03ch03:43098106-43098126	ST4.03ch03:43098106-43098181
stu-miR393-5p	GGATCAATGCGATCCCTTTGGA	ST4.03ch03:43098160-43098181	ST4.03ch03:43098106-43098181

stu-miR395j	GAGTTCCCCCAAACACTTCAG	ST4.03ch00:32760319-32760339	ST4.03ch00:32760319-32760390
stu-miR396-3p	TTTCCCACAGCTTTCTTGGAC	ST4.03ch07:4137128-4137148	ST4.03ch07:4137128-4137232
stu-miR396-5p	AAGTTCAAGAAAGCTGTGGAA	ST4.03ch07:4137212-4137232	ST4.03ch07:4137128-4137232
stu-miR397-3p	TGATTGAGTGTAGCGTTGATG	ST4.03ch07:53759740-53759760	ST4.03ch07:53759740-53759820
stu-miR397-5p	GTCATCAACGCTGCACTCAAT	ST4.03ch07:53759800-53759820	ST4.03ch07:53759740-53759820
stu-miR398a-3p	CAGGGGCGACCTGAGAACATA	ST4.03ch11:35985502-35985522	ST4.03ch11:35985502-35985592
stu-miR398a-5p	CATATGTTCTCAAATCAACCC	ST4.03ch11:35985572-35985592	ST4.03ch11:35985502-35985592
stu-miR398b-3p	AGGGGTGACCTGAGAACACAA	ST4.03ch03:38471814-38471834	ST4.03ch03:38471814-38471894
stu-miR398b-5p	ACCTGTGTTCTAAGGCACACTC	ST4.03ch03:38471873-38471894	ST4.03ch03:38471814-38471894
stu-miR399f-3p	TGCCAAAGGAGAGCTGCCCTG	ST4.03ch03:41922140-41922160	ST4.03ch03:41922097-41922160
stu-miR399g-3p	CGCCAAAGGGGAGCTGCCCTA	ST4.03ch03:41958387-41958407	ST4.03ch03:41958340-41958407
stu-miR399i-3p	TAGGGCAACTCTCCTTTGGCA	ST4.03ch03:41788772-41788792	ST4.03ch03:41788772-41788865
stu-miR399i-5p	CATGCCAATAGAGTGTAGCCC	ST4.03ch03:41788845-41788865	ST4.03ch03:41788772-41788865
stu-miR399o-3p	CGCCAAAGGAGAGCTGCCCTG	ST4.03ch03:41915509-41915529	ST4.03ch03:41915466-41915529
stu-miR399o-5p	GGGCTACTCTCTATTGGCATG	ST4.03ch03:41915466-41915486	ST4.03ch03:41915466-41915529
stu-miR408a-3p	AACCAGGGAAGAGGCTGTGCA	ST4.03ch01:78858641-78858661	ST4.03ch01:78858641-78858713
stu-miR408b-3p	AGCCAGGGAAGAGGCAGTGCA	ST4.03ch01:78900481-78900501	ST4.03ch01:78900481-78900551
stu-miR4376-3p	GCATCATACTCCTGCATATT	ST4.03ch06:8905948-8905967	ST4.03ch06:8905880-8905967
stu-miR4376-5p	TACGCAGGAGAGATGATGCTG	ST4.03ch06:8905880-8905900	ST4.03ch06:8905880-8905967
stu-miR477a-3p	GAAGCTCTAGCAGGGAGAGCCA	ST4.03ch01:73256232-73256253	ST4.03ch01:73256186-73256253
stu-miR477a-5p	CCTCTCCCTCAAGGGCTTCTC	ST4.03ch01:73256186-73256206	ST4.03ch01:73256186-73256253
stu-miR477b-3p	GAGGTCTTTGAGTGAGAGTGA	ST4.03ch01:73256366-73256387	ST4.03ch01:73256317-73256387
stu-miR477b-5p	ACTCTCCCTCAAAGGCTTCTG	ST4.03ch01:73256317-73256337	ST4.03ch01:73256317-73256387
stu-miR479	GAGTGATATTGGTTTCGGCTCA	ST4.03ch03:45870413-45870433	ST4.03ch03:45870413-45870483
stu-miR482a-3p	TTTCCAATTCCACCCATTCTTA	ST4.03ch03:54955094-54955115	ST4.03ch03:54955032-54955135
stu-miR482a-5p	GGAATTGGTGGATTGGAAAGC	ST4.03ch03:54955052-54955072	ST4.03ch03:54955032-54955135
stu-miR482b-3p	TTGGAATGGGGGGAATCGGTAA	ST4.03ch06:41031957-41031978	ST4.03ch06:41031937-41032058
stu-miR482b-5p	TCTTACCATGCCACCCACTCC	ST4.03ch06:41032018-41032038	ST4.03ch06:41031937-41032058
stu-miR482c	TTGGCATGGGTGGAATAGGAAA	ST4.03ch06:41024905-41024926	ST4.03ch06:41024885-41025019
stu-miR482d-3p	GGCATGGGCGGTGTAGGCAAGA	ST4.03ch06:41025251-41025272	ST4.03ch06:41025231-41025340
stu-miR482d-5p	TATCTTACCCCACTCAGC	ST4.03ch06:41025300-41025320	ST4.03ch06:41025231-41025340

stu-miR482e-3p	GGAATGGGCGGTATTGGCAAGA	ST4.03ch06:41036469-41036490	ST4.03ch06:41036449-41036559
stu-miR482e-5p	AATCTTACCACACCACCCACT	ST4.03ch06:41036519-41036539	ST4.03ch06:41036449-41036559
stu-miR530	AGGTGCAGGTGCAAATGCAGA	ST4.03ch09:5149946-5149966	ST4.03ch09:5149886-5149966
stu-miR5303d	GGGTGCGTGTCTGGATTCTCCAAAA	ST4.03ch01:6591129-6591152	ST4.03ch01:6591129-6591183
stu-miR5303e	TTTTGGAGAATCTGACACGGGTGT	ST4.03ch07:40262967-40262990	ST4.03ch07:40262936-40262990
stu-miR5303f	ATTTTTGGAGAATCTGACACGGGT	ST4.03ch06:50705379-50705402	ST4.03ch06:50705353-50705402
stu-miR5303h	AACATTTTTGAAGAGTCTGAGCAA	ST4.03ch07:3982448-3982471	ST4.03ch07:3982363-3982471
stu-miR5303i	GTTGCTCAGACTCTTCAAAAATAT	ST4.03ch04:2186715-2186738	ST4.03ch04:2186715-2186822
stu-miR5303j	TTGCTCAGACTCTTCAAAAATATT	ST4.03ch05:51176435-51176458	ST4.03ch05:51176435-51176542
stu-miR5304-3p	AGATGAGTATGGTGCATTGGA	ST4.03ch01:86913749-86913769	ST4.03ch01:86913690-86913769
stu-miR5304-5p	CAATGCAACATACTCATCACC	ST4.03ch01:86913690-86913710	ST4.03ch01:86913690-86913769
stu-miR6022	TCCTGGATATTCTCCCTTCCA	ST4.03ch11:2838796-2838816	ST4.03ch11:2838776-2839012
stu-miR6023	ATCCAAAAACACTTTCATGGAA	ST4.03ch12:60007816-60007837	ST4.03ch12:60007622-60007857
stu-miR6024-3p	GGGAAAACAACCTCTTGCTAAAA	ST4.03ch01:68172941-68172962	ST4.03ch01:68172921-68173038
stu-miR6024-5p	TCTTTTAGCAAGTGTTGTTTCT	ST4.03ch01:68172997-68173018	ST4.03ch01:68172921-68173038
stu-miR6025	GATGTTATCTCAATTGTTGGTA	ST4.03ch04:274802-274823	ST4.03ch04:274683-274843
stu-miR6026-3p	TTCTTGGCTAGAGTTGTATTGC	ST4.03ch01:1695005-1695026	ST4.03ch01:1694805-1695046
stu-miR6026-5p	AATACAACCTATTGCCAAGACAA	ST4.03ch01:1694823-1694844	ST4.03ch01:1694805-1695046
stu-miR6027	TTATGGATAGCCGAAGGATTCA	ST4.03ch10:56122278-56122299	ST4.03ch10:56122258-56122422
stu-miR6149-3p	GTTTGCATACAAACCTGAATCA	ST4.03ch11:2019459-2019480	ST4.03ch11:2019459-2019525
stu-miR6149-5p	GACGATTCAGGTGTGTTGCAA	ST4.03ch11:2019505-2019525	ST4.03ch11:2019459-2019525
stu-miR7122-5p	TTATACAGAGAAACCGCTGTCG	ST4.03ch11:13569053-13569074	ST4.03ch11:13569053-13569129
stu-miR7979	AGGTACATGAACTCTAACGAGGCA	ST4.03ch09:60790866-60790889	ST4.03ch09:60790866-60790963
stu-miR7980a	ATGAGATGAAGTCAATGTTTGGAC	ST4.03ch09:60813109-60813132	ST4.03ch09:60813075-60813132
stu-miR7980b-3p	ATGTCCAAACACTGATTCCATCTC	ST4.03ch03:12234668-12234691	ST4.03ch03:12234668-12234787
stu-miR7980b-5p	ATGAGATGGAATCAGTGTGGAC	ST4.03ch03:12234764-12234787	ST4.03ch03:12234668-12234787
stu-miR7981-3p	ATAGGACTTTAGTTTAGTTAAGGT	ST4.03ch08:47857917-47857940	ST4.03ch08:47857733-47857940
stu-miR7981-5p	GTTAATTAACCTATGGTCCTATTA	ST4.03ch08:47857733-47857756	ST4.03ch08:47857733-47857940
stu-miR7982b	AAGTTGGATGATAATAATATATAT	ST4.03ch07:33310974-33310997	ST4.03ch07:33310910-33310997
stu-miR7984b-5p	AAGGTCATTTCCAAAGTTTCGGTAT	ST4.03ch02:19612427-19612450	ST4.03ch02:19612256-19612450
stu-miR7984c-3p	TTACGATACCAAACCTTTATGAAGG	ST4.03ch01:6436029-6436052	ST4.03ch01:6436029-6436232

stu-miR7984c-5p	GTCCTTCATAAAGTTTGGTATCGT	ST4.03ch01:6436209-6436232	ST4.03ch01:6436029-6436232
stu-miR7984d-3p	CAATTTTCGGTCAAAGTTTCGGATAT	ST4.03ch06:18268453-18268476	ST4.03ch06:18268259-18268476
stu-miR7984d-5p	ATCCGAACCTTTGACCGAAATTGCT	ST4.03ch06:18268259-18268282	ST4.03ch06:18268259-18268476
stu-miR7985	GGTAACCCGTTCTAGGCAAGCCCCG	ST4.03ch09:1606833-1606856	ST4.03ch09:1606833-1606884
stu-miR7986	AGTTTAAAACGTTACTGTCTGGTAA	ST4.03ch09:31541236-31541259	ST4.03ch09:31541173-31541259
stu-miR7987	GTCATCAATAAGATCAACTAGTGT	ST4.03ch07:20618051-20618074	ST4.03ch07:20618018-20618074
stu-miR7988	GGGTATTTTTGGCCCTTTCCGTT	ST4.03ch03:57497664-57497687	ST4.03ch03:57497624-57497687
stu-miR7989	ACAAATAAGTCCATTACCTGAACC	ST4.03ch03:57850943-57850966	ST4.03ch03:57850835-57850966
stu-miR7990a	AGGCCAAAGTTACGATCATTGAA	ST4.03ch02:48581245-48581268	ST4.03ch02:48581245-48581345
stu-miR7990b	GAATTTTCAAATGATCGTAACTTT	ST4.03ch12:26094-26117	ST4.03ch12:26038-26117
stu-miR7991c	ATTCATTA AAAATTCCGACCTCCT	ST4.03ch01:43475978-43476001	ST4.03ch01:43475955-43476001
stu-miR7992-3p	ACTTTGAAATGCACATCTAGACA	ST4.03ch03:18035775-18035797	ST4.03ch03:18035775-18035914
stu-miR7992-5p	AGTGTCTAGATGTGCATTGTCAA	ST4.03ch03:18035891-18035914	ST4.03ch03:18035775-18035914
stu-miR7993b-5p	TTAAGTTAACACATAAAAATATGT	ST4.03ch08:52229446-52229469	ST4.03ch08:52229446-52229579
stu-miR7993d	ATATTTTATGTGGTTAACTTAACT	ST4.03ch07:36248776-36248799	ST4.03ch07:36248658-36248799
stu-miR7994b-3p	ATATTATACTTGGGCATAAACTCC	ST4.03ch01:70132601-70132624	ST4.03ch01:70132480-70132624
stu-miR7994b-5p	AGTTTATGCCCAAGTATATAATATAT	ST4.03ch01:70132480-70132505	ST4.03ch01:70132480-70132624
stu-miR7995	AATGGTCAACTTGTCTACGTGTAA	ST4.03ch05:44419498-44419521	ST4.03ch05:44419383-44419521
stu-miR7996c	ATGTGGTACATATGAAATTTGAAA	ST4.03ch01:85888905-85888928	ST4.03ch01:85888905-85889094
stu-miR7997b	ATGCTGCTCGGACTCTTCAA	ST4.03ch10:26344294-26344314	ST4.03ch10:26344294-26344411
stu-miR7997c	ATTTTTGAAGAGTCCGAGCAATAT	ST4.03ch05:51803695-51803718	ST4.03ch05:51803599-51803718
stu-miR7998	ACGGACCGTAGATCAATCCACAGT	ST4.03ch04:42806450-42806473	ST4.03ch04:42806350-42806473
stu-miR7999-3p	GTCGTGGGCAGTTCTACGGGTCGT	ST4.03ch12:49006207-49006230	ST4.03ch12:49006207-49006256
stu-miR7999-5p	GAAGGACCCGTAGAAGTGACCCAG	ST4.03ch12:49006233-49006256	ST4.03ch12:49006207-49006256
stu-miR8000	TCTTCGGTGTGAGTTCTTCGGTGT	ST4.03ch12:50152645-50152668	ST4.03ch12:50152612-50152668
stu-miR8001a	GAATTTTCATACTAATCCCCAGGA	ST4.03ch07:20822877-20822900	ST4.03ch07:20822830-20822900
stu-miR8001b-3p	GGATTTTCATACTAATCCTAGAA	ST4.03ch02:41316927-41316950	ST4.03ch02:41316884-41316950
stu-miR8001b-5p	ATGGGGATTAGTATGAAAATTTGC	ST4.03ch02:41316884-41316907	ST4.03ch02:41316884-41316950
stu-miR8003	ATTTCCGTATACAAATGGGATGAC	ST4.03ch04:45148844-45148867	ST4.03ch04:45148844-45148905
stu-miR8004	AGGCCAAACACATACACAACCCT	ST4.03ch02:35844751-35844774	ST4.03ch02:35844712-35844774
stu-miR8005c	TTAGAGTTTAAAGTTT TAGAGTTT	ST4.03ch00:11644544-11644567	ST4.03ch00:11644370-11644567

stu-miR8006-3p	TCTATTTTTTGGACGGCAGGGCA	ST4.03ch06:39496401-39496423	ST4.03ch06:39496401-39496615
stu-miR8006-5p	GGTGCCCCTGTCGTCCAAAACTA	ST4.03ch06:39496592-39496615	ST4.03ch06:39496401-39496615
stu-miR8007a-3p	CGAAAAATGAAAAGTGCCACATAA	ST4.03ch07:16672200-16672223	ST4.03ch07:16671998-16672223
stu-miR8007a-5p	ATGTGGCACTTTTCGGATTTTGAG	ST4.03ch07:16671998-16672021	ST4.03ch07:16671998-16672223
stu-miR8007b-3p	CGAAAAATGAAAAGTACCACATAA	ST4.03ch03:403767-403790	ST4.03ch03:403573-403790
stu-miR8007b-5p	ATGTGACACTTTTTGAATTTTCGAG	ST4.03ch03:403573-403596	ST4.03ch03:403573-403790
stu-miR8008b	AAACCCAGAAAAGCGACGGACAGT	ST4.03ch02:10142034-10142057	ST4.03ch02:10142034-10142088
stu-miR8009	ATTTCCAGAAAAGCGACGGACAGT	ST4.03ch09:41331794-41331817	ST4.03ch09:41331762-41331817
stu-miR8010	ATAGGACCCTAGTTAAATTTAGGT	ST4.03ch09:42668070-42668093	ST4.03ch09:42667890-42668093
stu-miR8011a-3p	AATAAAAAGAAGCCTCACACAACT	ST4.03ch01:1692521-1692544	ST4.03ch01:1692448-1692544
stu-miR8011a-5p	TTGTGTGAGGTTTCTTTTTGTTTC	ST4.03ch01:1692448-1692471	ST4.03ch01:1692448-1692544
stu-miR8011b-3p	TTCGTGAGACAAAAGAAGCCT	ST4.03ch03:38286776-38286797	ST4.03ch03:38286719-38286797
stu-miR8012	ATGACTTTAAGTCGCGTCTGGCCC	ST4.03ch01:2199957-2199980	ST4.03ch01:2199957-2200069
stu-miR8013	AGAAGAAAATCGCTCCGTCAGAAG	ST4.03ch01:68146159-68146182	ST4.03ch01:68146159-68146232
stu-miR8014-3p	ATGAATACAATGTTTGGATAAATT	ST4.03ch10:12651065-12651088	ST4.03ch10:12651017-12651088
stu-miR8015-3p	GTTTCATTTTCAAGGTCCAATAGC	ST4.03ch06:50001227-50001250	ST4.03ch06:50001178-50001250
stu-miR8016	ATTTTTGAATGGAAGGCCCATGTG	ST4.03ch09:31202259-31202282	ST4.03ch09:31202213-31202282
stu-miR8017	ATCCAAGTGAAGTGTATCGTCTCA	ST4.03ch04:66772054-66772077	ST4.03ch04:66772015-66772077
stu-miR8018	ACGAACCGTAGATCCCATCCGTGG	ST4.03ch02:19189470-19189493	ST4.03ch02:19189439-19189493
stu-miR8019-3p	AAAAGAATGACCTGGTTTACTTG	ST4.03ch05:6207562-6207585	ST4.03ch05:6207498-6207585
stu-miR8020	AATTTTCATTGAGTATGTTGTTGTT	ST4.03ch09:51961147-51961170	ST4.03ch09:51961147-51961233
stu-miR8021	AGGTCTCGAGTTTGAGCCTTGAAT	ST4.03ch01:51401832-51401855	ST4.03ch01:51401637-51401855
stu-miR8022	TTTAAATGAGAATTTTGGACTATT	ST4.03ch04:35311771-35311794	ST4.03ch04:35311771-35311846
stu-miR8023	GGTTGCCAATGAAATTGTGCCAAA	ST4.03ch06:38239922-38239945	ST4.03ch06:38239922-38240053
stu-miR8024b	TTGGAGGATTTGAAGATTTCAACT	ST4.03ch09:42991200-42991223	ST4.03ch09:42991138-42991223
stu-miR8025-3p	TTTAATTGCATGCCAAGTGTGTGG	ST4.03ch12:53111204-53111227	ST4.03ch12:53111090-53111227
stu-miR8025-5p	ACATACTCGACATGCAATTAATT	ST4.03ch12:53111090-53111113	ST4.03ch12:53111090-53111227
stu-miR8026	AGGGTTACCACATATTCTCTACAT	ST4.03ch11:32774887-32774910	ST4.03ch11:32774833-32774910
stu-miR8027	ATCTCGAGATAAGTTATTCTGGAC	ST4.03ch02:25351421-25351444	ST4.03ch02:25351394-25351444
stu-miR8028-3p	CATCCTTATACTATAATTATGAAC	ST4.03ch12:27349881-27349904	ST4.03ch12:27349881-27350023
stu-miR8028-5p	TTGTTACAATTGTAGCATAAGGA	ST4.03ch12:27350000-27350023	ST4.03ch12:27349881-27350023

stu-miR8029	AGCCATTTTTCTTTGTTTTGGAGC	ST4.03ch11:44337295-44337318	ST4.03ch11:44337214-44337318
stu-miR8030-3p	ATTTGGGTTGATTTGGTTTTAA	ST4.03ch07:43342172-43342193	ST4.03ch07:43342172-43342228
stu-miR8030-5p	AACCCGAGACCAAACCAACCCAA	ST4.03ch07:43342206-43342228	ST4.03ch07:43342172-43342228
stu-miR8031	TTAGACACCTCAACTAAGACTTG	ST4.03ch08:40027223-40027245	ST4.03ch08:40027223-40027280
stu-miR8032e-3p	AGTGTGAGTCGGTGTGATTAGG	ST4.03ch10:9584266-9584287	ST4.03ch10:9584240-9584287
stu-miR8032g-3p	CCTAATCGCACCGACTCACACT	ST4.03ch12:20948236-20948257	ST4.03ch12:20948236-20948283
stu-miR8032g-5p	ACCTCGGGAGTCATGCCGACCA	ST4.03ch12:20948262-20948283	ST4.03ch12:20948236-20948283
stu-miR8033-3p	TCAATTCTGCAGCTTTAGGAGT	ST4.03ch01:78279618-78279639	ST4.03ch01:78279570-78279639
stu-miR8033-5p	TTCCAAAGCTGCAGAAATGAGT	ST4.03ch01:78279570-78279591	ST4.03ch01:78279570-78279639
stu-miR8035	AGAAAGTGATATTGAAGATGGA	ST4.03ch05:7011559-7011580	ST4.03ch05:7011559-7011668
stu-miR8036-3p	TATGTCCTTCCGATGCCTCCCA	ST4.03ch04:58545544-58545565	ST4.03ch04:58545474-58545565
stu-miR8036-5p	GGAGGAATCGAAAGATATAAG	ST4.03ch04:58545474-58545494	ST4.03ch04:58545474-58545565
stu-miR8037	GGTTCCTATTCCCTCCAAATTAT	ST4.03ch08:14268914-14268935	ST4.03ch08:14268862-14268935
stu-miR8038b-3p	GTTCAACTTGCTCACTTGGAG	ST4.03ch04:12109130-12109150	ST4.03ch04:12109052-12109150
stu-miR8038b-5p	CCTTGTGAGTAAGTTGAATCTC	ST4.03ch04:12109052-12109073	ST4.03ch04:12109052-12109150
stu-miR8039	GGTGATAGTTCAGATAGGAAA	ST4.03ch00:26102405-26102425	ST4.03ch00:26102348-26102425
stu-miR8041b-3p	TGGTCGGCATGACTCCCGAGGT	ST4.03ch04:54349044-54349064	ST4.03ch04:54349044-54349114
stu-miR8041b-5p	TGGTCGGCATGACTCCCGAGGT	ST4.03ch04:54349044-54349064	ST4.03ch04:54349044-54349114
stu-miR8042	AGATCAGCACTTCAGTCTAAT	ST4.03ch02:34740394-34740414	ST4.03ch02:34740394-34740496
stu-miR8043	GGCCAAAGTCCAATTATATCA	ST4.03ch01:70019088-70019108	ST4.03ch01:70019088-70019212
stu-miR8044-3p	TCTCCAGCGATATTTGAAACT	ST4.03ch11:38928183-38928203	ST4.03ch11:38928119-38928203
stu-miR8044-5p	TTTCAAATATGGTTGGAGATG	ST4.03ch11:38928119-38928139	ST4.03ch11:38928119-38928203
stu-miR8045	ATTGATAGTTGAGGTGTGTTT	ST4.03ch12:1520170-1520190	ST4.03ch12:1520102-1520190
stu-miR8046-5p	GTCATTGAAACTTCGATCATA	ST4.03ch12:5786363-5786383	ST4.03ch12:5786301-5786383
stu-miR8047	CCATTTTTTCGAAATTAGACC	ST4.03ch12:6084877-6084897	ST4.03ch12:6084877-6084963
stu-miR8048-3p	TGTTCATTAGCATGTCCATCT	ST4.03ch06:35200375-35200395	ST4.03ch06:35200375-35200443
stu-miR8048-5p	CAAGATGGAGATGCTAATGAG	ST4.03ch06:35200423-35200443	ST4.03ch06:35200375-35200443
stu-miR8049-3p	TATCAGGCTCATGTAGACATG	ST4.03ch04:59810791-59810811	ST4.03ch04:59810791-59810869
stu-miR8049-5p	TGCATGTCTGCATGAGCCTTG	ST4.03ch04:59810849-59810869	ST4.03ch04:59810791-59810869
stu-miR8050-3p	CCAAGTAGGAATCTCAAGTCA	ST4.03ch09:57347459-57347479	ST4.03ch09:57347459-57347561
stu-miR8050-5p	ATTGACCTTGATTCCTACTT	ST4.03ch09:57347542-57347561	ST4.03ch09:57347459-57347561

stu-miR8051-5p	TAGTATGGTAGAAAGATTCA	ST4.03ch04:1636656-1636675	ST4.03ch04:1636656-1636698
stu-miR827-3p	TTAGATGAACATCAACAAACA	ST4.03ch12:58219550-58219570	ST4.03ch12:58219484-58219570
stu-miR827-5p	TTTGTTGATGGTCATCTATTC	ST4.03ch12:58219484-58219504	ST4.03ch12:58219484-58219570

miR33	uuuaauuuggcuucaguugacauuuuaucccuccaaguuuuggugugcuuu gugcauuaaguagguacuuaaacucguuaaaauuaaacaaguaaacacaguua uccuauugggcauuaacacacauagaccaccacguaggacuuaauuugcuau uagaacgcuacguaggacgcauugucucuuuuuacaauuacacaaguuu aaugacuuaucuuugcacaucacaaaauuggaggcguaugucagcugagg cuagaauaaug	chr04:42665309..42665580:+	uuuaauuuggcuucaguugac	no
miR34	aacuuuggacaggaccuauuaccccuaugcacuauuuuuauuguaauuuuaa agauauauaggugcccacguggacacauaaauuuugcaccuuuaaaauaa aacuuuguccagcugggcacuuauauaucuuuuuuuuacacuuuuuuuagug cuggaggguuuuagguuugaccaaguuuug	chr04:45562935..45563122:-	aacuuuggacaggaccuauuaccc	no
miR35	gcucuaggcaucaaauucagcauuuuaaaauaacuuuuuauuguaauuacu uuuuucauuuuuuuuggaaaauaagagguagugcuucagugaaaacacuacu aaaauuuucaaauucaccgaagcauuuucucuuuuuuuuccaaaaauuuuu auaaguuuacaucgaaauuuuuuaucauugcuaguuuugauggcuuag agcuu	chr04:47925127..47925341:-	gcuaguuuugauggcuuagagcuu	no
miR36a	uuuuuauuuuuuagcccucaacuuuuuauuugcacaaguagacacuaaac uuuguauaaagcugaauaaguagacacauagucuccuauugggcauuaaacaca uaggacaccacguaggauucaaauugccauugaggaugccacguaggauug ugugucuauuuuauacaauuuuauacaaguuuugagugucugcuugcgcac ucaaaguuuagaggacuuuuuugaaaugaggcc	chr04:62172963..62173204:+	aggacuuuuuugaaaugaggcc	no
miR36b	ucacagcucuuuuuuuauuccucaacuuuugaugcgcacaaauagucacuuu aacuuuguaaaaaauuaacaaaauagacacgcaugucguacgugacuuuuaca ugacaaauuucaucuuuuuauuugauguccuauuuuuguguuuuuagccacguag gacucuuaggucuuuuuuuacaauuuuacaaguuuagcugucuuuuuuu gcacacuuuuuuuagagacuuuuuugaaaugagguc	chr10:41566077..41566326:-	aggacuuuuuugaaaugagguc	no

miR101a	<p>auaaaauagacucuaacuuggcauuagcuggccacuauagacuuuaauuuu ggauugcacaaguagaccuaaaacuuguauaaaauuagaacaaugaacaca uucaucauauuguuuuaucauagaggacacgugugucuacuuguucua uuuuuacaaguuuuagugucuacuugugcacacucaaaaguuggaggcaua guuguccacuaaaagccaaaauaauggucauguuuauguuu</p>	chr09:1111827..1112076:-	auaaaauagacucuaacuuggca	no
miR101b	<p>auaaaauagacucuaacuuggcuccaucugacaacuauagacuuuaacu agaugugcacaaguagaacuuuaacuuguauaaaauuagaacaaugaacaca uucguccuacauagacaccuauauagcauuuuuacguccuauguauuuau gccauagaggacacgugcguacuauuuaauuuuuuacaaaguuuuaagugu cuacuugugucacucaaaaguuggagggaauaguuguccguuaaagucaagu uaauggucauguuuauguuu</p>	chr04:61741723..61742005:+	auaaaauagacucuaacuuggcu	no
miR101c	<p>auaaaauagacucuaacuuggcuuuacaacaauuuauaguccuccaacu gagugugcauaaguagacacuuuaacuuguauaaaauuacaagcagacaca cguguccuacauagacaauacuacguaggacgucacguagacacaaaauug ccauguaggugcuauaguaggacgaugagccaauuugcucauuuuuaca aguuuuagugucuuuuuggcacacucaaaaguuaaaggucauguuuuac ugauguuaaaguuaaggucauguuuauguuu</p>	chr06:41681151..41681444:-	auaaaauagacucuaacuuggcu	no

5. Genes blanco de los 7 miRNAs candidatos a dar en *Solanum tuberosum* subsp *andigena*, el fenotipo de tolerancia al estrés hídrico.

miRNA	Código del gen blanco en la base de datos del PGSC	Nombre del gen blanco
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400025479	PHAP2A protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400006482	APETALA2
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400004006	PHAP2A protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400025390	Apetala 2
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400012038	APETALA2
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400027904	Relative to APETALA2 1
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400011046	PHAP2B protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400006604	Apetala 2
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400017234	Auxin-induced protein 5NG4
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400001777	Zinc finger, RING-type
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400008901	One helix protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400010058	Conserved gene of unknown function
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400040761	Conserved gene of unknown function
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG401018705	Conserved gene of unknown function
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400007126	DNA binding protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400006988	KANADI like transcription factor
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400019276	S-locus-specific glycoprotein S6
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG402023991	Conserved gene of unknown function
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400019323	Non-specific lipid-transfer protein
stu-miR172d-3p	PGSC0003DMG400034352	Anthranilate N-benzoyltransferase protein
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400007278	Gene of unknown function
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400016748	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400010797	Octanoyltransferase
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400008869	Conserved gene of unknown function
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400020546	Ubiquitin family protein

stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG40000623	Conserved gene of unknown function
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400022070	Gene of unknown function
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400023869	Cf-2.2
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400020243	GRAS family transcription factor
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400020711	Auxin response factor 1
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400033900	Conserved gene of unknown function
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400015884	HAT family dimerisation domain containing protein
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400000289	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400009063	L24 ribosomal protein
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400000284	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400029915	Acyl-CoA synthetase
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400038195	Proteasome subunit beta type
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400042943	Proteasome subunit beta type
stu-miR1886i-5p	PGSC0003DMG400030635	DNA ligase
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400022340	Ccd1
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400009744	Kinase
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400010178	F-box family protein
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400019043	Gene of unknown function
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400001321	ATCUL3/ATCUL3A/CUL3/CUL3A
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG400018425	50S ribosomal protein L18, chloroplast
stu-miR393-3p	PGSC0003DMG402010558	Ribosomal protein L11
stu-miR6025	PGSC0003DMG400009300	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 2
stu-miR6025	PGSC0003DMG401002858	Peroxisomal membrane protein pmp34
stu-miR6025	PGSC0003DMG400023429	Actin-58
stu-miR6025	PGSC0003DMG400023708	Actin-58
stu-miR6025	PGSC0003DMG400027746	Actin-97
stu-miR6025	PGSC0003DMG400024267	Bell homeotic protein
stu-miR6025	PGSC0003DMG400004171	ATCHX24
stu-miR6025	PGSC0003DMG400027102	Conserved gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG401024031	Serine endopeptidase degp2
stu-miR6025	PGSC0003DMG400006275	Methyl binding domain protein

stu-miR6025	PGSC0003DMG400028338	Conserved gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG401027685	Uncharacterized CRM domain-containing protein, chloroplastic
stu-miR6025	PGSC0003DMG400005214	Boron transporter
stu-miR6025	PGSC0003DMG400004074	Conserved gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG400021607	WD-repeat protein
stu-miR6025	PGSC0003DMG400005593	Regulator of chromosome condensation/beta-lactamase-inhibitor protein II
stu-miR6025	PGSC0003DMG400003108	Bromodomain-containing RNA-binding protein 1
stu-miR6025	PGSC0003DMG400013683	ATP binding protein
stu-miR6025	PGSC0003DMG400021197	Vacuolar protein sorting-associated protein 2 homolog 2
stu-miR6025	PGSC0003DMG400029273	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
stu-miR6025	PGSC0003DMG400025217	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
stu-miR6025	PGSC0003DMG400011144	Hydrophobic protein OSR8
stu-miR6025	PGSC0003DMG400004100	Acetyl-CoA synthetase
stu-miR6025	PGSC0003DMG400021838	Gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG400019619	OJ991214_12.13 protein
stu-miR6025	PGSC0003DMG400028394	Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase, chloroplastic
stu-miR6025	PGSC0003DMG402002858	Gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG400003566	ARO1 2
stu-miR6025	PGSC0003DMG400035600	Conserved gene of unknown function
stu-miR6025	PGSC0003DMG400011644	Elongation factor
stu-miR6025	PGSC0003DMG400016238	DEGP10
stu-miR6025	PGSC0003DMG400027494	Nucleic acid binding protein
stu-miR6025	PGSC0003DMG400018134	Cytochrome P450 71A4
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400021658	Polygalacturonase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG402025107	Gene of unknown function
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400011511	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400029398	Auxin efflux carrier family protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG401007901	Actin binding protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400012348	Heavy metal ATPase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400001776	Zinc finger family protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400027143	Dihydrolipoyl dehydrogenase

stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400017343	Haloacid dehalogenase superfamily protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400029269	Ankyrin repeat-containing protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400005010	Peptidase C45, acyl-coenzyme A/6-aminopenicillanic acid acyl-transferase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400006428	Ankyrin repeat family protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400029297	Abscisic insensitive 1B
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400023345	ARF domain class transcription factor
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400026545	Raspberry3
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400020603	Alpha amylase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400006000	Receptor kinase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400000225	Conserved gene of unknown function
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG402005658	Amino acid transporter
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400019958	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400043311	Transposon MuDR mudrA
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG402009305	Blight resistance protein T118
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400014277	Hydrolase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400033172	Gene of unknown function
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400014133	F-box family protein
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400026218	Meiotic serine proteinase
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400024055	Nematode resistance
stu-miR7992-5p	PGSC0003DMG400023151	WD-repeat protein
stu-miR8004	PGSC0003DMG400007821	Endosomal P24A protein
stu-miR8004	PGSC0003DMG400012127	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol
stu-miR8004	PGSC0003DMG400027668	RNA binding protein
stu-miR8004	PGSC0003DMG400022307	Starch branching enzyme
stu-miR8004	PGSC0003DMG400005896	Protein kinase
stu-miR8004	PGSC0003DMG400023729	MADS9 protein
stu-miR8004	PGSC0003DMG400005128	Protein kinase
stu-miR8004	PGSC0003DMG400027384	Calmodulin
stu-miR8004	PGSC0003DMG400017149	Conserved gene of unknown function
stu-miR8009	PGSC0003DMG401022901	(S)-2-hydroxy-acid oxidase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400027821	DNA binding protein

stu-miR8009	PGSC0003DMG401004334	Pyruvate dehydrogenase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400043969	Gene of unknown function
stu-miR8009	PGSC0003DMG400024499	Para-hydroxybenzoate--polyprenyltransferase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400025490	Peroxidase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400007837	Conserved gene of unknown function
stu-miR8009	PGSC0003DMG400040523	Gene of unknown function
stu-miR8009	PGSC0003DMG400015822	Amino acid transporter
stu-miR8009	PGSC0003DMG400000924	ATP-dependent RNA helicase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400002477	Gene of unknown function
stu-miR8009	PGSC0003DMG400018891	TNP2
stu-miR8009	PGSC0003DMG400026943	Pyruvate dehydrogenase
stu-miR8009	PGSC0003DMG400032204	D12 oleate desaturase

6. Genes blanco de los miRNAs que tuvieron mayor expresión.

miRNA	Código del gen blanco en la base de datos del PGSC	Nombre del gen blanco
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400003269	Conserved gene of unknown function
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400024336	Conserved gene of unknown function
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400007288	NtSar1 protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400046209	F-box family protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400023761	Arginine/serine-rich coiled coil protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG401001040	F-box protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400001313	UPA19
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400019893	Ribosomal protein L36
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400019278	ATP binding protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400026050	COP9 signalosome complex subunit 7
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400006907	Glycosyltransferase UGT90A7
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400006908	Glycosyltransferase UGT90A7
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400029512	ZFP4 (ZINC FINGER PROTEIN 4)
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400021547	Ethylene signaling protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400029879	Mechanosensitive ion channel domain-containing protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400003030	Gene of unknown function
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG402003179	Glycosyltransferase, CAZy family GT8
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400031382	Transcription factor
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400017432	Multidrug resistance-associated protein 2, 6 (Mrp2, 6), abc-transporter
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400020245	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR396-5p	PGSC0003DMG400012989	Aspartic proteinase Asp1
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG402029709	Gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400010975	Ubiquitin-protein ligase
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400006075	CYP72A56
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG401008792	Ribosomal protein large subunit 2

stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400007947	WRKY transcription factor 2
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400036799	Mutator-like transposase
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400037500	Mutator-like transposase
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400006821	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400012220	Conserved gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400036948	Gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400018308	Serine-threonine protein kinase, plant-type
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG401010056	CONSTANS 3
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400018385	Serine-threonine protein kinase, plant-type
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG402028079	Gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG403020324	Gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400013452	11S globulin isoform 3
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400008787	Ferritin
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400011637	Conserved gene of unknown function
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400000398	Heat shock protein 70-3
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400017299	Xyloglucan endotransglycosylase
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG401004220	Short-chain dehydrogenase
stu-miR156d-5p	PGSC0003DMG400015560	Auxin-regulated protein
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400011259	Endoribonuclease Dicer homolog
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400038916	Integrase core domain containing protein
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400012703	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400024579	Cell division cycle
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400015776	Conserved gene of unknown function
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400044352	Gene of unknown function
stu-miR162b-3p	PGSC0003DMG400024006	Conserved gene of unknown function

7. Genes blanco del miRNA stu-miR156d-3p.

miRNA_Acc.	Gene	Funcion
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400017655	Phototropic-responsive NPH3 family protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400008023	Conserved gene of unknown function
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400018514	ATP binding protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400009387	Optic atrophy 3 protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400016729	Conserved gene of unknown function
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400025675	F-box protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400021902	Squamosa promoter-binding protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400032177	Pentatricopeptide repeat-containing protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400012926	Protein kinase
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400016325	Lesion-inducing protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400002795	Conserved gene of unknown function
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400027665	MLO 1
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG401028427	Leucine-rich repeat family protein
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG401008489	Mitochondrial inner membrane protease subunit
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400001441	Cyclic nucleotide-gated ion channel
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400030536	Wall-associated kinase
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400020228	Protein phosphatase 2a, regulatory subunit
stu-miR156d-3p	PGSC0003DMG400001120	Ribonuclease P