



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE sRNA EN RESPUESTA A LA
INTERACCIÓN POR PMeV-Mx EN *Carica papaya*
var. Maradol EN ETAPA DE PREFLORACIÓN**

Tesis que presenta

Estefanía de Guadalupe Ravell Mujica

En opción al título de

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Mérida, Yucatán, México

2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Estefanía Ravell Mujica titulado **Análisis de RNAs pequeños en respuesta a la interacción por PMeV-Mx en *Carica papaya* var. maradol en etapa de prefloración**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en el Laboratorio USF10, en la línea de investigación de interacción planta ambiente del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa y la Codirección de la Dra. Elsa Beatriz Góngora Castillo, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 9 de abril de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:



IBQ. Estefanía Ravell Mujica

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Disección molecular de los componentes genómicos de PMeV-Mx, un virus similar a umbravirus asociado a meleira de la papaya en México” con clave A1-S-19850, cuyo responsable técnico fue la Dra. Luisa A. López Ochoa.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada 669545 y por el financiamiento para el proyecto titulado “Disección molecular de los componentes genómicos de P_{MeV}-Mx, un virus similar a *umbravirus* asociado a meileira de la papaya en México” con clave A1-S-19850, bajo la dirección de la Dra. Luisa A. López Ochoa.

A mis directoras de tesis: Dra. Luisa A. López Ochoa y Dra. Elsa Góngora Castillo por haberme aceptado y asesorado, por sus observaciones, sugerencias y comentarios que sirvieron para la elaboración de esta tesis. Gracias por la paciencia y ánimos conmigo, crecí mucho en lo profesional y personal.

A mi comité revisor formado por la Dra. Georgina Estrada Tapia, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y Dr. Hernán Villanueva Alonso por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer este documento.

A la Dra. Arianna Chan León por su apoyo en la parte experimental con el cultivo e inoculación de las plantas de papaya, así como en la extracción de RNA. También, por su apoyo incondicional y consejos en los momentos difíciles de la maestría.

Al M.C. Roberto Ku por el apoyo técnico brindado, en el mantenimiento de las plantas de papaya en casa sombra.

A mis compañeras y amigas de los laboratorios USF10 de la UBBMP (virología molecular y laboratorio de Biotecnología informática de la UBT por sus sugerencias en los seminarios de grupo. En especial a mi compañera Perla Contreras por su apoyo y consejos durante la maestría, así como a Alethia Toriz Bravo, por el esquema de la organización genómica de virus similares a *umbravirus* datos de la

predicción de estructura secundaria del genoma de PMeV-Mx, previo a su publicación.

A mí, por permitirme intentar superarme cada día a pesar de las situaciones externas e internas que se me presentan.

DEDICATORIAS

A mi familia y a mi pareja. En especial a mis padres Lourdes y Ramón por siempre apoyarme en todo. David, gracias por estar en mi vida y alentarme a continuar con mi meta, me has demostrado que puedo lograr lo que me propongo.

Y, por último, pero no menos importante a Dios.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I 3

ANTECEDENTES 3

1.1 Cultivo de la papaya 3

1.2 Enfermedad de la meleira de la papaya 5

1.3 Virus de la meleira de la papaya (PMeV)..... 6

1.4 Virus de la meleira de la papaya en México (PMEV-MX)..... 6

1.5 *Umbravirus*..... 7

1.6 Complejos de virus asociados a la meleira de la papaya..... 7

1.7 RNA pequeños en plantas..... 10

1.8 RNA de interferencia (iRNA) en la interacción planta-virus..... 12

1.9 microRNA en *C. papaya*..... 14

1.10 RNA largos no codificantes en virus 15

1.11 Estructuras secundarias en regiones codificantes y no codificantes en *Umbravirus* y virus similares a *Umbravirus*..... 15

1.12 Secuenciación de nueva generación para la identificación de RNA pequeños 16

JUSTIFICACIÓN 17

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN: 18

OBJETIVO GENERAL:..... 18

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 18

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 19

CAPÍTULO II 20

MATERIALES Y MÉTODOS 20

2.1 Obtención del material vegetal 20

2.2 Inoculación con PMeV-Mx..... 20

| | |
|---|----|
| 2.3 Detección de PMeV-Mx por RT-PCR | 21 |
| 2.4 Colecta de material biológico..... | 22 |
| 2.5 Extracción de RNA total | 22 |
| 2.6 cuantificación y calidad del RNA total..... | 23 |
| 2.7 Secuenciación de los RNA pequeños de la muestra de hojas DE <i>C. papaya</i> | 23 |
| 2.8 Análisis bioinformático | 24 |
| 2.9 Módulo 1: pre-procesamiento | 25 |
| 2.10 Identificación de microRNA por homología y <i>de novo</i> en mirDeep2 | 25 |
| 2.11 Determinación de los RNA de interferencia virales en la interacción de PMeV-Mx con <i>Carica papaya</i> var. Maradol..... | 26 |
| 2.12 Visualización del alineamiento de las secuencias sanas e infectadas alineadas a los genomas de <i>C. papaya</i> y PMeV-Mx | 26 |
| 2.13 Predicción teórica de las estructuras secundarias precursoras de los RNA de interferencia virales con presencia en las regiones ORF1, ORF2 y RNA largo no codificante de PMeV-Mx.. | 26 |
| 2.14 Identificación de los RNA de interferencia de la planta en la interacción de PMeV-Mx con <i>Carica papaya</i> var. Maradol | 27 |
| CAPITULO III | 28 |
| RESULTADOS..... | 28 |
| 3.2 Secuenciación de RNA pequeños y procesamiento de secuencias. | 28 |
| 3.1 Resultados del alineamiento para identificar mirna conocidos..... | 30 |
| 3.2 Identificación de los miRNA más abundantes en plantas sanas e infectadas en hojas de <i>C. papaya</i> | 30 |
| 3.3 Comparación de miRNA expresados en plantas de papaya con meleira en Brasil y México | 33 |
| 3.4 Análisis de los miRNA <i>de novo</i> | 34 |
| 3.5 Identificación de los vsiRNA virales en la interacción <i>C. papaya</i> PMeV-Mx | 35 |
| 3.6 RNA de interferencia virales en el 5' UTR y el ORF1 de PMeV-Mx..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.7 Predicción de las estructuras secundarias que originan los vsiRNA más abundantes en el ORF1 | 39 |
| 3.8 RNA de interferencia virales en la región intergénica y el ORF2 de PMeV-Mx | 42 |
| 3.9 vsiRNA sobresalientes en horquillas putativas en el ORF2 de PMeV-Mx | 45 |
| 3.10 RNA de interferencia virales en el RNA largo no codificante de PMeV-Mx | 46 |
| 3.11 RNA de interferencia endógenos en plantas sanas e infectadas de <i>C. papaya</i> var. Maradol | 50 |
| 3.12 Abundancia y blancos putativos de los siRNA en el transcriptoma de <i>C. papaya</i> var. Maradol | 52 |
| CAPITULO IV | 54 |
| DISCUSIÓN | 54 |
| CAPITULO V | 58 |
| CONCLUSIÓN GENERALES Y PERSPECTIVAS | 58 |
| CONCLUSIÓN | 58 |
| PERSPECTIVA | 59 |
| BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| ANEXOS | 69 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Plantas de <i>C. papaya</i> | 3 |
| Figura 1.2. Sintomatología de la meleira de la papaya en frutos y hojas de papaya | 5 |
| Figura 1.3 Representación gráfica de la organización del virus de la meleira de la papaya, aislado de Brasil..... | 6 |
| Figura 1.4 Representación gráfica de la organización genómica de los virus similares a <i>Umbravirus</i> asociados a la meleira de la papaya..... | 9 |
| Figura 1.5. Esquema de la biogénesis de los RNA pequeños..... | 12 |
| Figura 3.1. Abundancia de las lecturas en las bibliotecas de los RNAs por tamaño(nucleótido) | 29 |
| Figura 3.2 Diagrama de la distribución de los vsiRNA en el ORF1 | 37 |
| Figura 3.3 Distribución de la abundancia de los vsiRNA del ORF1 según su tamaño (en nucleótidos)..... | 37 |
| Figura 3.4 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el ORF1..... | 38 |
| Figura 3.5. Estructuras secundarias del RNA genómico del PMeV-Mx que pueden dar origen a los vsiRNA más predominantes en el 5'UTR y el ORF1 | 40 |
| Figura 3.6 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el sitio resbaladizo -1PRF de PMeV-Mx | 41 |
| Figura 3.7 Estructura secundaria de horquilla que engloba el sitio resbaladizo putativo -1PRF de PMeV-Mx | 42 |
| Figura 3.8 Distribución de las secuencias en la región ORF2. sentido directo (azul) y sentido reverso (rojo)..... | 43 |
| Figura 3.9 Distribución de la abundancia de los vsiRNA del ORF2 según su tamaño (nucleótidos)..... | 44 |
| Figura 3.10 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el ORF2 de PMeV-Mx | 45 |
| Figura 3.11 Estructuras secundarias de dsRNA con los vsiRNA más predominantes en el ORF2 | 46 |

Figura 3.12 Distribución de los vsiRNA en el lncRNA 47

Figura 3.13 Abundancia de vsiRNA el lncRNA de PMeV-Mx por tamaño (en nucleótidos) 48

Figura 3.14 Mapa de calor de los vsiRNA más representados en el lncRNA de PMeV-Mx..... 49

Figura 3.15 Estructuras secundarias de horquilla con las secuencias más predominantes en el lncRNA..... 50

Figura 3.16 Abundancia de siRNA alineados al transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol por tamaño (en nucleótidos)..... 52

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1 Reactivos para la síntesis de la primera cadena | 21 |
| Tabla 2.2. Reactivos para la mezcla en la detección por RT-PCR de PMeV-Mx..... | 22 |
| Tabla 2.3 Parámetros predeterminados de Bowtie2 para el alineamiento..... | 27 |
| Tabla 3.1 Resultados de la secuenciación de RNA pequeños enviados por novogene..... | 28 |
| Tabla 3.2 Lecturas totales que se conservaron en las bibliotecas de plantas sanas e infectadas. | 28 |
| Tabla 3.3. Número de microRNA conocidos en plantas sanas e infectadas..... | 30 |
| tabla 3.3. miRNA más abundantes en plantas sanas e infectadas..... | 32 |
| tabla 3.4 miRNA poco abundantes con mayor expresión en plantas infectadas | 33 |
| Tabla 3.5 miRNA en respuesta a la meleira de la papaya en plantas de Brasil y México | 34 |
| Tabla 3.6 Abundancia de los miRNA <i>de novo</i> identificados por mirDeep2 | 35 |
| Tabla 3.7 Relación de lecturas alineadas a diferentes regiones del genoma de PMeV-Mx | 35 |
| Tabla 3.9. Relación de lecturas de sRNA alineadas a los transcriptomas de <i>C. papaya</i> de plantas sanas e infectadas | 51 |
| Tabla 3.10 Relación de la abundancia de los contig en plantas sanas y sus blancos putativos. | 53 |
| Tabla 3.11 Relación de la abundancia de los contig en plantas infec y sus blancos putativos. . | 53 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dsRNA | RNA bicatenario |
| iRNA | RNA de interferencia |
| kb | Kilobases (unidad de medida de longitud del DNA o RNA). |
| lncRNA | RNA largo no codificante |
| mRNA | RNA mensajero |
| miRNA | microRNA |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| PRSV | Virus de la mancha anular de la papaya |
| PMeV | Virus de la meleira de la papaya |
| PMeV-Mx | Variante mexicana del virus de la meleira de la papaya |
| PpVQ | Papaya virus Q |
| PMeV2 | Virus 2 de la meleira de la papaya |
| RdRP | RNA polimerasa dependiente de RNA |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| sRNA | RNA pequeños |
| SAR | Resistencia sistémica adquirida |
| sivRNA | RNA pequeños de interferencia viral |
| ssRNA | RNA monocatenario |

RESUMEN

El PMeV-Mx, es un virus vinculado a la meleira de la papaya en México, enfermedad que ha ganado notoriedad a nivel mundial debido a sus síntomas agresivos que emergen posterior a la floración, resultando en considerables pérdidas en los cultivos comerciales. Ante la amenaza de patógenos virales, las plantas despliegan diversos mecanismos defensivos, entre ellos el silenciamiento génico inducido por RNA, que involucra la producción de moléculas de RNA de 21 a 24 nucleótidos, para regular la expresión génica activar mecanismos de defensa o bien para degradar al RNA viral. En el contexto de las plantas, se manifiestan los microRNA y los RNA de interferencia. Estudios realizados en Brasil por el grupo de Abreu *et al.*, 2014 identificaron 11 microRNA asociados a la meleira de la papaya, los cuales regulan ciertos mecanismos de defensa durante la etapa de prefloración.

En este sentido, el propósito de este trabajo fue identificar las diversas poblaciones de RNAs pequeños expresados durante la etapa de prefloración en la infección de PMeV-Mx en *Carica papaya* variedad maradol. Los resultados de este estudio son el primer acercamiento para conocer las poblaciones de RNA pequeños que se expresan en dicha interacción.

ABSTRACT

The PMeV-Mx, a novel virus associated with papaya sticky disease in Mexico, has gained worldwide attention due to its aggressive symptoms that emerge after flowering, resulting in significant losses in commercial crops. Faced with the threat of viral pathogens, plants deploy various defense mechanisms, including RNA-induced gene silencing, which involves 21 to 24 nucleotide-long RNA molecules with no protein-coding function. In the context of plants, two types of these molecules manifest: microRNAs and small interfering RNAs. Studies conducted in Brazil by the Abreu *et al.*, in 2014 identified 11 microRNAs produced in response to meleira disease, which regulate certain defense mechanisms during the pre-flowering stage.

In this regard, the aim of this work is to identify the diverse populations of small RNAs expressed during the pre-flowering stage during PMeV-Mx infection in *Carica papaya* Maradol variety. The results of this study represent the first approach to understand the populations of small RNAs produced.

INTRODUCCIÓN

Los RNA pequeños no codificantes, desempeñan un papel diverso en una variedad de procesos reguladores en las plantas, y tienen un impacto significativo en la fisiopatología de enfermedades vegetales, lo que los convierte en objetivos potenciales para la intervención en las enfermedades virales que infectan a las plantas. Cuando las plantas enfrentan patógenos virales, activan respuestas de defensa, incluyendo el silenciamiento génico de RNA, un mecanismo que regula la expresión de genes mediante la síntesis de RNA pequeños (sRNA) a partir de moléculas precursoras de RNA de doble cadena dsRNA. Estos sRNA, con una longitud de alrededor de 20-25 nucleótidos, interactúan con complejos enzimáticos formados por Dicer y Argonaut, para reconocer secuencias complementarias de DNA o RNA para unirse. Este proceso bloquea la transcripción o induce la degradación de los transcritos, o ácidos nucleicos virales, resultando en el silenciamiento génico, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. La infección viral se asocia con la síntesis de RNAs de interferencia virales (vsRNA) y con el desarrollo de la enfermedad en la planta (Akbar, *et al.*, 2022).

La papaya (*Carica papaya*), un cultivo de gran importancia en América Latina, enfrenta desafíos notables debido a diversas enfermedades virales que afectan la calidad y producción de frutos. Entre estas destaca el complejo de virus que causa la Meleira, que ha ganado importancia a nivel mundial debido a sus síntomas agresivos, manifestándose tras la floración y generando pérdidas considerables en los cultivos comerciales (SADER, 2021). Debido a que los síntomas aparecen en etapas avanzadas y principalmente en los frutos, se ha planteado que las plantas afectadas muestran una respuesta temprana de resistencia sistémica adquirida (SAR) en las hojas, lo que sugiere una interacción anticipada con el virus antes de que los síntomas se manifiesten en los frutos. Este sistema de respuesta temprana puede involucrar la síntesis de RNA pequeños y su interacción con los mecanismos de defensa de la planta (Sa-Antunes, *et al.*, 2020).

En este proyecto, se buscó identificar y categorizar las diversas poblaciones de sRNA presentes en las hojas de plantas de *Carica papaya* var. Maradol, tanto en condiciones sanas como infectadas con PMeV-Mx, durante la etapa de prefloración. Además, se detectaron los RNA de interferencia derivados específicamente de PMeV-Mx con el fin de ampliar la comprensión de las interacciones entre los RNA pequeños y los virus en las plantas de papaya, lo que podría tener implicaciones significativas en el desarrollo de estrategias de manejo de enfermedades virales en los cultivos de papaya.

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1 Cultivo de la papaya

La papaya, *Carica papaya* L., pertenece a la familia *Caricaceae* es una planta herbácea de crecimiento arborescente relativamente rápido, puede alcanzar una altura que va desde 1.8 m en el caso de cultivares comerciales, hasta 6.1 m en los ejemplares silvestres. Se caracteriza por tener un solo tallo hueco, erecto, grueso de 20-30 cm de diámetro, presenta un gran número de hojas grandes y lobuladas. Su sistema radicular está formado por una raíz primaria y raíces secundarias. Las inflorescencias son ramificadas, las accesiones silvestres son dioicas, es decir presentan ya sea, flores femeninas o masculinas, mientras que, en las variedades comerciales, además se presentan plantas con flores hermafroditas por lo que se considera que es una planta polígama (Lee *et al.*, 2005) (**Fig. 1.1**).



Figura 1.1 Plantas de *C. papaya*. A) Silvestre, B) Comercial, variedad Maradol. (fotografía. G. Fuentes, Tomada de Girón-Ramírez *et al.*, 2023).

El cultivo de papaya es una actividad productiva de Centro y Sudamérica. México es uno de los principales productores y exportadores de papaya. Actualmente, es el primer exportador hacia Estados Unidos. Asimismo, la papaya es un producto de consumo doméstico, siendo las variedades más comunes en cultivos: Maradol roja, Criolla, Amarilla y Hawaiana (Tipo solo) (Madrigal *et al.* 2013). La papaya es producida en 19 entidades del país, donde en el 2020 lideraron, Oaxaca (31.2%), Colima (17.6%) y Chiapas (14.1%) estados que aportaron el 70% del volumen total nacional colocando a México en tercer lugar en el mercado internacional (SADER, 2021). El 90% de la papaya que se produce en México es de la variedad Maradol.

Los cultivos comerciales de papaya se ven afectados por enfermedades que tienen etiologías bióticas y abióticas que afectan la calidad del fruto, provocando grandes pérdidas económicas. Las enfermedades que más predominan son de tipo viral y fúngicas. Actualmente, la enfermedad con mayor presencia en los cultivos es de tipo fúngico, llamada antracnosis, causada por hongos del género *Colletotrichum*. En menor orden de predominancia se presentan las enfermedades bacterianas. La enfermedad viral más importante es la mancha anular, causada por el Virus de la mancha anular de la papaya (PRSV-P por sus siglas en inglés) que tiene presencia mundial y que afecta severamente la producción de frutos (Fauquet *et al.*, 2005). Otra enfermedad viral que está tomando mucha importancia a nivel mundial recientemente es la meleira de la papaya o enfermedad pegajosa (PSD), debido a la presencia de sus síntomas extremadamente agresivos y que aparecen después de la floración, dejando grandes pérdidas en los cultivos comerciales (Revisado por Sa-Antunes *et al.*, 2020).

1.2 Enfermedad de la meleira de la papaya

La meleira de la papaya fue detectada por primera vez en Brasil en los años 80 del siglo pasado. Su sintomatología se caracteriza por la exudación espontánea anormal de látex acuoso en los frutos que tarda más de 2 minutos en coagular (**Figura 2b, panel izquierdo**). El látex se oxida al entrar en contacto con el oxígeno y provoca que el fruto y el borde de las hojas tengan manchas oscuras (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003) (**Figura 1.2**). También, la pulpa de la fruta presenta pequeñas manchas con una consistencia más suave (**Figura 1.2 C**) (Perez-Brito *et al.*, 2012).

En México en el año 2008, se observaron síntomas similares a la meleira de la papaya en plantaciones de papaya ubicada en el estado de Quintana Roo, México (Pérez-Brito *et al.*, 2012).

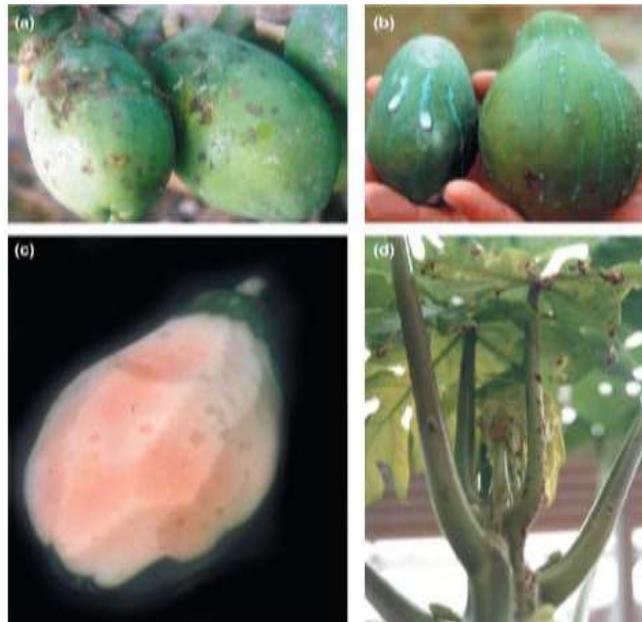


Figura 1.2. Sintomatología de la meleira de la papaya en frutos y hojas de papaya. a) Manchas por oxidación del látex. **b)** Comparación de la exudación del látex de un fruto sano y otro infectado. **c)** Manchas en la pulpa del fruto. **d)** Necrosis en las hojas jóvenes de la planta (Tomado de Perez-Brito *et al.*, 2012).

1.3 Virus de la meleira de la papaya (PMeV)

En 1993 Kitajima y colaboradores identificaron partículas isométricas de 50 nm en los laticíferos de las plantas de papaya enfermas y un RNA bicatenario (dsRNA) estimado en 10-12 kb. En 2003 Maciel-Zambolim y colaboradores realizaron la purificación de partículas virales del látex de frutos papaya y las utilizaron para inocular plántulas de papaya sanas, que posteriormente desarrollaron síntomas típicos de meleira. Al extraer ácidos nucleicos de las partículas purificadas, identificaron dsRNA, que migraba en geles de agarosa a una altura de 12 kb con marcadores de DNA. Con estos experimentos confirmaron que el agente causal de la enfermedad era un virus con genoma de dsRNA designado Virus de la meleira de la papaya (PMeV). En el año 2015, Abreu y colaboradores, reportaron la primera secuencia completa y organizada del genoma de 8.7 kb de PMeV, aislado en la Región Norte (RN) de Brasil (PMeV-RN), el cual contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican una proteína de la cápside (CP) y una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Abreu, *et al.*, 2015). Este genoma viral guardaba relación estrecha con miembros de la familia Totiviridae, pero recientemente se lo ha propuesto en la familia tentativa Fusagraviridae (Maurastoni *et al.*, 2023). Posteriormente, se secuenció un genoma de PMeV de 8,809 nt, aislado de Espiritu Santo, Brasil (PMeV-ES), que interesantemente comparte una baja identidad de secuencias proteicas con PMeV-RN, 75% para la CP y 67% para la RdRP (Sa-Antunes, *et al.*, 2016) representado en la **Figura 1.3**.



Figura 1.3 Representación gráfica de la organización del Virus de la meleira de la Papaya, aislado ES, Brasil. CP representa la proteína de la cápside putativa, y RdRP, la RNA polimerasa (Modificado de Sa-Antunes, *et al.*, 2016).

1.4 Virus de la meleira de la papaya en México (PMeV-Mx)

En el 2008, se observaron síntomas similares a los de meleira en plantaciones de papaya Maradol de la Península de Yucatán, México, encontrando un RNA extraído del látex de

frutos en el cual se observaban dos bandas de que migraban a la altura de 10 y 4.5 Kb en marcadores de DNA. La enfermedad también podría transmitirse a través del látex de papaya infectada a plantas sanas (Perez-Brito *et al.*, 2012). El grupo de trabajo de la Dra. López Ochoa obtuvo en 2011 una secuencia de 1154 pb, que al ser traducida codifica una RdRP con 42% de identidad a la RdRP de miembros del género *umbravirus*. Como también se identificaron fragmentos con alta identidad a dicha secuencia en plantas infectadas de Brasil, al virus identificado se le denominó variante mexicana del virus de la meleira de la papaya (PMeV-Mx) (Zamudio-Moreno *et al.* 2015). Meses más tarde, cuando se publicó el genoma del PMeV (Abreu *et al.*, 2015), fue evidente que PMeV-Mx corresponde a un virus nuevo, distinto al PMeV y no una variante de este. Actualmente, en el grupo de trabajo se cuenta con el genoma completo de PMeV-Mx, el cual tiene un genoma de ssRNA de 4,346 nucleótidos, con dos marcos de lectura abiertos (ORF), seguidos de un RNA largo no codificante (**Figura 1.4 A**) (Toriz-Bravo., *et al.*, sometido). El ORF1 codifica una proteína no caracterizada, mientras que el ORF2 codifica la RdRp. Al igual que los *Umbravirus*, el genoma de PMeV-Mx carece de una proteína de la cápside. PMeV-Mx es considerado como un virus similar a *umbravirus*. PMeV-Mx se transmite por semillas y por la chicharra *Empoasca papayae* (García-Cámara *et al.*, 2019; Tapia-Tusell *et al.*, 2015).

1.5 Umbravirus

Umbravirus es un género virus vegetales perteneciente a la familia Tombusviridae cuyo genoma carece de un ORF para una proteína de la cápside y contiene cuatro ORF. ORF1 codifica una proteína de 30 a 32 kDa que posiblemente es auxiliar de la replicación, como en otros géneros de la familia Tombusviridae. El ORF2 una RdRP, ORF3 y ORF codifican para proteínas del movimiento viral. Los *umbravirus*, al carecer de una cápside, dependen de un virus ayudador para llevar a cabo la encapsidación y la transmisión por insectos (Ryabov y Taliansky, 2021).

1.6 Complejos de virus asociados a la meleira de la papaya

En Ecuador se reportó la secuencia parcial de un virus relacionado filogenéticamente con PMeV-Mx, en plantas de papaya que presentaban síntomas de mancha anular de la

papaya, en el que se encontró al PRSV y un virus similar a *umbravirus*, al que se denominó papaya virus Q (PpVQ). Este último comparte hasta un 70% de identidad con PMeV-Mx (Quito-Avila, *et al.*, 2015) (**Figura 1.4 C**). Recientemente se reportó la meleira de la papaya en Ecuador, encontrándose en las plantas sintomáticas, tanto al PpVQ como a un virus muy similar al PMeV de Brasil, estableciendo que para que se produzca la enfermedad se requiere la presencia de ambos virus (Quito-Avila, *et al.*, 2023). Así mismo, en 2016 en Brasil, se mostró que las plantas con síntomas de meleira estaban infectadas con dos virus, PMeV y un virus similar a PMeV-Mx y a PpVQ, al que se denominó Virus de la meleira de la papaya 2 (PMeV2) (**Figura 1.4 B**) (Sa-Antunes *et al.*, 2016). En estas plantas se observaron dos poblaciones de partículas virales, unas que contenían al dsRNA de PMeV y otras al ssRNA de PMeV2, por lo que se planteó que al igual que los *Umbravirus*, los virus similares a *umbravirus* de papaya, en particular PMeV2, requieren de un virus ayudador para su transmisión por vectores, aunque esto aún no se ha demostrado (Sa-Antunes *et al.*, 2016). Actualmente se conoce la secuencia genómica de cuatro virus similares a *Umbravirus* asociados a la meleira de la papaya: PMeV-Mx, PpVQ, PMeV2 y Babaco virus Q (**Figura 1.4 C**). Este último en plantas de babaco, o papaya de monte, un pariente silvestre de papaya (Cornejo Franco, *et al.*, 2021). El genoma de los virus similares a *umbravirus* asociados a la meleira de la papaya tiene de 3600 a 4500 nucleótidos (nt) de largo, contiene dos ORFs y un RNA largo no codificante (lncRNA). Su organización genómica se esquematiza en la **Figura 1.4**.

La meleira también se ha extendido a Australia (Pathania *et al.*, 2019), donde se encontró a un virus similar a *umbravirus* asociado a la enfermedad, el cual, al igual que PMeV-Mx (Tapia-Tusell, *et al.*, 2015) también se transmite por semillas (Pathania *et al.*, 2019). En México y Australia aún no se ha identificado al Fusagravirus equivalente al PMeV. A pesar de que el genoma de PMeV-Mx comparte hasta 71% de identidad a nivel de nucleótidos con PMeV2 y PpVQ (Quito-Avila, *et al.*, 2023; Toriz-Bravo *et al.*, sometido; Sa-Antunes *et al.*, 2016) estos se consideran especies distintas de virus (Toriz-Bravo *et al.*, sometido).

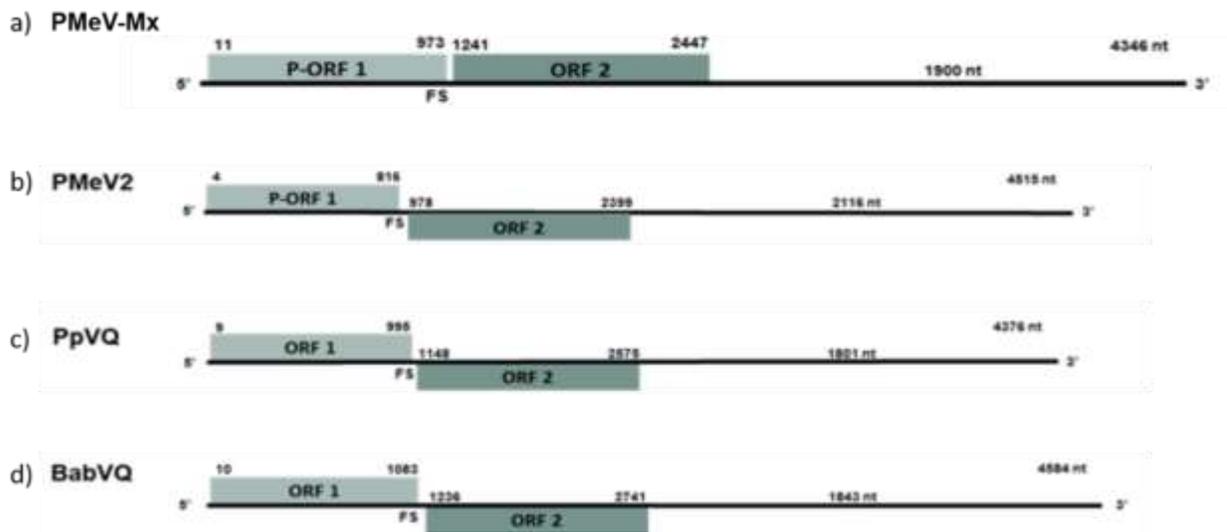


Figura 1.4 Representación gráfica de la organización genómica de los virus similares a umbravirus asociados a la meleira de la papaya. a) P-MeV-Mx, b) P-MeV2, c) PpVQ d) BabVQ. (Toriz-Bravo *et al.*, sometido).

1.7 RNA pequeños en plantas

Los sRNA desempeñan un papel esencial en las plantas para regular de la expresión génica y de esta manera controlar procesos esenciales de desarrollo y crecimiento, así como en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Dexheimer *et al.*, 2020). Por lo general, la longitud de los sRNA varía de 18 a 26 nt, aunque se han encontrado hasta de 30 nt (Bartel *et al.*, 2018). En términos de clasificación, los sRNA de plantas se dividen principalmente en dos categorías: los microRNA (miRNA) y los RNA pequeños de interferencia (siRNA) (Deng *et al.*, 2022). Los miRNA regulan negativamente la expresión de genes endógenos a través del corte de RNA mensajeros (mRNA) blanco, la represión de la traducción o la metilación del DNA, de esta forma controlan múltiples procesos del desarrollo de las plantas como: el desarrollo del meristemo, el establecimiento de la polaridad celular y los límites de los órganos laterales, el crecimiento de los órganos vegetativos y reproductivos y la formación de patrones foliares; así como respuestas al estrés abiótico y biótico (Li *et al.*, 2023).

La síntesis de los miRNA inicia por la transcripción de un gen MIR, cuyo transcrito primario (pri-miRNA) no codificante se pliega sobre sí mismo para formar una estructura secundaria de horquilla (tallo y asa) que luego se procesa por enzimas endonucleasas llamadas Dicer-like (DCL) en un transcrito precursor (pre-miRNA) más corto, para finalmente producir sRNA de 21 a 23 nt (**Figura 1.5**) (Ivanova *et al.*, 2022).

Por otro lado, los siRNA son moléculas de dsRNA de 21 a 24 nt que derivan de transcritos de doble cadena provenientes de diferentes orígenes, endógenos o exógenos (como los RNA virales) que se subdividen en varias categorías: 1) siRNA derivados de RNA endógenos activados por virus, de 21 y 22 nt (vasi-RNA); 2) sRNA de interferencia derivados de RNA virales (vsiRNA); 3) transcritos antisentido naturales (nat-siRNA) de 21 a 24 nt; 4) siRNA derivados de horquillas (hp-siRNA); 5) siRNA que actúan en *trans* (tasi-RNA), específicamente en factores de transcripción 6) siRNA en fase (phasi-iRNA), de 21 a 24 nt, activados por RNA endógenos derivados de un miRNA; 7) iRNA heterocromático (het-siRNA) de 24 nt, generado por DCL3; siRNA asociados epigenéticamente (easi-RNA) de 21 nt derivados de transposones, debido a la pérdida de metilación dependiente de RNA. Cada uno de estos tipos de siRNA tienen origen y vía de síntesis distinta, e involucran precursores y enzimas específicos (Pantaleo, *et al.*, 2021) (**Figura 1.5**). El RNAi tiene varios

componentes conservados: 1) regiones de dsRNA perfectos (apareamientos sin interrupciones o mismatches) o dsRNA imperfectos que son procesados por enzimas DCL en siRNA de 21 a 24 nt; 2) los siRNA se dirigen a la proteína Argonauta (AGO) para formar parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC); 3) los siRNA guían al complejo RISC para unirse de manera específica a los ácidos nucleicos para ejercer su función, ya sea en silenciamiento transcripcional (TGS) o postranscripcional (PTGS). El TGS interactúa con diversos componentes del genoma de las plantas, incluyendo genes y elementos transponibles para afectar la producción de transcritos. El PTGS actúa sobre transcritos blancos específicos a través de la complementariedad de secuencias, induciendo la degradación del mRNA. Este por lo general se dirige a mRNA endógenos e incluye a miRNA, tasi-RNA, nat-siRNA y phasi-RNA (Pantaleo, *et al.*, 2021).

Las proteínas Dicer-like (DCL) son actores clave que generan sRNA de diferentes longitudes, que varían de 21 a 26 nt. Por ejemplo, DCL1 produce miRNA de 21 y 22 nt, mientras que DCL2, DCL3 y DCL4 generan sRNA de 22, 24 y 21 nt, respectivamente, a partir de sustratos de RNA de doble cadena largos. La diversidad de las proteínas DCL contribuye a la especificidad de los RNA pequeños producidos (**Figura 1.5**) (Ivanova *et al.*, 2022).

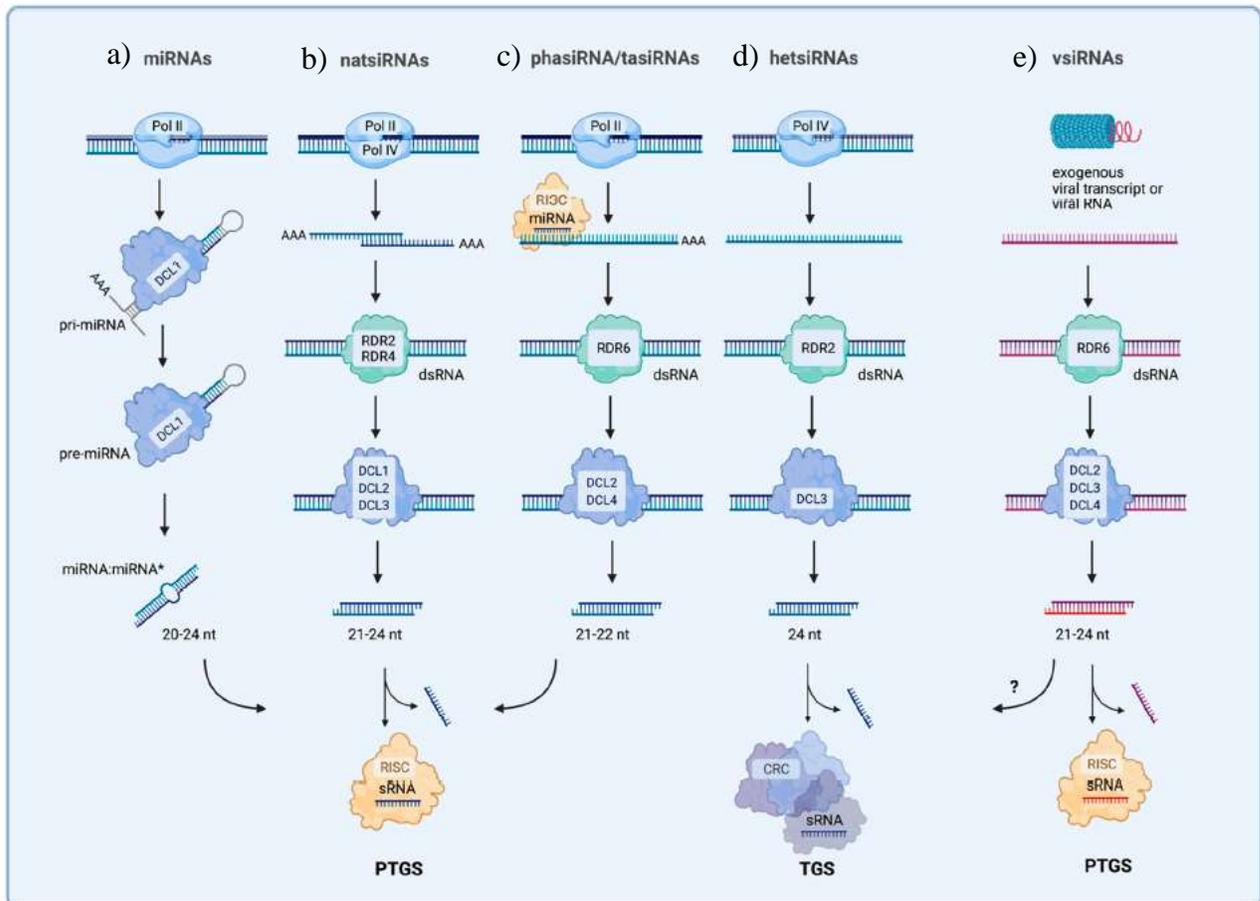


Figura 1.5. Esquema de la biogénesis de los RNA pequeños. Síntesis de **a)** miRNA a partir del gen MIR, **b)** iRNA que actúan a nivel postranscripcional, **c)** iRNA que son activados por miRNA **d)** iRNA que actúan en la heterocromatina, **e)** iRNA de interferencia virales a a partir de una doble cadena (Tomado de Ivanova *et al.*, 2022).

1.8 RNA de interferencia (iRNA) en la interacción planta-virus

Cuando un virus infecta una planta comienza su ciclo replicativo utilizando sus recursos metabólicos. Durante este proceso, las partículas virales se desplazan de célula u órgano a través de los plasmodesmos o tejidos del floema, lo que puede desencadenar una infección sistémica. En este momento se puede activar el proceso de iRNA viral como mecanismo de defensa de las plantas, para degradar los genomas virales, en el caso de virus con genomas de RNA, o para afectar la síntesis de los transcritos virales o degradar dichos transcritos (Pantaleon, *et al.*, 2021).

La maquinaria de defensa antiviral de las plantas se activa al detectar dsRNA virales, cuyo origen varía: 1) genomas virales de dsRNA, como los endornavirus o el fusagravirus, que incluyen al PMeV; 2) estados replicativos de virus con genomas de ssRNA, como los virus similares a *umbravirus* ; 4) productos de la transcripción bidireccional de genes sobrelapados (en sentido directo y antisentido), como en el caso de los geminivirus; 4) estructuras de RNA tipo horquillas o pseudonudos de genomas de virus de ssRNA; 5) dsRNAs producidos por una RNA polimerasa dependiente de RNA de la planta (RDR), al reconocer RNA virales. Una vez detectados los dsRNA virales, enzimas DCLs asociadas con enzimas DBRs para producir dsRNA de 21 a 24 nt llamados vsi-RNA primarios. Los dsRNA virales citoplásmicos (de los virus de genomas de RNA) son procesados por DCL 2 y 4, mientras que los dsRNA virales nucleares, derivados de virus genomas de DNA, son procesados por DCL1 y 3 (García-Ruiz *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2018; Incarbone *et al.*, 2013). Posteriormente los vsiRNA de cadena doble, se incorporan a AGO y al complejo RISC, donde se elimina la cadena pasajera, mientras que la cadena de RNA guía dirige al complejo RISC, para atacar el genoma o transcritos virales (Pantaleo, *et al.*, 2021).

Se han hecho numerosos trabajos para identificar miRNA y vsiRNA producidos durante la interacción planta virus, y así entender los mecanismos de defensa de la planta contra la infección viral. En papaya se han identificado previamente varios miRNA, que se describen en el siguiente apartado, pero no hay reportes de la identificación de vsiRNA en respuesta a la infección por virus.

Se ha reportado que combinaciones diferentes de virus y plantas pueden generar vsiRNA con características distintas, lo que puede conducir a la diferencia de síntomas. Los perfiles de vsiRNA cambian en diferentes plantas infectadas con el mismo virus. Por ejemplo, las características de los vsiRNA derivados de la infección del Virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) en *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana benthamiana* fueron significativamente diferentes (Milter *et al.*, 2013). También se ha visto que los vsiRNA presentan diferentes características en la misma especie de planta infectada con diferentes cepas de virus: por ejemplo, los perfiles de vsiRNA variaron entre las plantas de *Solanum tuberosum* infectadas con diferentes cepas del virus Y de la papa (PVY), probablemente debido a las diferentes respuestas al silenciamiento del RNA (Naveed, *et al.*, 2014).

1.9 microRNA en *C. papaya*

Diversos estudios han explorado el transcriptoma y la expresión génica de la papaya en diferentes tejidos y en respuesta a distintos estímulos. En 2007, se realizó un estudio para identificar genes expresados en las raíces de la papaya, con el fin de entender su función en el desarrollo y la defensa de la planta. Este estudio permitió identificar genes relacionados con la defensa contra patógenos, interacción planta-virus, estrés abiótico y desarrollo vegetal, así como RNA no codificantes y el precursor del miR162a, el primer microRNA identificado en la papaya (Porter *et al.*, 2007). En 2012, se identificaron 60 miRNA en papaya variedad SunUp, 24 conservados en otras especies vegetales y 36 nuevos específicos de papaya. Se encontró mayor acumulación de lecturas de 21 y 24 nt en hojas de plantas infectadas por PRSV que, en hojas sanas, así como mayor expresión de siete miRNA* en hojas infectadas (Aryal, *et al.*, 2012). En 2013, empleando secuenciación masiva, se identificaron 75 miRNA en papaya conservados en otras especies, de los cuales miR156 and miR535 se expresaron altamente en hojas de papaya. También identificaron 11 miRNA nuevos específicos de papaya y se predijeron los genes blanco, entre ellos el gene Argonauta 1, afectado por miR168 y miR530 (Liang *et al.*, 2013). En 2014, Abreu y colaboradores alinearon los 75 miRNA conocidos de papaya logrando identificar 72 familias, con 462 secuencias distintas, de los cuales seleccionaron 11 miRNA para análisis por qRT-PCR en hojas de plantas sanas e infectadas con el complejo PMeV/PMeV2 en Brasil. La expresión de miR164, miR172, miR396 y miR399, implicados en la respuesta a estrés biótico, aumentó en plantas infectadas. También se observó que miR162, miR398 y miR408, cuyos blancos regulan el proteasoma, incrementó en plantas con baja carga viral, pero disminuyó al incrementar la carga viral (Abreu *et al.*, 2014). En 2021, se realizó un estudio comparativo de sRNA durante la maduración de frutos en papaya, donde se identificaron 213 miRNA, de los cuales 44 eran miRNA conocidos y 169 eran nuevos (Cai, *et al.*, 2021). Finalmente, en 2022, se completó el ensamblaje del genoma de la papaya SunUp, lo que permitió la identificación de 90 nuevos microRNAs, pero estos no están disponibles en las bases de datos (Yue *et al.*, 2022). Aunque se conocen aproximadamente 213 miRNA identificados en el genoma de papaya, hasta ahora solo se ha elucidado la función de algunos de ellos. Esta información ha sido crucial para mejorar

nuestra comprensión de la regulación génica en la papaya y su relación con diversos procesos biológicos.

1.10 RNA largos no codificantes en virus

Los RNA largos no codificantes (lncRNA) representan una categoría de RNA con una longitud superior a 200 nt que no participan en la síntesis de proteínas. Están presentes en animales, plantas y levaduras, procariotas y virus. En plantas los lncRNA cuentan con una variedad de funciones, incluida la regulación postranscripcional y la infección con virus (Shrestha *et al.*, 2020). Durante la infección viral, se ha observado que la célula hospedera produce múltiples lncRNA como respuesta contra la infección. Paralelamente, los propios virus también generan lncRNA como parte de su estrategia para resistir la actividad antiviral celular (Liu *et al.*, 2017). También, se ha observado que los lncRNA son precursores de RNA pequeños que funcionan como reguladores negativos o positivos de la inmunidad de las plantas (Wang *et al.*, 2023).

1.11 Estructuras secundarias en regiones codificantes y no codificantes en *umbravirus* y virus similares a *umbravirus*

Los genomas de los *umbravirus* y virus similares a *umbravirus*, presentan señales (secuencias y estructuras de RNA) para llevar a cabo el desplazamiento del marco de lectura en un nucleótido y con esto, producir una proteína de fusión del ORF1 y el ORF2-1 (Liu *et al.*, 2021). Así mismo, existen otras estructuras secundarias en el genoma de estos virus, que pueden tener diversas funciones, por ejemplo, para la replicación del genoma viral y la traducción de sus proteínas (Liu *et al.*, 2021), tal como ocurre en el Virus de las enaciones de los chícharos (PEMV), un *umbravirus*, y en virus del género Carmovirus, ambos de la familia Tombusviridae (Panaviene, *et al.*, 2005). PMeV-Mx presenta estructuras secundarias en el extremo 3' terminal del PMeV-Mx, una horquilla denominada H5 que contiene 4 guanidinas (5'GGGG 3') en el bucle de la horquilla H5, la cual podría formar un Pseudonudo, denominado Ψ 1, al interactuar con cuatro citocinas (5'GGGG3') del extremo 3' terminal del genoma viral (Toriz-Bravo, 2022; Toriz-Bravo *et al.*, sometido) tal como ocurre en algunos miembros de los géneros *Umbravirus*, *Carmovirus* y

Tombusvirus (McCormack *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2021), en los cuales, estas estructuras están asociadas a la replicación (Panaviene *et al.*, 2003).

1.12 Secuenciación de nueva generación para la identificación de RNA pequeños

Hace 20 años, se lanzaron al mercado tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS). En la actualidad, es más preciso referirse a ello como secuenciación masiva, ya que han salido nuevas generaciones de secuenciadores que emplean diversas tecnologías simultáneamente. Entre ellas, se incluye la secuenciación por ligación (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) del equipo SOLiD, introducido al mercado en 2007 por Life Technologies y ahora discontinuado. Asimismo, destaca la secuenciación por síntesis y semiconducción del Ion Torrent. La secuenciación por síntesis en clusters de la empresa Solexa, más tarde adquirida por Illumina y en secuenciadores posteriores como el MiSeq o HiSeq desde 2011 (Maiden *et al.*, 2013). La secuenciación masiva por Illumina ha permitido la detección de una gran cantidad de sRNA involucrados en diversos procesos y funciones biológicas. El procedimiento implica aislar los sRNA del resto de moléculas biológicas presentes en las células y tejidos de las plantas, excluyendo incluso los RNA de alto peso molecular. Luego, se purifican y, mediante la unión de adaptadores de RNA, se preparan bibliotecas que implican la síntesis de DNA complementario (cDNA) y la unión de adaptadores, para la secuenciación masiva de toda la población de sRNA. Esta técnica de secuenciación permite identificar tanto sRNA previamente conocidos como nuevos, incluso si son escasos en cantidad. Después de aplicar las técnicas de análisis bioinformático a la población de sRNA, se pueden comparar y medir la cantidad en que un sRNA específico se acumuló con respecto a un control, de esta manera, se pueden identificar RNA pequeños con patrones de acumulación alterados debido al tratamiento (Payet *et al.*, 2023).

JUSTIFICACIÓN

El silenciamiento génico es un mecanismo para controlar procesos del desarrollo y defensa de las plantas contra patógenos, mediante el control de la expresión génica. Se caracteriza por la producción de sRNAs que tienen diversas funciones, pero que se clasifican en dos tipos principales, miRNA y siRNA. Se han reportado distintas especies virales asociadas a la meleira de la papaya, la cual ha adquirido relevancia a nivel global debido a sus síntomas agresivos que aparecen después de la floración, causando grandes pérdidas en los cultivos. La enfermedad en Brasil y Ecuador es causada por un complejo de dos virus; uno de genoma de dsRNA llamado PMeV y uno de genoma de ssRNA similar a *Umbravirus*, llamado PMeV2 en Brasil y PpVQ en Ecuador. En México, se ha identificado un genoma viral de ssRNA con 70% de identidad al PMeV2 y a PpVQ, denominado PMeV-Mx. Estos virus, denominados similares a *umbravirus*, se consideran especies distintas y contienen dos ORF seguidos de un RNA largo no codificante (lncRNA). Los lncRNA tienen la capacidad de formar estructuras secundarias en sus regiones no traducidas, lo cual puede inducir la síntesis de vsiRNA. A la fecha se han identificado 213 microRNA en papaya, de los cuales se han caracterizado 11 que participan en respuesta a la infección de papaya por el complejo PMeV/PMeV2. También se han identificado algunos miRNA asociados a la respuesta a PRSV en papaya de la variedad SunUp. Pero no se han hecho estudios de los perfiles globales de miRNA y siRNA, en respuesta a la infección por virus en papaya. En virtud de que los virus asociados a la meleira de la papaya en Ecuador, Brasil y México son distintos, y a que distintas cepas virales pueden producir distintos perfiles de sRNA en las plantas, es necesario hacer una caracterización completa de los sRNA producidos en respuesta a la meleira de la papaya. En este trabajo se buscó identificar y categorizar las distintas poblaciones de sRNA presentes en las hojas de *Carica papaya* var. *Maradol* en respuesta a la infección por PMeV-Mx, en la etapa de prefloración, a fin de identificar sRNAs endógenos que se expresen diferencialmente en plantas infectadas y sanas, así como sviRNA, como parte del mecanismo de defensa de las plantas de papaya. Estos estudios sentarán las bases de futuras estrategias de control de la enfermedad.

Preguntas de investigación:

1. ¿Qué RNAs pequeños se producen diferencialmente entre plantas sanas e infectadas con PMeV-Mx en hojas de *Carica papaya* var maradol en la etapa de prefloración?
2. ¿Qué regiones del genoma de PMeV-Mx son blanco del silenciamiento génico?

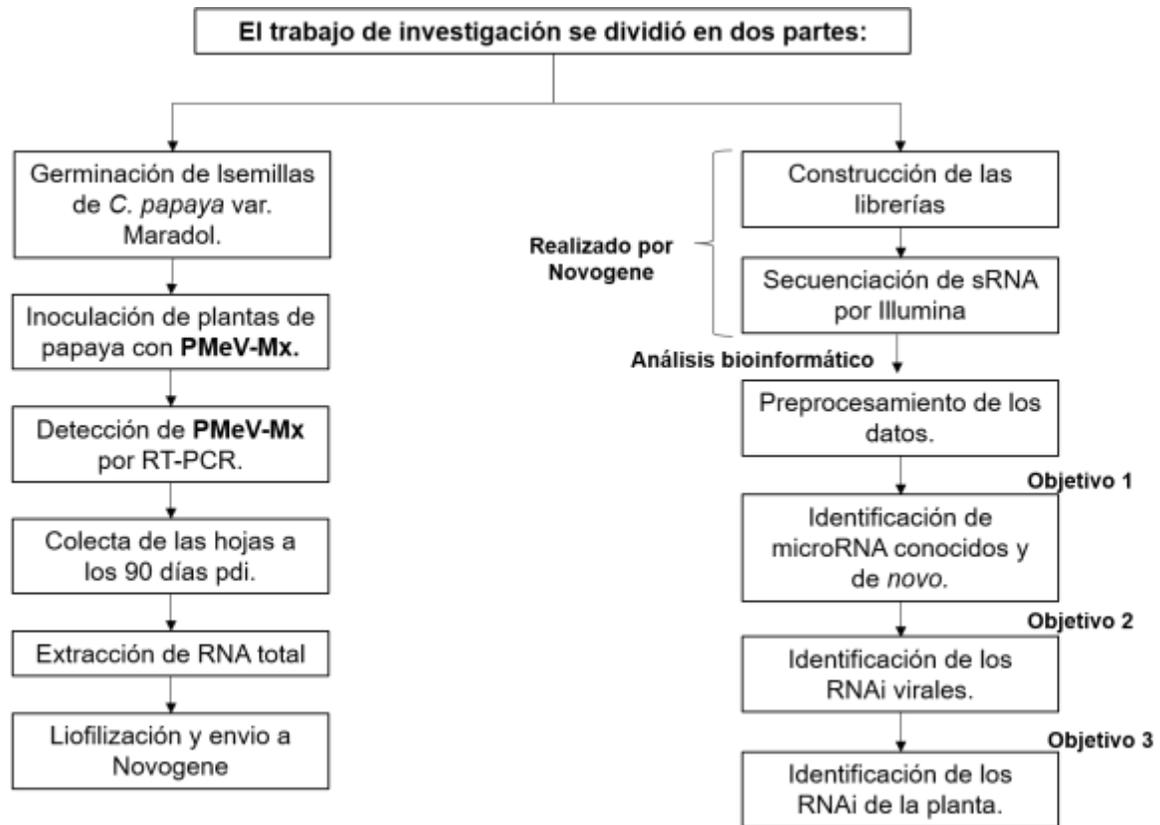
Objetivo general:

Identificar y categorizar las distintas poblaciones de RNAs pequeños en hojas de *Carica papaya* var. Maradol sanas e infectadas con PMeV-Mx en la etapa de prefloración.

Objetivos específicos:

1. Identificar los microRNA (miRNA) producidos en plantas de papaya infectadas con PMeV-Mx.
2. Identificar los RNA de interferencia (iRNA) producidos en plantas de papaya durante la infección con PMeV-Mx.
3. Determinar los RNA de interferencia virales (viRNA) derivados de PMeV-Mx durante el proceso de infección en plantas de papaya.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención del material vegetal

Se germinaron semillas de *C. papaya* var. Maradol en un invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. en jaulas con malla antiáfidos. Se les aplicó un tratamiento pre-germinativo que consistió en remojarlas en agua potable por 15 min, esto sirvió para eliminar la sarcotesta, posteriormente, en un matraz de 2 L se colocaron 30 semillas de papaya y se agregó 1 L de solución de KNO_3 (50 g/L), se puso en agitación constante para favorecer la oxigenación por un período de 48 -72 hrs a 30 °C, se realizaron decantaciones cada 24 hrs con solución nueva de KNO_3 , transcurrido ese tiempo se decantó la solución. Seguidamente se agregaron 100 mL de solución de GA_3 a 400 ppm (1 g/L) y se dejó incubar a 35°C por 2-3 hrs en agitación constante. Para el tratamiento germinativo, se decantó la solución de GA_3 y se colocaron las semillas en franelas húmedas (previamente esterilizadas) y se cubrieron con las mismas para mantener su temperatura. Las franelas con las semillas se colocaron en una cámara de germinación acondicionada de 30 a 35°C. En la cámara de germinación, cada 4 horas se humedecieron las franelas con un atomizador, evitando el exceso de humedad. Después del tercer día se supervisó la germinación de las semillas y aproximadamente a los 15 días se observó el inicio de la germinación. Para el trasplante a charolas, se colocó el sustrato húmedo Peat Most: agrolita (2:1) en las charolas de plástico (27 cm de ancho x 54 cm de largo y 5.5 cm de altura) de 50 cavidades, se procedió a trasplantar las semillas a los 15 días después de sembradas. Las charolas se mantuvieron a una temperatura de 30 ± 2 °C, 65 ± 2 % de humedad relativa y $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, hasta observar la presencia del par de hojas cotiledonarias. Seguidamente, las plantas al presentar 4 hojas verdaderas fueron trasplantadas a bolsas negras donde crecieron hasta los 2 meses en el invernadero.

2.2 Inoculación con PMeV-Mx

Como fuente de inóculo se utilizó látex de frutos inmaduros de plantas mantenidas en casa sombra positivas para PMeV-Mx. Para ello, fue importante lavar el fruto con detergente líquido, agua y una esponja suave, seguidamente se enjuagó el fruto con abundante agua

destilada. El látex se obtuvo mediante ralladuras en la superficie del fruto con un filo de bisturí estéril. En tubos cónicos de 15 mL se colectó el látex, por cada 1 mL de látex se diluyó en 1 mL de amortiguador de citrato de amonio 0.1 M (pH 6.5) se mezcló bien, para su posterior uso. Previo a la inoculación se hizo una dilución 1:1 con amortiguador de fosfatos pH6.0, como se reportó previamente (Zamudio-Moreno, *et al.*, 2015). Se inocularon plantas sanas de *C. papaya* L. var. Maradol inyectando 500 µL de la solución de látex/citrato de amonio/ Amortiguador de fosfatos en el meristemo apical de las plantas de plantas sanas, usando una jeringa estéril (insulina), en un cuarto de crecimiento del invernadero, que tenía una temperatura de 32°C ±2 °C. Como controles negativos (plantas sanas) se inocularon plantas únicamente con amortiguador de fosfatos pH 6,0. Se evaluó la presencia de PMeV-Mx en todas las plantas cada 7 días durante 20 días después de la inoculación.

2.3 Detección de PMeV-Mx por RT-PCR

Para verificar que las plantas se inocularon eficazmente con el PMeV-Mx, se realizó la detección mediante RT-PCR. Para ello, se colectó un fragmento de hoja cercano al sitio de la inoculación y se realizó la extracción del RNA total. Seguidamente se realizó la síntesis de cDNA utilizando 100 ng de RNA total y 2, tal como se describe en Zamudio Moreno *et al.*, 2015.

Tabla 2.1 Reactivos para la síntesis de la primera cadena

| Reactivos |
|--|
| 10 U de transcriptasa reversa murina (M-MuLV RT) |
| 50 ng de hexámeros al azar |
| Amortiguador 1X M-MuL V RT |
| dNTP 0.25 mM |
| Ditiotreitol 0.25 mM |
| RNAse OUT (invitrogene) |

Primer se incubaron a 95 °C por 5 minutos una mezcla con el RNA y el agua para eliminar la estructura secundaria y se transfirió inmediatamente a hielo. Se adicionaron los reactivos restantes y se incubó la reacción durante 1 h a 42 °C, posteriormente se detuvo la reacción incubando por 15 min a 70 °C, por último, se ajustó en un volumen a 50 µL. La primera cadena se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2.2. Reactivos para la mezcla en la detección por RT-PCR de PMeV-Mx

| Reactivos para la segunda cadena |
|---|
| Cebadores específicos 0.2 µM |
| 0.2 mM de dNTPs |
| 1.25 U de DNA polimerasa Taq NEBs |
| Amortiguador Thermo Pol 1X NEBs |
| 2µL de cDNA |

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el siguiente programa: 94°C por 4 min, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 52°-60°C durante 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 10 min a 72 °C.

2.4 Colecta de material biológico

A los 21 días después de la inoculación (dpi), se diagnosticó la eficiencia de la inoculación de PMeV-Mx en *C. papaya* var. Maradol. Por lo tanto, se procedió a trasplantarlas en camas de tierra en la casa sombra #3, cubierta con malla antiáfidos del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo condiciones lo más parecidas a campo. Se recolectó a los 90 dpi un grupo de tres hojas por planta sana e infectada, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido a y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.5 Extracción de RNA total

Se molieron 100 mg de cada hoja en un mortero con la ayuda de un pistilo, adicionando constantemente nitrógeno líquido para evitar la descongelación. El polvo fue transferido a un tubo de 2 mL, al que se le agregaron 800 µl de amortiguador CTAB junto con 20 µl de

β -mercaptoetanol. Se agitó vigorosamente en un vortex durante 30 segundos a velocidad máxima. Posteriormente, se incubó durante 15 minutos en un baño maría a 60°C, realizando agitación por inversión cada 2 minutos. Luego se agregó 650 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se dejó incubar durante 20 minutos a -20 °C. Después, se centrifugó a 13,200 rpm durante 20 minutos a 4°C, se agregó 450 mL de LiCl 7.5 M y se dejó incubar toda la noche a -80°C. Al día siguiente, se centrifugó a 13,500 rpm durante 40 minutos a 4°C para eliminar el sobrenadante. Luego se agregó 80 mL de agua ultrapura junto con 25 μ L de etanol al 75% y 10 μ L de acetato de sodio 3M a pH 5.2, se dejó incubar por 1 hora a -80°C. Posteriormente se centrifugó a 13,500 rpm durante 40 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se agregó 200 μ L de etanol al 75%. Se volvió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante. Por último, se re-suspendió la pastilla con 30 μ L de agua ultrapura.

2.6 Cuantificación y calidad del RNA total

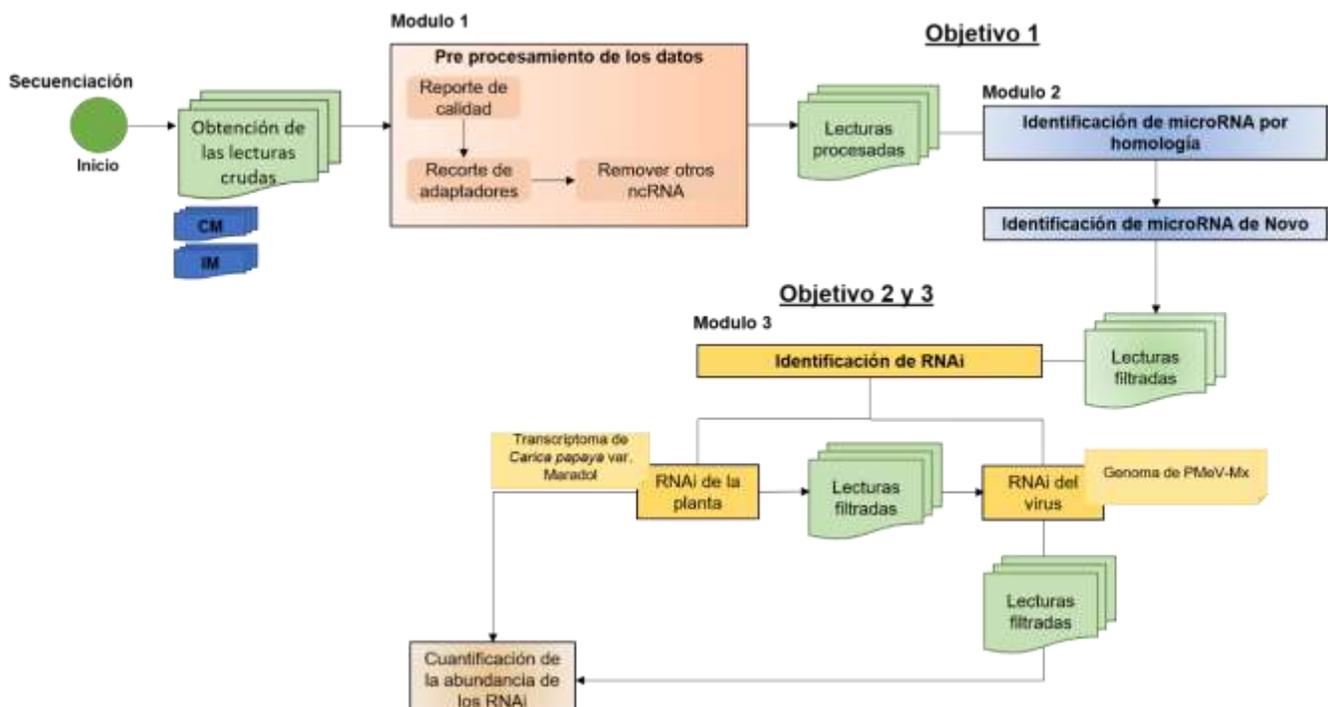
La concentración del RNA se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000. La integridad del RNA se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% cargando 5 μ L, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en una cámara digital de luz UV. La integridad del RNA total empleado para la síntesis de las bibliotecas de sRNA se evaluó empleando el ensayo Qubit Qubit RNA IQ, y el equipo del Dr. Jorge Santamaría en la UBT.

2.7 Secuenciación de los RNA pequeños de la muestra de hojas de *C. papaya*

Las muestras de RNA total extraído se enviaron a secuenciar a la compañía Novogene (sede Hong Kong, China) que utiliza la secuenciación de nueva generación (NGS) Illumina con la plataforma Miseq Benchtop Sequencer donde se obtuvieron secuencias de 50 pb. Es importante señalar que una vez verificada la calidad del RNA se juntaron los RNA de tres réplicas biológicas en un solo tubo, de acuerdo a su condición de planta sana o infectada. Y se procesaron de esta manera para la obtención de las bibliotecas que se nombraron como sanas e infectadas y su posterior secuenciación.

2.8 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de las secuencias se llevó a cabo utilizando el servidor en línea usegalaxy.eu (Afgan *et al.*, 2016). La pipeline constó de tres pasos o módulos: 1. Pre-procesamiento de los datos, para garantizar la calidad de las secuencias; 2. Identificación de microRNA por homología e identificación *de novo*; 3. Identificación de RNA de interferencia (iRNA) de origen viral y de planta. El siguiente diagrama se empleó para la identificación de los RNA pequeños.



2.9 Módulo 1: Pre-procesamiento

En el pre-procesamiento de las secuencias se eliminó la contaminación cruzada de secuencias que pudieran dar lugar a fragmentos de RNA que no son de interés. Para este módulo se empleó una metodología descrita por Freeberg (2017) y disponible en la plataforma de galaxy.eu. Los parámetros establecidos en esta metodología permanecieron por default. Se utilizó la herramienta Trim Galore (versión 0.67; Felix Krueger, 2012) para la identificación y recorte de los adaptadores. La herramienta filter FASTQ (versión 0.12.1; Andrews, 2010) se utilizó para ajustar las secuencias a longitudes comprendidas entre 18 y 29 nt. Con el alineador HISAT2 (versión 2.2.1; Kim *et al.*, 2015) se alinearon las secuencias con la base de datos Rfam (Griffiths-Jones *et al.*, 2003) (<https://rfam.xfam.org/>) para identificar y eliminar los RNA no codificantes (ncRNA) de no interés, como son RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA) y el RNA nucleolar (noRNA).

2.10 Identificación de microRNA por homología y *de novo* en Mirdeep2

Los miRNA fueron identificados utilizando el software MiRDeep2 (Mackowiak, 2011). El programa se basa en los siguientes criterios para identificar miRNAs:

1. Realiza la alineación de las lecturas con el genoma de referencia.
2. Verifica que el número de lecturas alineadas de miRNA maduro sea mayor a 10, ya que valores menores podrían deberse a errores en la secuenciación masiva.
3. Confirma que el resultado de RNAfold sea positivo ("yes"), lo que indica una alta probabilidad de plegamiento de la secuencia precursora del miRNA.
4. Consulta la base de datos miRBase (<https://www.mirbase.org/>) para verificar si las posibles secuencias de miRNA están reportadas. Las secuencias no encontradas se consideran como "nuevos miRNA" (miRNA de *novo*).

Las secuencias se mapearon al genoma de *C. papaya* var. Sun Up (CNCB Num. acceso *GWHBFSC00000000*; Yue *et al.*, 2022). Posteriormente, se utilizaron los 81 microRNA conocidos de *C. papaya* publicados en la base de datos miRBase (<https://www.mirbase.org/>) y 440 miRNA de diferentes especies. Se seleccionaron miRNA putativos cuya puntuación de calidad fue igual o mayor a 4. Los posibles precursores fueron seleccionados con base en el alineamiento al genoma, con al menos 10 lecturas alineadas en una región específica.

2.11 Determinación de los RNA de interferencia virales en la interacción de PMeV-Mx con *Carica papaya* var. Maradol

Para identificar de los RNA de interferencia virales (vsiRNA), se eligieron secuencias con longitudes comprendidas entre 20 nt y 26 nt, excluyendo aquellas que se identificaron como microRNA. Posteriormente, se realizó un alineamiento con el genoma completo de PMeV-Mx (GenBank, número de acceso MG680937; Toriz-Bravo *et al.*, sometido) mediante la herramienta bowtie2 (versión 2.5.0; Langmead *et al.*, 2009). el parámetro del mismatch en bowtie2 se consideró -N = 1, que permite un mismatch entre la lectura y la referencia, Los demás parámetros del alineamiento se mantuvieron con los parámetros establecidos por el alineador (**Tabla 2.3**). Para conocer la cobertura del alineamiento se utilizó la herramienta samtools coverage (versión 1.15.1 Li *et al.*, 2009)

2.12 Visualización del alineamiento de las secuencias sanas e infectadas alineadas a los genomas de *C. papaya* y PMeV-Mx

Para visualizar el alineamiento de las secuencias de siRNA con los genomas de ***C. papaya*** y **PMeV-Mx**, se utilizó el programa MISIS-2 (versión 2.1; Jonathan *et al.*, 2016), y el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson *et al.*, 2023).

2.13 Predicción teórica de las estructuras secundarias precursoras de los RNA de interferencia virales con presencia en las regiones ORF1, ORF2 y RNA largo no codificante de PMeV-Mx

Se realizó una predicción teórica de las estructuras secundarias de horquillas a partir de la identificación de las secuencias presentes en el ORF1, el ORF2 y el RNA largo no codificante de PMeV-Mx utilizando el servidor web Vienna RNA con la aplicación RNA fold

versión 2.6.3 (RNAfold Web server; Lorenz *et al.*, 2011). Se identificaron las estructuras secundarias de horquilla que contienen las secuencias de los RNA de interferencia y sus complementarios. El parámetro de la mínima energía libre para detectar una estructura secundaria (MFE, por sus siglas en inglés) se mantuvo con los valores por default, 37°C de la temperatura y 1.021 de la concentración molar(M).

2.14 Identificación de los RNA de interferencia de la planta en la interacción de PMeV-Mx con *Carica papaya* var. Maradol

Para identificar los RNA de interferencia producidos por la planta durante la infección por PMeV-Mx se utilizó la herramienta Filter FASTQ (Blankernberg *et al.*, 2010) para realizar un filtrado específico de secuencias de RNA de longitud entre 20 y 24 nucleótidos de las bibliotecas sanas e infectadas. Se excluyeron aquellas que se identificaron como RNA derivados de virus y microRNA., y se realizó un alineamiento al transcriptoma de *C. papaya* var. maradol (Chan-León, *et al.*, datos sin publicar) mediante la herramienta bowtie2 (versión 2.5.0; Langmead). Se consideró -N = 1, que permite un mismatch, mientras que los demás parámetros se corrieron con los valores pre-establecidos. (**Tabla 2.3**). Para estimar la abundancia de los iRNAs en plantas sanas e infectadas, se empleó la herramienta Express (versión 1.1.1; Roberts *et al.*, 2013). Para identificar los posibles blancos de los iRNAs, se realizó un análisis de Blastn en el servidor en línea NCBI (Sayer *et al.*, 2023).

Tabla 2.3 Parámetros predeterminados de bowtie2 para el alineamiento.

| Parámetro | valor |
|--------------|------------|
| -i | S,1,1.15 |
| --n-ceil | L,0,0,15 |
| --dpad | 15 |
| --gbar | 4 |
| --end-to-end | End to End |
| --score-min | L,0.6,-0.6 |

CAPITULO III RESULTADOS

Secuenciación de RNA pequeños y procesamiento de secuencias.

Las bibliotecas de las plantas sanas e infectadas que se descargaron de la plataforma de Novogene contienen un total de 11 mil millones y 15 mil millones de secuencias, respectivamente. La longitud de las secuencias en cada biblioteca es de 50 nt y tuvieron un valor de calidad de Phred arriba de 30. Las secuencias fueron limpiadas para eliminar adaptadores y, posteriormente, clasificadas por longitud, que de acuerdo al tamaño de los RNAs pequeños debe de ser entre 18 y 29 nt, (**Figura 3.1**). Una vez clasificadas las secuencias por tamaño, se eliminaron los RNA no codificantes (ncRNA) que no eran de interés (tRNA, rRNA, noRNA). Entonces, en el caso de la biblioteca de las plantas sanas, se conservaron un total de 6 millones de secuencias, mientras que para la biblioteca de las plantas infectadas se mantuvieron un total de 9 millones de secuencias (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1 Resultados de la secuenciación de RNA pequeños enviados por Novogene.

| Bibliotecas_ID | Total de lecturas (Millones) | %GC | Q | Longitud de secuencias (nt) |
|------------------------|---------------------------------|-----|----|--------------------------------|
| SpM | 11 | 53% | 36 | 50 |
| IpM _{PMeV-Mx} | 15 | 50% | 36 | 50 |

Tabla 3.2 Lecturas totales que se conservaron en las bibliotecas de plantas sanas e infectadas.

| Especie | ID biblioteca | Lecturas totales | Calidad de Phred |
|-----------------------------------|------------------------|------------------|------------------|
| C. papaya var. Maradol | SpM | 6,481,753 | 24 a 36 |
| C.papaya var. Maradol con PMeV-Mx | IpM _{PMeV-Mx} | 9,123,161 | 36 |

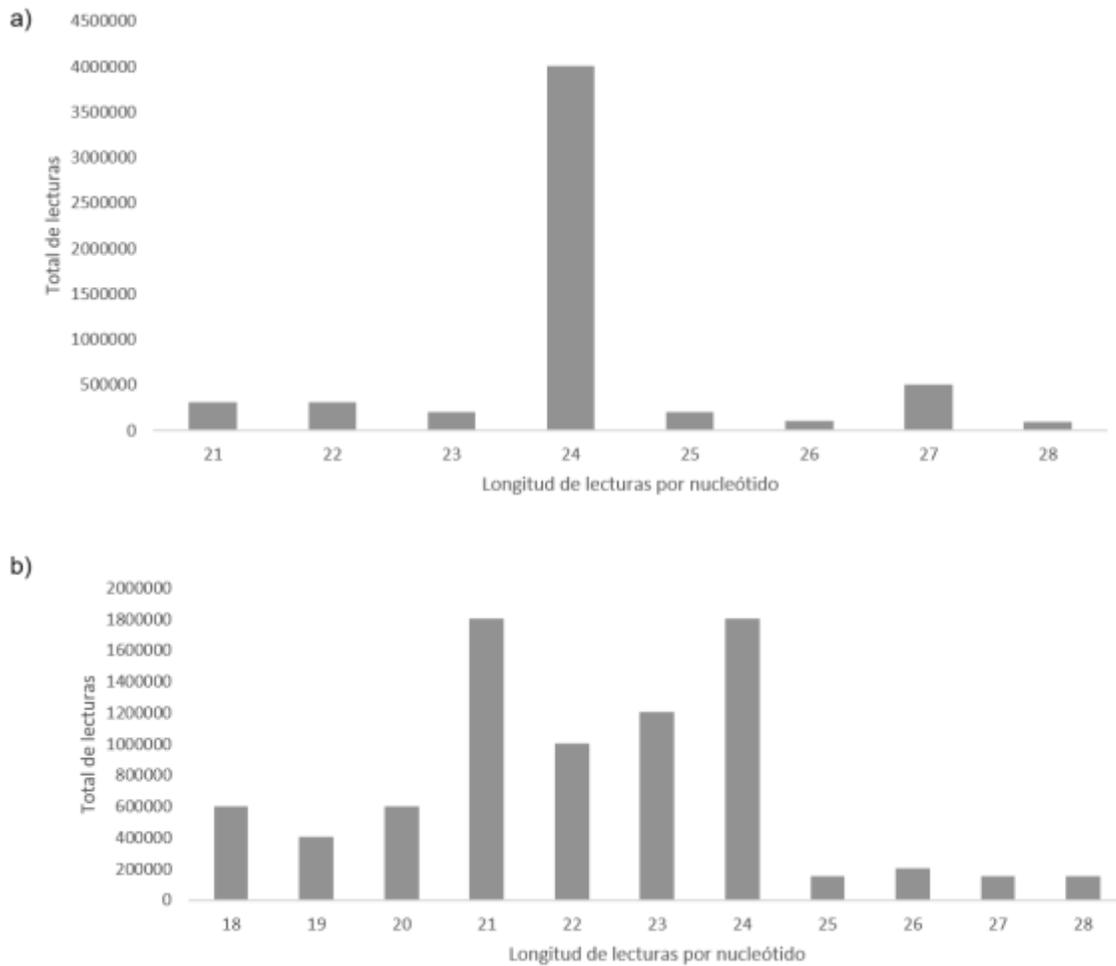


Figura 3.1. Abundancia de las lecturas en las bibliotecas de los RNAs por tamaño(nucleótido). a) Abundancia de la biblioteca de plantas sana por tamaño de nucleótido, b) abundancia de la biblioteca de plantas infectadas por tamaño de nucleótido

3.1 Resultados del alineamiento para identificar miRNA conocidos

En la **tabla 3.3**, se presentan los resultados que se obtuvieron en mirDeep2 de los miRNA conocidos en *C. papaya* y otras especies que se identificaron en las bibliotecas de las plantas sanas e infectadas. En total se usaron 521 miRNA conocidos. Como resultado, de los 521 miRNA conocidos en *C. papaya* se alinearon al genoma de *C. papaya* 234 miRNA para las plantas sanas y 259 miRNA para las plantas infectadas. De los miRNA conocidos que se alinearon al genoma de *C. papaya* se identificaron 93 miRNA conocidos en las muestras de las plantas sanas y 97 en las muestras de las plantas infectadas.

Tabla 3.3. Número de microRNA conocidos en plantas sanas e infectadas.

| Muestras | mirDeep2 score | Total de miRNA maduros conocidos | miRNA conocidos alineados en el genoma | miRNA identificados |
|------------|----------------|----------------------------------|--|---------------------|
| Sanas | 4 | 521 | 234 | 93(48%) |
| Infectadas | 4 | 521 | 259 | 97(50%) |

3.2 Identificación de los miRNA más abundantes en plantas sanas e infectadas en hojas de *C. papaya*

En la **tabla 3.4**, se muestran los miRNA más abundantes identificados tanto para plantas sanas como infectadas. En su mayoría son de 21 nt, a excepción de cpa_miRNA408 y cpa_miR408_isomir de 20 y 22 nt respectivamente. Se encontraron variaciones de un nucleótido con miRNA conocidos, por lo que se les añadió una letra como identificador (a,b,c, Etc). Así mismo se encontraron miRNAs provenientes de un mismo precursor, pero con variaciones de uno o dos nucleótidos, llamados “isomir”. La variante del miR398, con secuencia 3´ UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG 5´ (miR398a), fue la más representada en plantas sanas e infectadas, con 2,871,101 y 307,865 lecturas, respectivamente. Otra variante de este, miR398b, fue la segunda más representada con 530,650 lecturas en plantas sanas y 130 lecturas en plantas infectadas. El miRNA498 tiene como blanco putativo en papaya el gene 3201500, que codifica para la enzima superóxido dismutasa, que en *Arabidopsis* regula la homeostasis de cobre (Liang, *et al.*, 2013). El miR408 fue el

tercero más abundante en plantas sanas con 530,650 lecturas, también con una expresión diferencial mayor que en plantas infectadas, donde se encontraron 6,179 lecturas. El blanco predicho para este miRNA es el gene 16412738 que codifica para una lacasa en *C. papaya* (Liang, *et al.*, 2013). En las plantas, las lacasas participan en la lignificación y en la respuesta de defensa contra bacterias y hongos (revisado por Januz *et al.*, 2020). Después del mi398, los miRNA más abundantes en plantas infectadas fueron el miR166a y el miR159a, con 68,633 y 34,528 lecturas, respectivamente; si bien, estos fueron más abundantes en plantas infectadas respecto a las plantas sanas, estas diferencias no son muy grandes, por lo que no parecen ser significativas (**Tabla 3.3**). Por otro lado, se observa una clara expresión diferencial para miR162a, miR166d, y miR167d, cuya expresión fue mayor en las plantas infectadas con respecto a las plantas sanas, con diferencias de dos a tres veces el número de lecturas. Interesantemente, el miR162a tiene como objetivo la enzima DCL1 para regular la expresión de otros miRNA (Liang, *et al.*, 2013), mientras que la familia de los miR166 y el miARN167 regula factores de transcripción (Wang *et al.*, 2005). Por el contrario, miR408_isomir y miR398_isoMIRc resultaron más abundantes en plantas sanas que en plantas infectadas, con valores de 22,415 y 5415 respectivamente.

Tabla 3.3. miRNA más abundantes en plantas sanas e infectadas

| Familia | MicroRNA maduro | Secuencia | # nt | Abundancia | |
|---------|---------------------|-----------------------------------|---------|------------|------------|
| | | | | Sanas | Infectadas |
| 398* | cpa_miR398_isomir a | UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG | 21 | 2,871,101 | 307,865 |
| 398* | cpa_miR398_isomir b | UGUGUUCUCAGGUCGCCCCG ¹ | 21 | 530,650 | 130 |
| 408* | cpa_miR408 | CUGCACUGCCUCUCCUGGC | 21 | 49,549 | 6,179 |
| 166 | cpa_miR166a | UCGGACCAGGCUUCAUCCCC | 21 | 47,564 | 68,633 |
| 159 | cpa_miR159a | UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA | 21 | 22,415 | 34,528 |
| 408* | cpa_miR408_isomir | UGCACUGCCUCUCCUGGC | 20 | 9,979 | 1,247 |
| 162** | cpa_miR162a | UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG | 21 | 9,468 | 27,958 |
| 166** | cpa_miR166d | UCGGACCAGGCUUCAUCCCCG | 21 | 8,636 | 18,340 |
| 167** | cpa_miR167d | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGA | 22 | 5,217 | 14,321 |
| 398* | cpa_miR398_isomir c | UCGUGUGUUCUCAGGUCGCCC | 21 | 5,182 | 873 |
| 398 | cpa_miR398 | CUGCACUGCCUCUCCUGGC | 21 | 5,738 | 8,672 |
| 166 | cpa_miR166-5p | GGAAUGUUGUCUGGCUCGAGG | 21 | 6,935 | 7,627 |
| 166 | Cpa_miR166d_isomir | UCUCGGACCAGGCUUCAUCC | 21 | 4,457 | 7,517 |

* Expresión diferencial mayor en plantas sanas

** Expresión diferencial mayor en plantas infectadas

¹ Se indica en negritas el cambio de nucleótido

También se identificaron otros miRNA con baja abundancia, es decir con lecturas menores a 3,500, pero que presentaron expresión diferencial (**Tabla 3.4**). El miR477 y el miR8144, solo se encontraron en plantas infectadas, el primero con 155 lecturas y el segundo con 10, respectivamente. El miR477 ha sido implicado en la respuesta de defensa de las plantas de algodón contra el hongo *Verticillium dahliae* mediada por ácido salicílico (Hu *et al.*, 2020). Los miRNA miR167c, miR160d y miR390 si presentaron lecturas en plantas sanas, sin embargo, incrementaron su expresión hasta cuatro veces en plantas infectadas. El miR167 se ha involucrado en la respuesta a auxinas (Wang *et al.*, 2005). El miR390 se encontró en frutos de manzana durante el ataque del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Shi *et al.*, 2022) y al miARN160 regulando factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2005). El miARN477 regula la respuesta de defensa de la planta al influir en los niveles de ácido salicílico (Hu *et al.*, 2020).

Tabla 3.4 miRNA poco abundantes con mayor expresión en plantas infectadas

| Familia | MicroRNA maduro | Secuencia | # nt | Abundancia | |
|---------|-----------------|--------------------------|------|------------|------------|
| | | | | Sanas | Infectadas |
| 167 | cpa_miR167c | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU | 21 | 823 | 3339 |
| 477 | cpa_miR477 | AUUGGAGGACUUUGGGGAGC | 21 | 0 | 155 |
| 8144 | cpa_miR8144 | AACAGUAGAACGAGUUAGAAAGGA | 24 | 0 | 10 |
| 160 | Cpa-miR160d | UCGGACCAGGCUUCAUUC CGG | 21 | 397 | 1223 |
| 390 | Cpa_miR390 | AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC | 21 | 252 | 1150 |

3.3 Comparación de miRNA expresados en plantas de papaya con meleira en Brasil y México

Para determinar si se observa una expresión similar de los miRNA conocidos en plantas de papaya maradol infectadas con PMeV-Mx de este estudio y los 11 miRNA reportados previamente de papayas cultivar Golden en respuesta a la meleira de la papaya en Brasil, causada por el complejo PMeV/PMeV2 (Abreu, *et al.*, 2014; Sa-Antunes *et al.*, 2016), se anotan en la **Tabla 3.5** las lecturas encontradas en este trabajo para esos miRNAs, así como con los resultados de expresión por qRT-PCR de Abreu y colaboradores. De manera interesante, los miRNA 162a, 156a, 166a y 390a, aumentan su expresión en plantas infectadas con PMeV-Mx, con respecto a las plantas sanas (**Tabla 3.5**). Sin embargo, los resultados de ambos trabajos son muy contrastantes, únicamente el miRNA162a presentó expresión similar, con mayores niveles en plantas infectadas que en sanas (**Tabla 3.5**). Las plantas de papaya cultivar (cv) maradol, tanto sanas como infectadas, no expresan los miRNA 172c, 390a, 397a y 399f (**Tabla 3.5**), mientras que estos si se expresan en papayas cv golden de Brasil, en las cuales, la expresión de tres miRNA (156a, 390a y 397a) disminuye en plantas infectadas con respecto a las sanas, y la expresión de siete aumenta en plantas infectadas (162a, 408a, 398b, 164a, 172c, 396a y 399f) con respecto a las sanas (**Tabla 3.5**) (Abreu *et al.*, 2014). Otros resultados contrastantes son con los miR408, miR164a, miR398 y miR166a. Mientras que la expresión de los tres primeros disminuye en plantas maradol infectadas con PMeV-Mx, esta aumenta en plantas cv Golden en Brasil infectadas con el complejo PMeV/PMeV2. Así mismo, la expresión del miRNA166a aumenta en 4.5 veces en plantas de papaya cv. maradol infectadas con PMeV-Mx, pero esta permanece constante en plantas de papaya cv. Golden sanas e infectadas con el complejo PMeV/PMeV2 en Brasil (**Tabla 3.5**).

Tabla 3.5 miRNA en respuesta a la meleira de la papaya en plantas de Brasil y México

| miRNA | Secuencia | PMeV/PMeV2, qRT-PCR | | | | PMeV-Mx, lecturas | | Rol |
|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|------------|-----|
| | | sanas | cv ⁺ AS | cv ⁺⁺ AS | cv ⁺⁺⁺ AS | sanas | infectadas | |
| 162a ^{**} | UCGAUAAACCUCUGCAUCCAG | 1 | 1.5 | 0.3 | 1.2 | 9,468 | 27,958 | CP |
| 408 | CUGCACUGCCUCUJCCUGGC | 1 | 3.5 | 0.5 | 1.3 | 49,549 | 6,179 | CP |
| 156a ^{**} | UGACAGAAGAGAGUGAGCAC | 1 | 0.5 | 0.3 | 0.6 | 49 | 82 | CP |
| 398b | UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG | 1 | 10 | 3.5 | 3 | 2,871,101 | 307,865 | CP |
| 164a | UGGAGAAGCAGGGCAGGUGCA | 1 | 0 | 3.9 | 2 | 3 | 1 | RE |
| 166a ^{**} | UCGGACCAGGCUUCAUUC | 1 | 1 | 1 | 1 | 405 | 1134 | RE |
| 172c | GGAGCAUCAUCAAGAUUCACA | 1 | 1.5 | 3.5 | 3 | 0 | 0 | RE |
| 390a ^{**} | AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC | 1 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 252 | 1150 | RE |
| 396a | UUCACAGCUUUCUUGAACUG | 1 | 0.2 | 1.8 | 1.2 | 0 | 0 | RE |
| 397a | UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | RE |
| 399f | UGCCAAAGGAGAUUUGCCCGG | 1 | 0 | 5 | 0.8 | 0 | 0 | RE |

CP Control del proteasoma

RE Respuesta a estrés

CV+, CV++, CV+++ Carga viral baja, media y alta respectivamente

** Mayor expresión en plantas infectadas con PmeV-Mx que en plantas sanas, en este trabajo

3.4 Análisis de los miRNA *de novo*

Además de los miRNA previamente conocidos en papaya o en otras especies vegetales, también se identificaron algunos miRNA *de novo* putativos. En este análisis se utilizó el punto de corte de puntuación de 4, lo que sugiere un umbral de detección que garantiza una confiabilidad en secuencias que pueden ser candidatas como posibles nuevos miRNA. El programa estimó como verdaderos positivos 31 miRNA únicos en plantas sanas y 31 en infectadas, respectivamente. De estos solo 20 se expresaron ambas condiciones con abundancia baja (**Anexo 1**). Se seleccionaron los cinco miRNA putativos con mayor abundancia e identificados en ambas bibliotecas, como criterios de selección (**Tabla 3.6**). Estos son de 21 nt de largo, a excepción del miRNA_novo4, de 22. La secuencia con mayor expresión (3' UUUCGACUCUUGUGCUUGCAG 5') corresponde al miRNA_novo1 con 18,245 y 30,989 lecturas en plantas sanas e infectadas, respectivamente. Seguida de miRNA con abundancias que varían de 800 a 7000. De los cinco miRNA *de novo* putativos seleccionados, el miRNA_novo2 y miRNA_novo4 dos presentaron de tres a cuatro veces mayor expresión en plantas infectadas respecto a las plantas sanas, el resto tuvo un número

de lecturas mayor en plantas infectadas, pero no mayor del doble. Es importante considerar que los miRNA *de novo* putativos deben continuar caracterizándose experimentalmente, empleando métodos moleculares para descartar que no sean productos de degradación, e identificar su precursor (Friedlander, *et al.*, 2012).

Tabla 3.6 Abundancia de los miRNA *de novo* identificados por mirDeep2

| Código | Secuencia | # nt | Abundancia | |
|---------------|------------------------|------|------------|------------|
| | | | sanas | infectadas |
| miRNA_novo1** | UUUCGACUCUUGUGCUUGCAG | 21 | 18245 | 30989 |
| miRNA_novo2** | UUCGACUCUUGUGCUUGCAGA | 21 | 3756 | 7460 |
| miRNA_novo3** | GUUCAAUAAAGCUGUGGAAG | 21 | 2468 | 4015 |
| miRNA_novo4** | UUUCGACUCUUGUGCUUGCAGA | 22 | 2068 | 7001 |
| miRNA_novo5** | UUGCUGUCCAGAACUGUUUGA | 21 | 873 | 1103 |

** Expresión diferencial mayor en plantas infectadas

3.5 Identificación de los vsiRNA virales en la interacción *C. papaya* PMeV-Mx

Para identificar los vsiRNAs se realizó un alineamiento del genoma de PMeV-Mx, de las lecturas obtenidas de las plantas infectadas, previa eliminación de los productos de degradación putativos de RNA no codificante, como fragmentos de rRNA, snoRNAs, tRNAs, Etc. y de los miRNA identificados. Se alinearon 540,038 lecturas al genoma de PMeV-Mx (**Tabla 3.7**). Interesantemente, la mayoría de las lecturas se alineó al lncRNA (68%), el cual abarca el 43.5 % del genoma, mientras que el 32% de las lecturas se distribuyó en la región codificante (ORF1 y ORF2), el 5'UTR (posición 1- 10) y la región Intergénica de 246 nt (posición 974-1240). A continuación, se describen en mayor detalle los vsiRNAs identificados por regiones en el genoma de PMeV-Mx.

Tabla 3.7 Relación de lecturas alineadas a diferentes regiones del genoma de PMeV-Mx

| Región | posición | longitud nt | % del genoma | Número de lecturas | % de lecturas |
|--------------|---------------|-------------|--------------|--------------------|---------------|
| 5'UTR y ORF1 | 1-10 y 11-973 | 973 | 22.4 | 37,458 | 6.9 |
| Intergénica | 974-1240 | 266 | 6.4 | 26,646 | 4.93 |
| ORF2 | 1241-2446 | 1205 | 27.7 | 107,671 | 19.93 |
| 3'UTR/lncRNA | 2447-4346 | 1899 | 43.5 | 368,263 | 68.19 |

3.6 RNA de interferencia virales en el 5' ÚTR y el ORF1 de PMeV-Mx

Se alinearon 37,458 lecturas en la región del 5'UTR y el ORF1 de PMeV-Mx (posición 11 a 973) (Toriz-Bravo *et al.*, sometido), es decir, únicamente el 6.9 % de los vsiRNA, a pesar de esta región ocupa el 22% del genoma (**Tabla 3.7**). En la gráfica de la **Figura 3.2** se puede observar la distribución de los vsiRNA tanto en sentido directo como reverso. Si bien, los vsiRNA se localizan a lo largo del ORF1, se observan algunos picos que corresponden a los de mayor abundancia (**Figura 3.2**). El largo de los vsiRNA más abundantes en sentido directo fue de 22 nt con alrededor de 9,300 lecturas, seguidas de las 22 nt con 9000 lecturas y de las de 24 nt con alrededor de 3,000. Los vsiRNA más abundantes en sentido reverso fueron de 21 nt con 7,000 lecturas (**Figura 3.2**). De esto se desprende que los vsiRNA predominantes corresponden al sentido directo (**Figura 3.3**). Cabe destacar que no se detectaron vsiRNA en las posiciones 1 a 5, correspondiente a la primera mitad del 5'UTR. Sin embargo, se encontraron vsiRNA en la mayor parte del ORF1, excepto en las posiciones: 268 a 292, 308 a 313, 403 a 447, 810 a 823 y 854. A partir de la posición 6 se detectaron alineamientos de vsiRNA que continuaron a todo lo largo del ORF1, por lo general, con una abundancia menor a 10 lecturas en cada posición, con algunas excepciones. La secuencia de 22 nt que se ubica en la posición 18 en el ORF1 es la más abundante en el sentido directo, con un total de 3,904 lecturas. Sin embargo, también se presentó otro vsiRNA muy abundante de 22 nt en la posición 19, por eso se ven dos picos juntos en la **Figura 3.3**; la suma de ambos con secuencia 5'UUUCGAACAUUCCCGUGGGACGU 3' es de 6,292 lecturas (**Figura 3.4a**). Para el sentido reverso, en la posición 227 la secuencia 5'GGAGUUCAGUGGGUUGAGAAA 3' de 21 nt que fue la más abundante, con 1764 lecturas (**Figura 3.4b**). En las demás posiciones del ORF1 se identificaron vsiRNA con una abundancia inferior a las secuencias más representadas (**Anexo 2**).

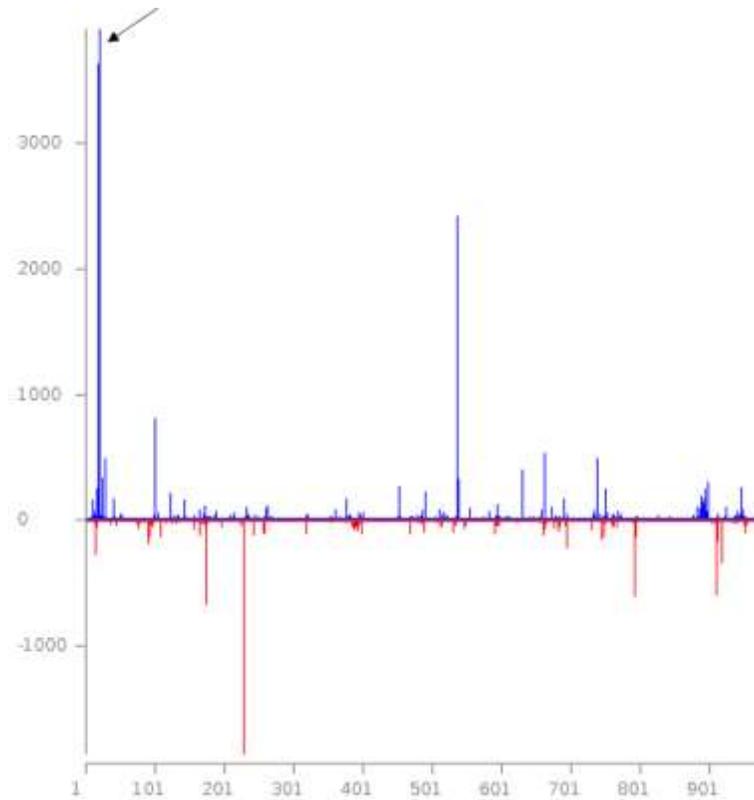


Figura 3.2 Diagrama de la distribución de los vsiRNA en el ORF1. Los vsiRNA de sentido directo y reverso son de color azul y rojo respectivamente. La flecha indica los dos vsiRNA de mayor abundancia sentido directo, posiciones 18 y 19.

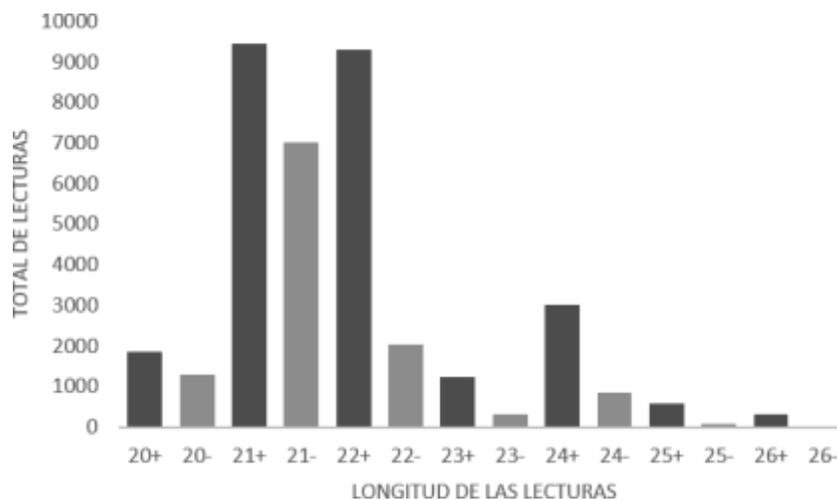


Figura 3.3 Distribución de la abundancia de los vsiRNA del ORF1 según su tamaño (en nucleótidos). Sentido directo (+) barras grises oscuro y sentido reverso (-) barras grises claro.

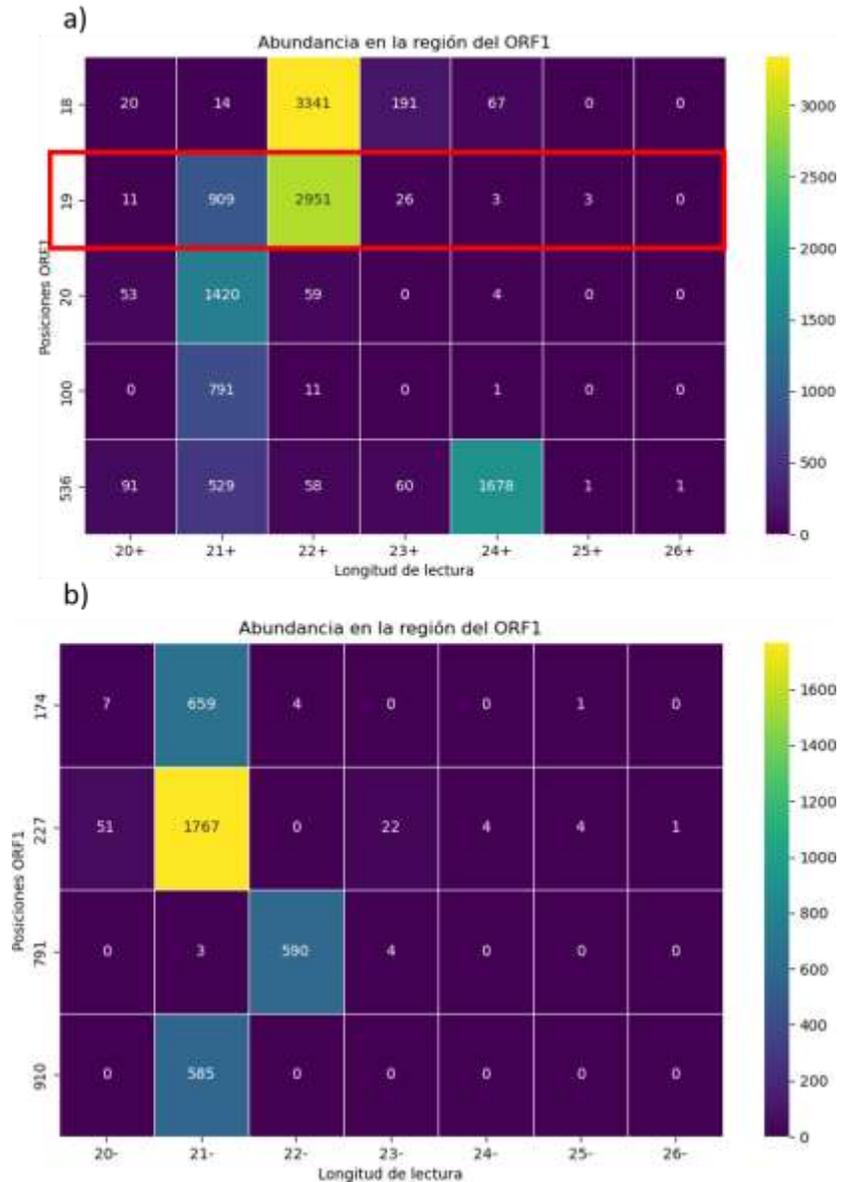


Figura 3.4 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el ORF1. a) Cantidad de lecturas en el sentido directo. Se marca con un recuadro rojo la posición 19 con el total de lecturas que hay en esa posición por la longitud en nt, esta posición es la que contiene mayor abundancia de lecturas en el ORF1 con un total de 3,903 y b) reverso. En el eje de las X se muestran la longitud en nt de los vsiRNA y en el eje Y las posiciones en el ORF1. El color morado intenso representa las lecturas menos abundantes y el amarillo las más abundantes.

3.7 Predicción de las estructuras secundarias que originan los vsiRNA más abundantes en el ORF1

Para determinar si los puntos calientes (hot spots) de producción de vsiRNA en la región del ORF1 del RNA genómico del PMeV-Mx son debidas a la presencia de estructura secundarias, se empleó el programa RNAfold (RNAfold web server) para la predicción de estructura secundaria. Se encontró una probabilidad significativa de plegamiento para formar dos estructuras de tallo y asa (horquillas) en la posición 1 a 52, entre las que se ubican los dos vsiRNA con mayor abundancia en sentido directo, con secuencia 5' UUUCGAACAUUCCCGUGGGACGU 3' en la posición 18 a la 40 (**Figura 3.5a**). Igualmente, el vsiRNA más abundante en sentido reverso, con secuencia 5' GGAGUUCAGUGGGUUGAGAAA 3' se ubicó en una región de estructura secundaria de dos horquillas, posición 201 a la 300, iniciando en la base, entre las dos horquillas y el lado izquierdo del tallo de la segunda horquilla, la cual contiene dos bucles intermedios (**Figura 3.5b**). También se encontraron 798 lecturas, asociadas al sitio resbaladizo para el cambio de marco de lectura de PMeV-Mx (**Figura 3.6**) (Toriz-Bravo, *et al.*, sometido), de las cuales, el vsiRNA de sentido reverso, de 24 nt, con secuencia 5' UCCUUUUCUGGUUGGCCCGUAAGU 3', fue el más abundante, con 269 lecturas (**Figura 3.6b**).

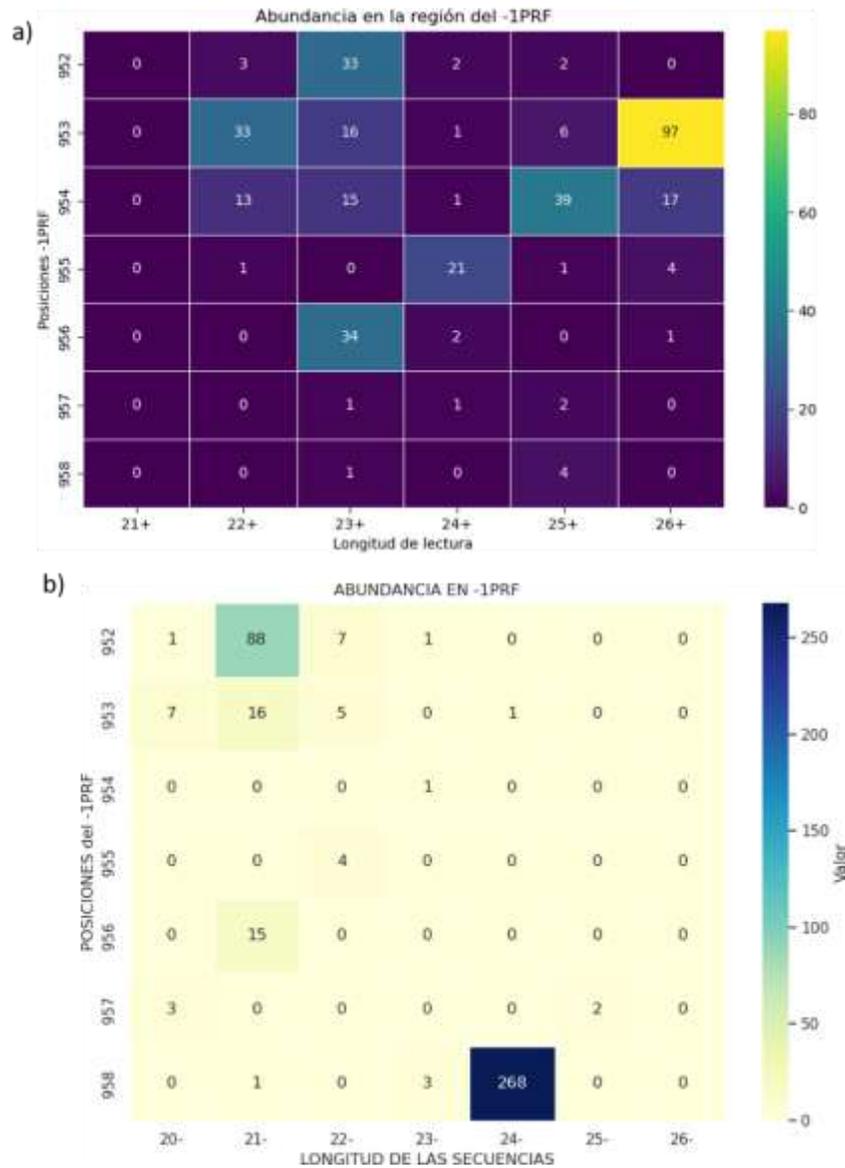


Figura 3.6 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el sitio resbaladizo -1PRF de PMeV-Mx. Cantidad de lecturas en el sentido directo, a) y sentido reverso, b). En el eje de las X se indica la longitud en nt y en el eje Y la posición en el genoma.

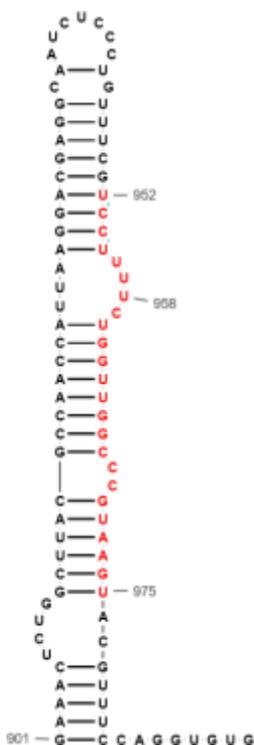


Figura 3.7 Estructura secundaria de horquilla que engloba el sitio resbaladizo putativo -1PRF de PMeV-Mx. La estructura comienza en la posición 901 y la secuencia del vsiRNA más abundante, de 24 nt, en posición 952 resaltada en rojo) (Toriz-Bravo *et al.*, sometido).

3.8 RNA de interferencia virales en la región Intergénica y el ORF2 de PMeV-Mx

En la región intergénica de PMeV-Mx, entre el ORF1 y ORF2 (posición 974 a 1240), se encontraron 26,643 lecturas (**Tabla 3.7**)(**Anexo 5**). El vsiRNA de sentido reverso, de 21 nt, con secuencia 5' CUUGUAUAGAGUUCACGAUAA 3', fue el más abundante, con 6,057 lecturas. Se detectaron 107,671 lecturas correspondientes a vsiRNA distribuidos en la mayor parte del ORF2 (**Figura 3.8**), que codifica la RdRP y que abarca de la posición 1241 -2446 del genoma de PMeV Mx. Los vsiRNA más abundantes son de 21 nt, tanto en sentido directo como reverso (**Figura 3.9**). Al igual que para el ORF1, hay posiciones del ORF2 que no produjeron vsiRNA (**Figura 3.8**). El vsiRNA más abundante se ubicó en la posición 1462, con 3846 lecturas y secuencia 3'GAGAUGUGGGGACGCUUUAGAGACCC5'; seguido de otro con secuencia 3'CUCUCACUUAUGAAUUCUUGAGCCGU5' en la posición 1743, con 3030 lecturas. El tercer vsiRNA más abundante, con 4356 lecturas, se presentó en la

posición 2154, con la secuencia 3'UGCUGUAUGACUGUGGGCUGGUUAGG5' (**Figura 3.10**). En el sentido indirecto, en la posición 2,002 del ORF2, hay una acumulación importante de vsiRNA, con 6,346 lecturas correspondientes a la secuencia 5'UCUCACCUACAUUGGUCCGAA3', de 22 nt, como se indica con una flecha en la **figura 3.8**. Sin embargo, existen otros vsiRNA en nucleótidos subsecuentes en sentido directo (**Figura 3.8, en rojo**), cuyas lecturas sumadas da un total de 9256 en la misma posición (**Figura 3.10b**). Otro vsiRNA sobresaliente en el ORF2, con secuencia 3'GAUGUUGAAGUUUACUCAUCGGAU5' presenta 4229 lecturas en posición 1540 y el vsiRNA en posición 1661, con secuencia 3'GGUCCUUUAAGUACACAGUCCGUGG5' presenta de 3408 lecturas. En las demás posiciones del ORF2 se identificaron RNA de interferencia virales con una abundancia inferior a las secuencias más significativa en el ORF2 (**Anexo 4**).

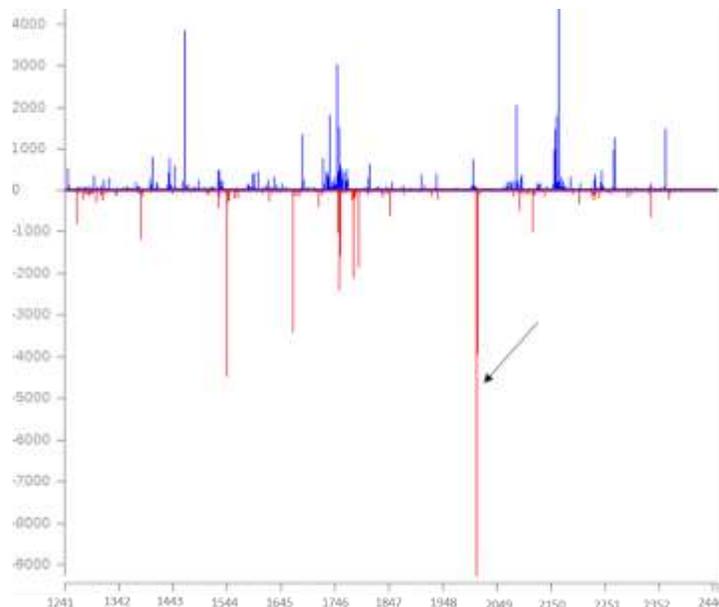


Figura 3.8 Distribución de las secuencias en la región ORF2. Sentido directo (azul) y sentido Reverso (rojo). La flecha indica la posición 2,002 donde inicia el vsiRNA más abundante en sentido reverso, con secuencia 5'UCUCACCUACAUUGGUCCGAA3'.

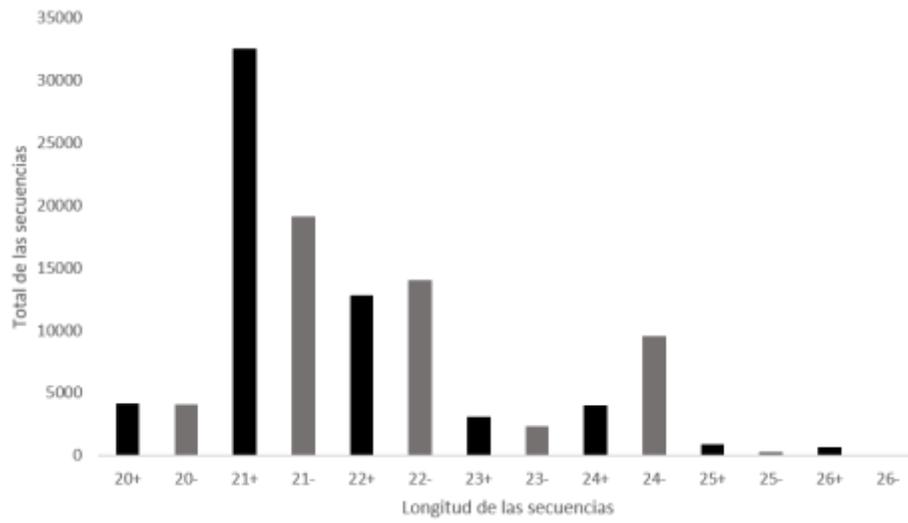


Figura 3.9 Distribución de la abundancia de los vsiRNA del ORF2 según su tamaño (nucleótidos). Sentido directo (+) barras grises oscuro y sentido reverso (-) barras grises claro.

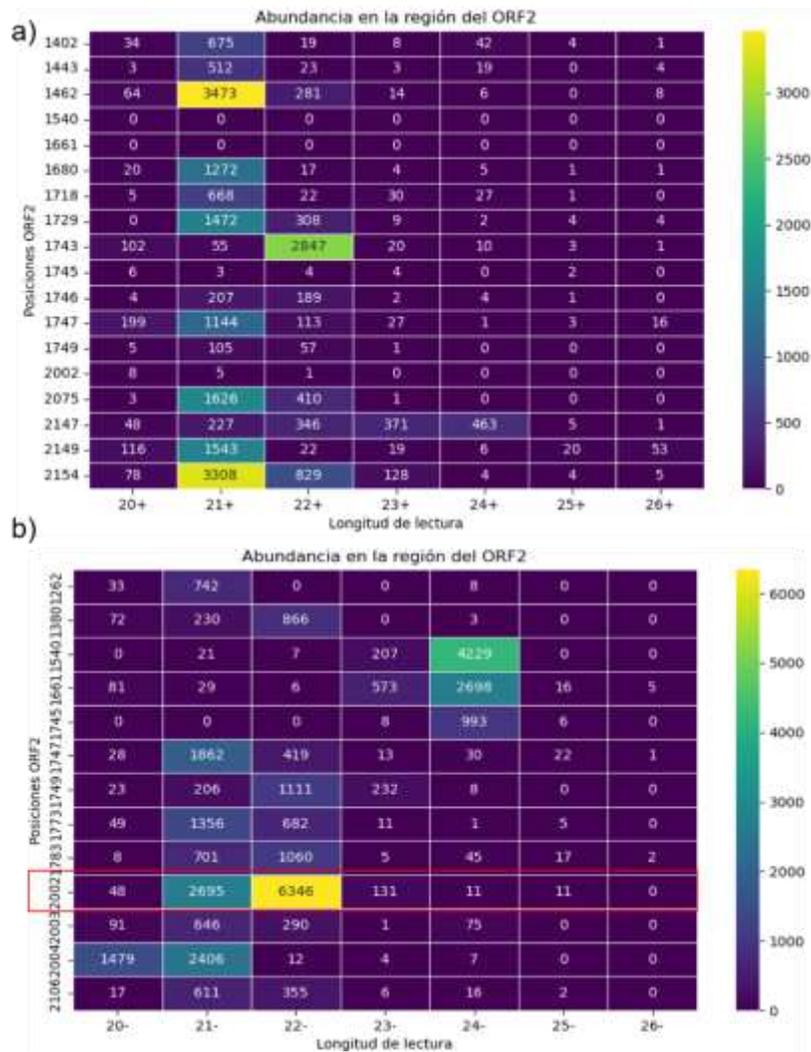


Figura 3.10 Mapa de calor de los vsiRNA más abundantes en el ORF2 de PMeV-Mx. a) Lecturas en sentido directo y b) sentido reverso. En el eje de las x, la longitud en nucleótidos y en el eje de las y, la posiciones en el genoma de PMeV-Mx. El total de las lecturas sumadas corresponde a las abundancias por longitud en nucleótidos.

3.9 vsiRNA sobresalientes en horquillas putativas en el ORF2 de PMeV-Mx

Para determinar si los vsiRNA identificados en el ORF2, se generan por la formación de dsRNA generado por estructura secundaria del RNA de PMeV-Mx, se hicieron predicciones de estructura secundaria empleando el programa RNAfold (RNAfold web server). Se identificó un vsiRNA muy abundante en sentido directo con 3,865 lecturas y secuencia 5´UGAGAUGUGGGGACGCUUUAG 3´ de 21 nt que corresponde a una horquilla en posición 1462-1482 (**Figura 3.11a**). En el sentido reverso, la estructura secundaria de horquilla más representativa abarca la posición 2002-2023 en la cual se ubicó el vsiRNA con secuencia 5´ UCUCACCUACAUUGGUCCGAAA 3´ de 22 nt (**Figura 3.11b**).

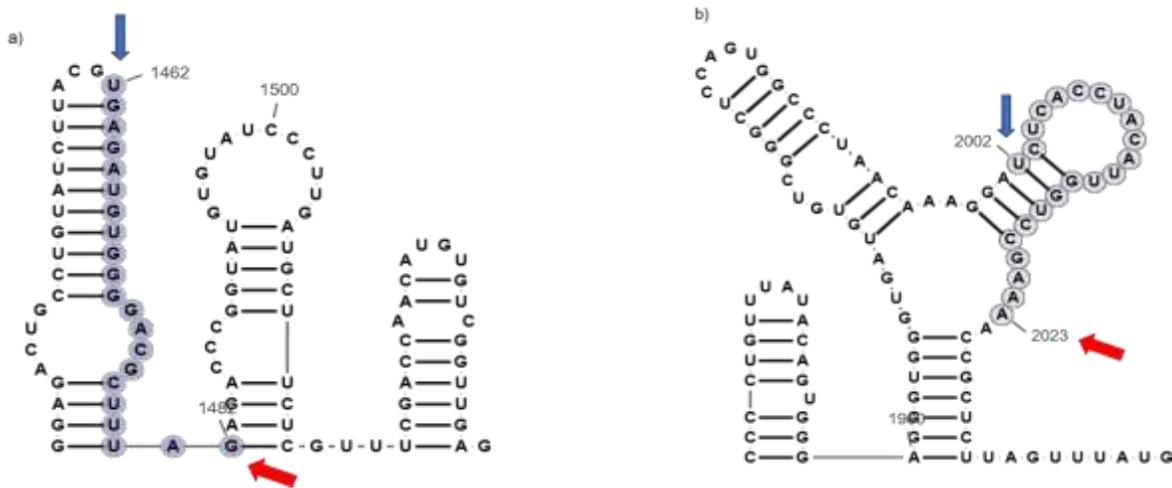


Figura 3.11 Estructuras secundarias de dsRNA con los vsiRNA más predominantes en el ORF2. a) Secuencia en sentido directo: 5'UGAGAUGUGGGGACGCUUUAG 3'. b) Secuencia en sentido reverso: 5'UCUCACCUACAUUGGUCCGAAA 3'. Se señala el inicio del vsiRNA en sentido directo (5') y reverso (3') con flechas azules y rojas, respectivamente.

3.10 RNA de interferencia virales en el RNA largo no codificante de PMeV-Mx

Se lograron identificar 368,263 lecturas alineadas al RNA largo no codificante (lncRNA) de PMeV-Mx, que abarca de la posición 2446 a 4346 (**Anexo 6**), 3.5 veces más que para la región codificante (ORF1 y ORF2), a pesar de que el lncRNA constituye el 43 % del genoma de PMeV-Mx. A partir de la posición 2448, es decir al inicio del lncRNA, se detectaron vsiRNA, aunque con una abundancia menor a 10 lecturas en cada posición. A pesar de que en la mayor parte del lncRNA se generaron vsiRNA, en las siguientes regiones no se detectaron: 2521 a 2599, 2615 a 2632, 2680 a 2702, 2722 a 2803, 2882 a 2902, 2905 a 2975, 3020 a 3123, 3262 a 3265, 3269 a 3373, 4216 a la 4286 y de la 4308 a la 4346.

En la región proximal del lncRNA se observan dos picos correspondientes a los vsiRNA de sentido directo, posiciones 2514 y 2662 (**Figura 3.12**), que corresponden a vsiRNAs de 21 nt, con secuencias 3'UUAUUGAUCUGCUGUAUUCUU 5' y 3'UUAACUGGCAGCUGUAAUGGC 5', respectivamente. La primera fue la más abundante, con 12,347 lecturas (**Figura 3.14a**). Los vsiRNA en sentido directo son en su mayoría de 21 nt y en sentido indirecto de 22 nt (**Figura 3.13**). Aunque la mayor parte de las lecturas encontradas en el lncRNA corresponden al sentido indirecto (**Figuras 3.12 y 3.13**). En la **figura 3.12** se observan dos picos muy grandes en sentido reverso, uno en posición 3,539 y otro en posición 3663. El vsiRNA de 22 nt que se ubica en posición 3539,

con secuencia 5' GCACAUUAUUGAACAGACAUUG 3' es el más abundante en el sentido reverso, con un total de 88,875 lecturas. Sin embargo, la suma de todas las lecturas en sentido reverso en esa posición da un total de 183,464, ya que se encontraron secuencias similares que inician en esas posiciones, pero de 20 y 21 nt, que también están muy representadas (**Figura 3.14b**). Esto corresponde al 23% de las lecturas del lncRNA. El segundo vsiRNA más abundante en sentido reverso, con 47609 lecturas, inicia en posición 3663, con secuencia 3' GAUAAGCGUAUUUUCAGUCGUA 5'.

De manera interesante, a partir de la posición 4308 y hasta el extremo 3' terminal (posición 4346), no se encontraron vsiRNA, aunque previamente se identificó en PMeV-Mx una estructura secundaria formada por cuatro horquillas que inician en la posición 4,283 del lncRNA que esta conservada en *Carmovirus*, en los cuales participa como promotor de la replicación, para la formación de la cadena complementaria de ssRNA (Toriz-Bravo, 2021), (Toriz-Bravo, et al. Sometido) (**Anexo 3**).

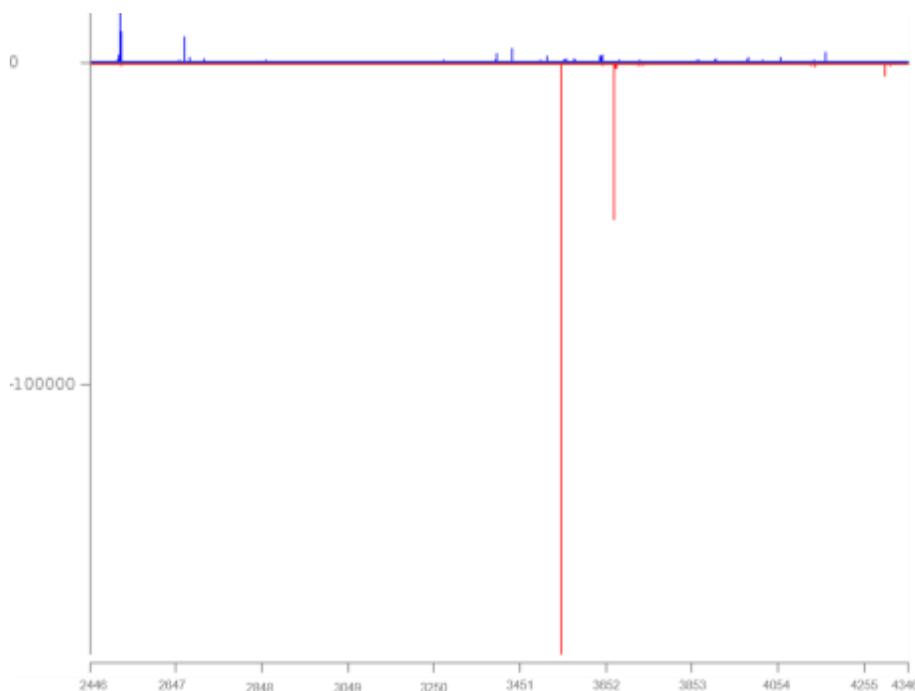


Figura 3.12 Distribución de los vsiRNA en el lncRNA. Sentido directo (azul) y sentido Reverso (rojo).

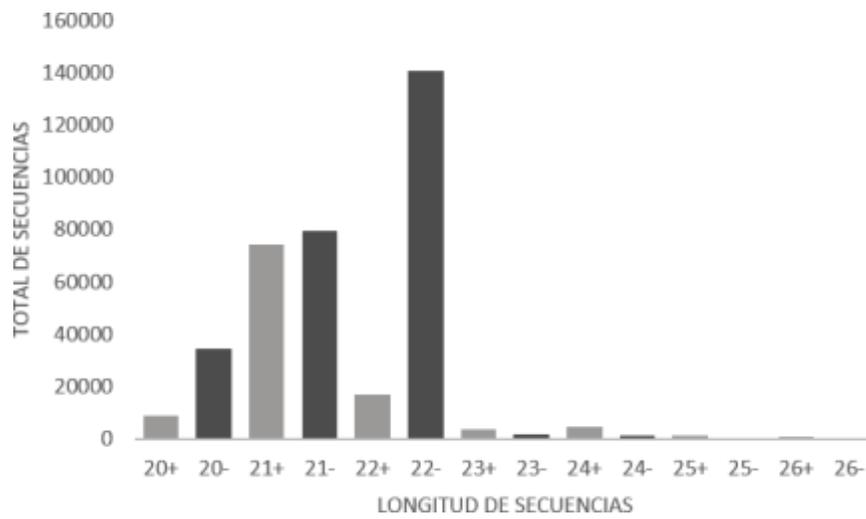


Figura 3.13 Abundancia de vsRNA e lncRNA de PMeV-Mx por tamaño (en nucleótidos). vsRNA en el sentido directo (+, barras gris claro) y en sentido reverso (-, barras gris oscuro)

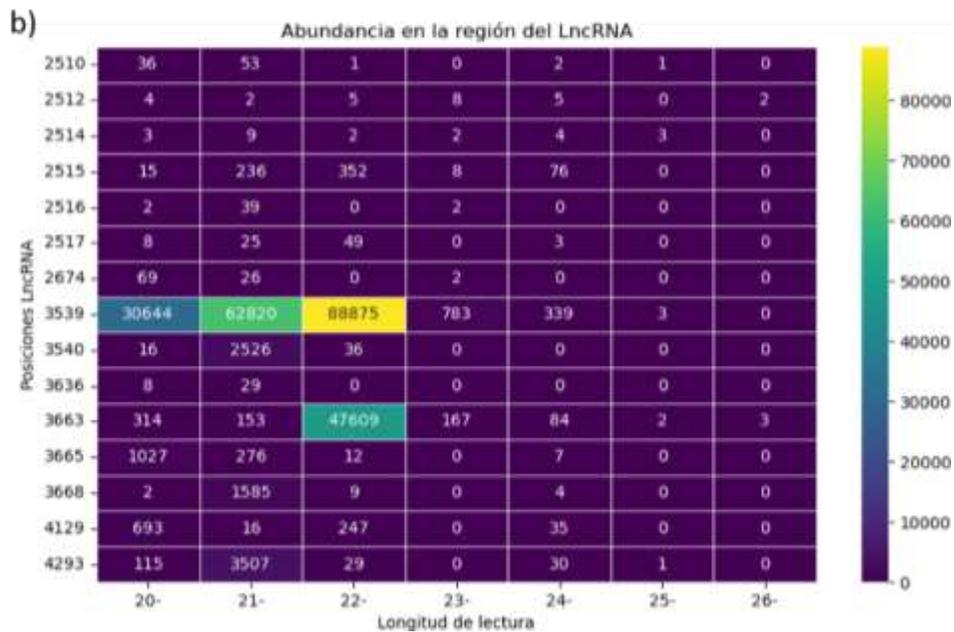
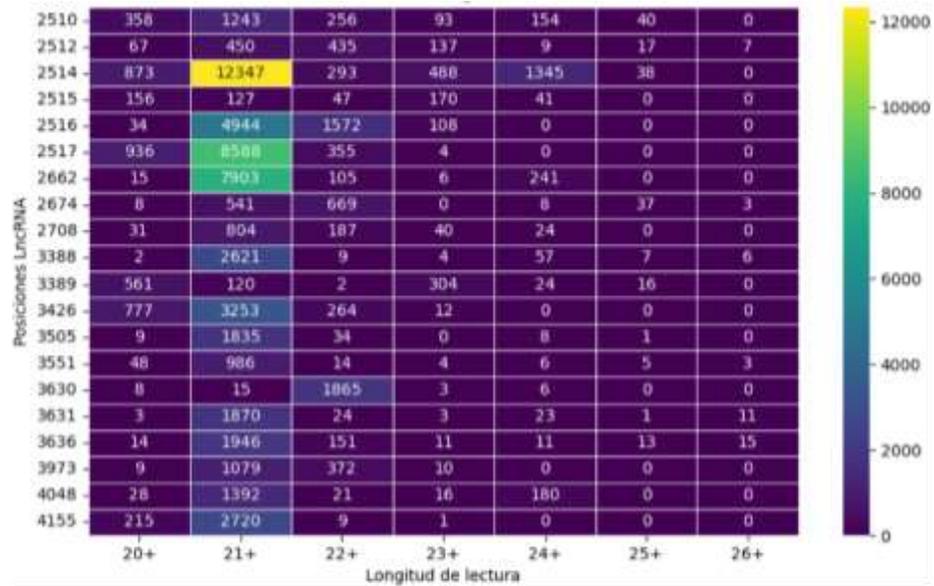


Figura 3.14 Mapa de calor de los vsiRNA más representados en el lncRNA de PMeV-Mx. a) Sentido directo y b) Sentido reverso. En el eje de las X, la longitud de los vsiRNA en nucleótidos. Eje de las Y, posiciones en el genoma del PMeV-Mx.

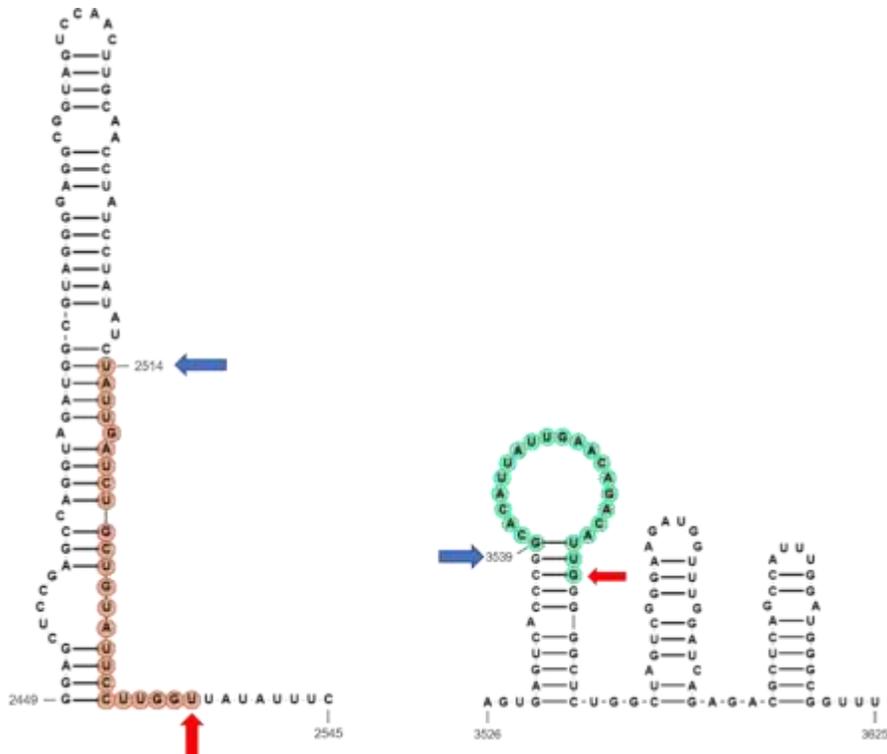


Figura 3.15 Estructuras secundarias de horquilla con las secuencias más predominantes en el lncRNA. a) Secuencia en sentido directo: 5'UAUUGAUCUGCUGUAUUCUUGGU 3'. b) Secuencia en sentido reverso: 5'GCACAUUAUUGAACAGACAUUG 3'. Se señala el sentido 5' con una flecha azul y el sentido 3' con una flecha roja.

3.11 RNA de interferencia endógenos en plantas sanas e infectadas de *C. papaya* var. Maradol

Para identificar los siRNAs se realizó un alineamiento de las lecturas de sRNA de plantas sanas e infectadas, previa eliminación de los vsiRNA identificados, con los transcriptomas de plantas sanas y de plantas infectadas de *C. papaya* (Chan-Leon *et al.*, datos sin publicar). De un total de 2,000,449 de lecturas de sRNA de plantas sanas, el 74%, es decir 1,283,801 lecturas se alinearon al transcriptoma de plantas sanas (**Tabla 3.8**). El 4.11% (82,300 lecturas) se alinearon exactamente una vez al transcriptoma y el 60.06% (1,201,501 lecturas) se alinearon múltiples veces (**Tabla 3.8**). En el caso de las plantas infectadas, de un total de 2,099,893 de lecturas de sRNA, el 62.1% se alineó al transcriptoma de plantas infectadas, el 2.98% (166,659 lecturas) se alineó solo una vez y el 59.43% (3,320,407 lecturas) lo hizo múltiples veces (**Tabla 3.9**). La alineación única sugiere la presencia de siRNAs únicos en la muestra. Por otro lado, la alineación múltiple puede atribuirse a las

isoformas generadas por el ensamblado *de novo* del transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol, las cuales pueden compartir regiones de homología o ser parcialmente redundantes. Además, la alineación múltiple también puede indicar la presencia de secuencias repetidas o altamente conservadas en el genoma. Se observó una mayor abundancia de siRNA endógenos en plantas sanas e infectadas con lecturas de 21 nt y 23 nt de longitud por nucleótidos, respectivamente (**Figura 3.16**).

Tabla 3.9. Relación de lecturas de sRNA alineadas a los transcriptomas de *C. papaya* de plantas sanas e infectadas

| Bibliotecas | Lecturas totales | Lecturas no alineadas | Lecturas alineadas una vez | Lecturas alineadas múltiples veces |
|-------------|------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Sanas | 2,000,449 | 716,648 (35.82%) | 82,300 (4.11%) | 1,201,501 (60.06%) |
| Infectadas | 5,586,959 | 2,099,893 (37.59%) | 166,659 (2.98%) | 3,320,407 (59.43%) |

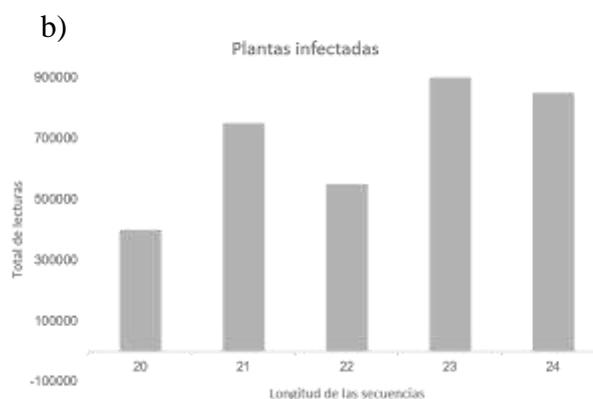
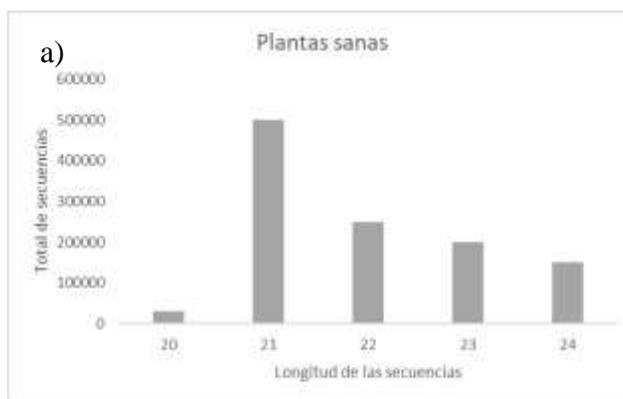


Figura 3.16 Abundancia de siRNA alineados al transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol por tamaño (en nucleótidos). a) siRNA de plantas sanas b) siRNA de plantas infectadas.

3.12 Abundancia y blancos putativos de los siRNA en el transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol

Después de alinear los reads al transcriptoma ensamblado de novo de papaya maradol, se identificaron los posibles transcritos blancos. Se seleccionaron los top nueve transcritos que tuvieron mayor cantidad de reads alineados, es decir, mayor cantidad de siRNA para su análisis con BLAST. En plantas sanas, el contig TRINITY_DN5449_c0_g1_i10_len=6958 tuvo un total de 90,585 lecturas, que codifica para una proteína hipotética Lal.00045043. Seguido de los contigs con mayor abundancia TRINITY_DN461_c0_g1_i4_len=5473, TRINITY_DN2267_c0_g1_i1_len=1034, TRINITY_DN5573_c0_g1_i5_len=3919, TRINITY_DN5573_c0_g1_i1_len=3238, TRINITY_DN5573_c0_g1_i4_len=3775, TRINITY_DN2267_c0_g1_i2_len=2225, con una abundancia de 89551, 76517, 68599, 32692, 20481, 20239, 19810, 14747, respectivamente. Entre los resultados obtenidos del alineamiento con Blastn para estos contigs, se encontró que, en plantas sanas, los siRNA se alineaban a proteínas hipotéticas y a proteínas conocidas como la subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa, la subunidad 2 de la NADH-plastoquinona oxidoreductasa y factores de elongación de la transcripción. Estas proteínas están conservadas en especies como *Lupinus albus*, *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*, *Aristolochia fimbriata*, *Carica papaya*, *Plukenetia volubilis*, y *Carya illinoensis*. (**Tabla 3.10**)

En contraste, en plantas infectadas, el contig TRINITY_DN760_c0_g1_i17_len=5941, con un total de 642,105 lecturas, que codifica para una proteína hipotética H6P81_0000002. Los restantes ocho contigs Más abundantes TRINITY_DN760_c0_g1_i15_len=7136, TRINITY_DN5292_c0_g1_i11_len=6474, TRINITY_DN5292_c0_g1_i9_len=6482, TRINITY_DN5292_c0_g1_i3_len=5840, TRINITY_DN5292_c0_g1_i2_len=5446, TRINITY_DN760_c0_g1_i7_len=1308, TRINITY_DN2393_c0_g2_i8_len=5900. Estos contigs se alineaban a genes con proteínas hipotéticas en diferentes especies vegetales, como *Aristolochia fimbriata*, *Lupinus albus*, *Cichorium intybus*, *Prunus armeniaca*, *Solanum commersonii*, y *Plukenetia volubilis*, a excepción del contig

TRINITY_DN2393_c0_g2_i8_len=5900 que tuvo como proteína a la subunidad 2 de la NADH-plastoquinona deshidrogenasa. (Tabla 3.11)

Tabla 3.10 Relación de la abundancia de los contig en plantas sanas y sus blancos putativos.

| Contig plantas Sanas | Abundancia | Blanco putativo |
|------------------------------------|------------|--|
| TRINITY_DN5449_c0_g1_i10_len=6958_ | 90585 | hypothetical protein Lal_00045043 [Lupinus albus] |
| TRINITY_DN5449_c0_g1_i6_len=7014_ | 89551 | NADH dehydrogenase subunit 2 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] |
| TRINITY_DN461_c0_g1_i9_len=7612_ | 76517 | hypothetical protein H6P81_000002 [Aristolochia fimbriata] |
| TRINITY_DN461_c0_g1_i4_len=5473_ | 68599 | hypothetical protein H6P81_000002 [Aristolochia fimbriata] |
| TRINITY_DN2267_c0_g1_i1_len=1034_ | 32692 | transcription elongation factor TFIIIS-like [Carica papaya] |
| TRINITY_DN5573_c0_g1_i5_len=3919_ | 20481 | NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 2 [Plukenetia volubilis] |
| TRINITY_DN5573_c0_g1_i1_len=3238_ | 20239 | NADH dehydrogenase subunit 2 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata] |
| TRINITY_DN5573_c0_g1_i4_len=3775_ | 19810 | hypothetical protein CIPAW_15G095900 [Carya illinoensis] |
| TRINITY_DN2267_c0_g1_i2_len=2225_ | 14747 | transcription elongation factor TFIIIS-like [Carica papaya] |

Tabla 3.11 Relación de la abundancia de los contig en plantas infec y sus blancos putativos.

| Contig plantas infectadas | Abundancia | Blanco putativo |
|-----------------------------------|------------|--|
| TRINITY_DN760_c0_g1_i17_len=5941 | 642105 | hypothetical protein H6P81_000002 [Aristolochia fimbriata] |
| TRINITY_DN760_c0_g1_i15_len=7136 | 612696 | hypothetical protein H6P81_000002 [Aristolochia fimbriata] |
| TRINITY_DN5292_c0_g1_i1_len=6474 | 257055 | hypothetical protein Lal_00045043 [Lupinus albus] |
| TRINITY_DN5292_c0_g1_i11_len=6474 | 254717 | hypothetical protein Lal_00045043 [Lupinus albus] |
| TRINITY_DN5292_c0_g1_i9_len=6482 | 247606 | hypothetical protein Lal_00045043 [Lupinus albus] |
| TRINITY_DN5292_c0_g1_i3_len=5840 | 170841 | hypothetical protein Lal_00045043 [Lupinus albus] |
| TRINITY_DN5292_c0_g1_i2_len=5446 | 170687 | hypothetical protein L2E82_52114 [Cichorium intybus] |
| TRINITY_DN760_c0_g1_i7_len=1308 | 113179 | hypothetical protein GBA52_010152 [Prunus armeniaca] |
| TRINITY_DN2393_c0_g2_i8_len=5900 | 62038 | NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 2 [Plukenetia volubilis] |

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

En las plantas, los sRNA están presentes son los microRNA y los RNA de interferencia (iRNA) de aproximadamente de 20 a 24 nucleótidos de longitud que actúan como reguladores en los procesos biológicos y de defensa en la planta. Los iRNA pueden ser endógenos, es decir generados a partir de mRNA de a la planta o bien exógenos, generados a partir de patógenos que invaden a la planta (Deng *et al.*, 2022).

Los resultados presentados en esta tesis comprenden la identificación y categorización de los sRNA presentes durante la interacción de PMeV-Mx con plantas de papaya variedad Maradol en etapa de prefloración, mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático. En este trabajo se inocularon plantas de papaya a los 60 días después de la germinación, mantenidas en bolsas de tierra en el invernadero de bioseguridad, que posteriormente fueron trasplantadas a suelo en una casa sombra rodeada de malla antiáfidos, para imitar las condiciones naturales de cultivo. El RNA para la secuenciación de los sRNA se obtuvo de hojas de tres plantas a los 90 días después de la inoculación, que fueron previamente confirmadas para la presencia del PMeV-Mx y hojas de tres plantas inoculadas con el amortiguador, denominadas plantas sanas.

En las plantas infectadas se detectaron 30 miRNA y 29 en plantas sanas. El miR398a presentó la mayor expresión tanto en plantas sanas como infectadas, este miRNA esta conservado en plantas y controla el crecimiento, así como la respuesta a estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2022). El miR398b incrementó su expresión en plantas de papaya infectadas con el complejo PMeV/PMeV2 que causan la meleira de la papaya (Abreu *et al.*, 2014). Este miRNA también exhibe acumulación elevada en diversas plantas infectadas por otros virus, como el Virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus del rizado de la hoja del tomate (ToICNV) y por el virus X (PVX) de la papa. Dados los altos niveles de acumulación de este miRNA en plantas sanas de papaya de este trabajo, es posible que las plantas estuvieran sometidas estrés por temperatura y por luz ultravioleta (Li *et al.*, 2022), lo que ya no permitió incrementar aún más los niveles del mi398 en plantas infectadas. Esto se sugiere ya que otros miRNAs que no responden a estrés abiótico, si incrementaron su expresión en respuesta a PMeV-Mx, pero no en plantas sanas, tales como el miRNA162a,

el cual también se indujo en respuesta a la meleira de la papaya en Brasil (Abreu *et al.*, 2014); el miR166d, y miR167d. El miR162a regula la expresión del mRNA que codifica para la enzima DCL1, de esta manera controla el mecanismo de silenciamiento génico en la planta y por ende la respuesta a patógenos mediada por sRNA (Liang, *et al.*, 2013). cpa-MIR166b y cpa-MIR167a aumentan su expresión en hojas de papaya infectadas por PRSV (Aryat *et al.*, 2012), estas respuestas son similares a las observadas en este trabajo. El miR167 se ha involucrado en la respuesta a auxinas (Wang *et al.*, 2005) mientras que el miR167d, la variante encontrada en este trabajo, en la respuesta de las plantas de arroz al patógeno *Magnaporthe oryzae* (Zhao *et al.*, 2020). MIR166d se dirige los ARNm que codifican los factores de transcripción HD-Zip, incluidos Phabulosa (PHB) y Phavoluta (PHV), que regulan la iniciación del meristemo axilar y el desarrollo de las hojas (Rhoades *et al.*, 2002). Recientemente se reportó que este miRNA está involucrado en la tolerancia a la deficiencia a Potasio en plantas de trigo (Lei *et al.*, 2023), por lo que puede tener varias funciones. La expresión del Cpa-miR160d también aumentó en plantas infectadas con PMeV-Mx, aunque con abundancia menor; este miRNA también incrementó su expresión durante la infección de plantas de papaya infectadas con PRSV (Aryat *et al.*, 2012). Este miR160 controla la formación de células de la cofia radicular en *Arabidopsis thaliana*, mediante la regulación de la expresión de dos factores transcripcionales de respuesta auxinas ARF10 y ARF16 (Wang *et al.*, 2016); algunos patógenos de plantas, incluyendo a los virus, también afectan la respuesta a auxinas, será interesante averiguar si PMeV-Mx está involucrado en el control de la respuesta auxinas en las plantas.

Aparte del miR162, es interesante que ningún otro de los 11 miRNA caracterizados previamente por qRT-PCR durante la interacción papaya var. Golden/virus que causan la meleira de la papaya en Brasil, haya tenido un comportamiento similar en este trabajo. Una posible explicación son las diferencias de edad de las plantas y las condiciones de cultivo en ambos trabajos. En las plantas de Brasil (Abreu *et al.*, 2014) no se indica la edad de las plantas, pero se infiere que debieron ser plantas adultas con producción de frutos, pues se menciona si se trataba de plantas sintomáticas (con alta carga viral) o asintomáticas (con baja carga viral), y los síntomas se observan preferentemente en frutos (Revisado por Sa-Antunes *et al.*, 2016). En ese trabajo tampoco se indica el tiempo transcurrido después de la infección, ni se describe el método usado para la infección, por lo que es posible que se tratara de plantas infectadas naturalmente, puesto que estaban en el campo. El tiempo transcurrido después de la inoculación y la edad de la planta al momento de la inoculación

son determinantes para el grado de severidad en el caso de la infección por PRSV (Hernández-Castro *et al.*, 2003) y por PMeV-Mx (Chi Herrera, 2021), en el último caso la carga viral aumenta con el tiempo de infección. Las diferencias observadas en ambos trabajos también pueden deberse al genotipo viral o al genotipo de la planta (Ramphan, *et al.*, 2023).

En este trabajo también se identificaron por primera vez vsRNAs en respuesta a la meleira de la papaya. Los vsRNA generados abarcan la mayor parte del genoma de PMeV-Mx. Esto ocurre para muchos virus de plantas, tanto de genoma de ssRNA de sentido positivo como para virus de genoma de ssDNA (Donaire, *et al.*, 2009). Se observó una acumulación preferente de vsRNA de polaridad en sentido positivo, especialmente en el ORF1 y ORF2. El caso especial es para la región del RNA largo no codificante (lncRNA) donde los vsRNA en sentido negativo superan en número a las secuencias en sentido positivo. Esto contrasta con lo observado para otros virus. Donaire y colaboradores, estudiaron los vsRNA producidos por nueve virus en distintos hospederos; donde cinco virus generaron igual proporción de vsRNA en sentido directo e indirecto, y cuatro virus tuvieron mayor proporción de vsRNA en sentido directo, entre ellos el TMV y el virus de mosaico del pepino (Donaire *et al.*, 2009). Los vsRNA de PMeV-Mx variaron en abundancia, desde 10 a 183,464 lecturas. Esto significa que algunas regiones del genoma fueron procesadas por la maquinaria de silenciamiento génico de la planta por la degradación directa del RNA viral y otros vsRNA son producto de amplificación por replicasas de la planta tipo RDR, para la producción de vsRNA secundarios, como se ha observado en otros virus (Llave 2010; Donaire *et al.*, 2009). El 70% de los vsRNA se generaron en lncRNA, lo que sugiere que la traducción protege al genoma viral de la degradación por silenciamiento génico de la planta (Dickson y Wilusz, 2011). Una mayor abundancia de vsRNA en la región no traducida 3' (3'UTR) se ha visto en virus que producen RNA subgenómicos (sgRNA) (Llave, 2010). Los umbravirus y otros miembros de la familia Tombusviridae producen sgRNA (Jiwan y White, 2011), sin embargo, aún no se ha determinado si PMeV-Mx y otros los virus similares a umbravirus los generan. La mayoría de los vsRNA más abundantes se asociaron a regiones formadoras de horquillas. Esto se ha visto para múltiples virus vegetales (Shimura *et al.*, 2015) Molnar *et al.*, 2005). Interesantemente, no se encontraron vsRNA en el extremo 3'UTR del virus, a pesar de que previamente se identificó una estructura secundaria localizada al extremo 3' terminal del lncRNA de PMeV-Mx (Toriz Bravo *et al.*, 2021), que funge como promotor de la replicación

en Carmovirus y otros miembros de la familia Tombusviridae (Liu et al., 2021). Si esta estructura participa en la replicación de PMeV-Mx, puede estar en estrecha asociación con la RdRp, lo que la protegería al RNA genómico de la degradación. Una estructura secundaria localizada en el extremo 5' UTR del Tombusvirus, Virus de la mancha anular del clavel italiano (CIRV) lo protege de la degradación (Gunawardene, et al., 2021).

En este trabajo también se estudiaron los siRNA producidos en plantas de papaya durante la infección por PMeV-Mx, para ello se tomó ventaja de un transcriptoma que se generó de las mismas plantas utilizadas identificar los sRNA. 166,659 lecturas se alinearon una sola vez, lo que sugiere que sus blancos moleculares son transcritos únicos; mientras que la mayoría de las lecturas (3,320,407) se alienó múltiples veces, lo que sugiere que estos siRNAs tienen múltiples blancos moleculares. El proceso de identificación de los blancos moleculares es un trabajo muy exhaustivo que requiere mucho tiempo, y ya no pudo concluirse, por lo cual la caracterización de los siRNAs quedará como perspectiva.

no se logró recuperar las secuencias específicas de los siRNA endógenos. Este primer acercamiento a la identificación de los sRNA en plantas de papaya infectadas con PMeV-Mx podría contribuir a entender como los sRNA regulan su expresión para mantener una interacción equilibrada durante el desarrollo de la infección entre la planta y el virus, que en un futuro se puedan caracterizar para contribuir a comprender mejor los requerimientos genéticos y estructurales de la población de sRNA durante la infección.

CAPITULO V**CONCLUSIÓN GENERALES Y PERSPECTIVAS****CONCLUSIÓN**

En plantas infectadas se identificaron 97 miRNA conocidos previamente, miR166d y miR167d fueron los más abundantes y presentaron mayor expresión en plantas infectadas con respecto a las sanas, estos regulan la expresión de factores de transcripción en otras especies vegetales. Los miRNA de la familia 398, cpa_miR398_isomir a y cpa_miR398_isomir b, fueron los más abundantes en plantas sanas, con más de 3 millones de lecturas entre ambos.

El miRNA162a, cuyo blanco es la enzima DCL1, es el único de los 11 identificados previamente en plantas de papaya var. Golden infectada por el complejo PMeV/PMeV2 en Brasil con expresión similar en plantas de papaya infectadas con PMeV-Mx, un aumento en respuesta a la infección. El miR156a, involucrado en el control del proteasoma, también tuvo mayor expresión en plantas infectadas, así como los miRNA 166a y 390a, involucrados en la respuesta a estrés.

Se identificaron vsRNAs en la mayor parte del genoma de PMeV-Mx, que variaron en abundancia, desde 10 a 183,464 lecturas. El 70% de los vsRNA se generaron en lncRNA, lo que indica que la traducción protege al genoma viral de la degradación por silenciamiento génico de la planta. La mayoría de los vsRNA más abundantes se asociaron a regiones formadoras de horquillas, sin embargo, la estructura secundaria localizada al extremo 3' terminal del lncRNA, conservada en Carmovirus y otros Tombusvirus, en los cuales la función es de servir como promotor de la replicación de sentido negativo, no generó vsRNA.

Los alineamientos con el transcriptoma de plantas sanas e infectadas para identificar siRNA endógenos, produjeron 1,283,801 de lecturas alineadas en plantas sanas y 3,487,066 en plantas infectadas. Por lo que se concluye que los siRNA se expresan mayormente en plantas infectadas, con respecto a las sanas.

PERSPECTIVA

Según los resultados y conclusiones de este trabajo, se plantean las siguientes perspectivas para futuras investigaciones sobre la caracterización de las poblaciones de los RNA pequeños presentes en la interacción de PMeV-Mx con *C. papaya*:

Caracterizar los miRNA expresados con mayor abundancia en plantas sanas e infectadas por medio de qRT-PCR para cuantificar su expresión. Posteriormente, realizar un Northern Blot para confirmar la presencia y tamaño de los miRNA específicos en las plantas sanas e infectadas.

Realizar una validación experimental de los vsiRNA identificados con mayor abundancia mediante qRT-PCR y Northern blot.

Realizar la identificación de secuencias únicas y su longitud en nucleótidos de los siRNA endógenos con mayor abundancia que se alinearon a las regiones del transcriptoma. Posteriormente, llevar a cabo un segundo alineamiento con el transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol después de eliminar las regiones con isoformas. Esto se debe hacer para asegurar que los siRNA identificados correspondan a secuencias únicas y no se vean afectados por la presencia de isoformas en el transcriptoma de *C. papaya*. Al eliminar las isoformas, se obtendrá una representación más precisa de las secuencias de siRNA presentes en el transcriptoma de *C. papaya* var. Maradol.

Generar plantas transgénicas de papaya en las cuales se altere la expresión de algunos de los miRNA identificados en este trabajo para retardarlas con PMeV-Mx.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu PM, Gaspar CG, Buss DS, Ventura JA, Ferreira PC, Fernandes PM. Carica papaya microRNAs are responsive to Papaya meleira virus infection. *PLoS One*. 2014 Jul 29;9(7).
2. Abreu EF, Daltro CB, Nogueira EO, Andrade EC, Aragao FJ. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. *Archives of Virology*. 2015;(160):3143–7.
3. Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Von Kuster, G., Rasche, E., Soranzo, N., Turaga, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W3–W10.
4. Andrews, S. (2010). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
5. Akbar, S., Wei, Y., & Zhang, M. Q. (2022). RNA Interference: Promising Approach to Combat Plant Viruses. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5312
6. Aryal, R., Yang, X., Yu, Q., Sunkar, R., Li, L., & Ming, R. (2012). Asymmetric purine-pyrimidine distribution in cellular small RNA population of papaya. *BMC Genomics*, 13(1), 1-14.
7. Bartel, D. P. (2018). Metazoan miRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51
8. Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Nathan Coraor, Taylor J, Anton Nekrutenko (2010) A, the Galaxy Team, Manipulation of FASTQ data with Galaxy, *Bioinformatics*, Volume 26, Issue 14, Pages 1783–1785

-
9. Cai, J.; Wu, Z.; Hao, Y.; Liu, Y.; Song, Z.; Chen, W.; Li, X.; Zhu, X. (2021) Small RNAs, Degradome, and Transcriptome Sequencing Provide Insights into Papaya Fruit Ripening Regulated by 1-MCP. *Foods* 2021, 10, 1643.
 10. Chi Herrera Liuvitza. Tesis de Licenciatura. (2021). Evaluación de la respuesta de dos variedades comerciales de papaya (*Carica papaya*) frente al virus de la meleira y colección de accesiones criollas de papaya”. Instituto tecnológico regional de México. Instituto tecnológico de Calkini
 11. Cornejo-Franco, J. F., Flores, F., Mollov, D., & Quito-Avila, D. F. (2021). An umbravirus-related virus found in babaco (*Vasconcellea heilbornii*). *Archives of virology*, 166(8), 2321-2324.
 1. Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: from mechanism to organism. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 409.
 2. Deng, Z., Ma, L., Zhang, P., & Zhu, H. (2022). Small RNAs participate in plant–virus interaction and their application in plant viral defense. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 696
 3. Dickson AM, Wilusz J. Strategies for viral RNA stability: live long and prosper. *Trends Genet.* 2011 Jul;27(7):286-93.
 4. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (Eds.). (2005). *Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
 5. Krueger, F. (2021). Trim Galore. In GitHub repository. GitHub. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>
 6. Friedländer, 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.

7. García-Cámara I, Tapia-Tussell R, Magaña-Álvarez A, Cortés Velázquez A, Rodolfo Martín-Mex, Moreno-Valenzuela O and Pérez-Brito D. (2019). *Empoasca papayae* (Hemiptera: Cicadellidae)-Mediated Transmission of Papaya Meleira Virus-Mexican Variant in Mexico. *Plant Disease* 103:8, 2015-2023
8. Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. and Carrington, J.C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. *Plant Cell* 22, 481-496.
9. Girón-Ramírez, A. (2023). Domesticación de papaya: implicaciones en la tolerancia al cambio climático [Imagen de un árbol de *Carica papaya*].
10. Griffiths-Jones, S., Bateman, A., Marshall, M., Khanna, A., & Eddy, S. R. (2003). Rfam: an RNA family database. *Nucleic acids research*, 31(1), 439–441.
11. Gunawardene CD, Im JSH, White KA.(2021). RNA Structure Protects the 5' End of an Uncapped Tombusvirus RNA Genome from Xrn Digestion. *J Virol*. Sep 27;95(20)
12. Hernández-Castro, E.; D. Riestra-Díaz; J. A. Villanueva-Jiménez; R. Mosqueda-Vázquez: (2003) «Análisis epidemiológico del Virus de la mancha anular del papayo bajo diferentes densidades, aplicación de extractos acuosos de semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) y eliminación de plantas enfermas del cv. Maradol roja», *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9: 55-68, México,
13. Hu, G., Hao, M., Wang, L., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Y., Peng, Q., Yang, Z., & Wu, J. (2020). The Cotton miR477-CBP60A Module Participates in Plant Defense Against *Verticillium dahlia*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 33(4), 624–636.

-
14. Incarbone, M., & Dunoyer, P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science*, 18, 382–392.
 15. Ivanova, Z, Minkov G., Gisel, A., Yahubyan, G., Minkov, I., Toneva, V., Baev, V. (2022). The Multiverse of Plant Small RNAs: How Can We Explore It? *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 3979.
 16. Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences, 21**, 966.
 17. Jiwan S and White A (2011) Subgenomic mRNA transcription in Tombusviridae, *RNA Biology*, 8:2, 287-294,
 18. Seguin, J., Otten, P., Baerlocher, L., Farinelli, L., & Pooggin, M. M. (2016). MISIS-2: A bioinformatics tool for in-depth analysis of small RNAs and representation of consensus master genome in viral quasispecies. *Journal of Virological Methods*, 233, 37-40
 19. Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357–360
 20. Kwon, S.-J., Bodaghi, S., Dang, T., Gadhave, K. R., Ho, T., Osman, F., Al Rwahnih, M., Tzanetakis, I. E., Simon, A. E., & Vidalakis, G. (2021). Complete Nucleotide Sequence, Genome Organization, and Comparative Genomic Analyses of Citrus Yellow-Vein Associated Virus (CYVaV). *Frontiers in Microbiology*, 12, 683130.
 21. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. *et al.* (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25.
 22. Lee Geum Ju, Chung Hwan Wook, Lee Ki Heon and Ahn Hong Seok. (2005) Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Korean Medical Science*. 20:267-72.

23. Li Z, Zhang T, Huang X, Zhou G. Impact of Two Reoviruses and Their Coinfection on the Rice RNAi System and vsiRNA Production. *Viruses*. 2018; 10(11):594.
24. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & and, R. D. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079
25. Li J, Song Q, Zuo ZF, Liu L. MicroRNA398: A Master Regulator of Plant Development and Stress Responses. *Int J Mol Sci*. 2022
26. Liang, G., Li, Y., He, H., Wang, F., & Yu, D. (2013). Identification of miRNAs and miRNA-mediated regulatory pathways in *Carica papaya*. *Planta*, 238, 739-752.
27. Liu, J., Carino, E., Bera, S., Gao, F., May, J. P., & Simon, A. E. (2021). Structural Analysis and Whole Genome Mapping of a New Type of Plant Virus Subviral RNA: Umbravirus-Like Associated RNAs. *Viruses*, 13(4), 646.
28. Liu, W., & Ding, C. (2017). Roles of LncRNAs in viral infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 205.
29. Llave C. (2010), Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant–virus interactions. *Trends in Plant Science*, Volume 15
30. Lu, Y. D., Gan, Q. H., Chi, X. Y., & Qin, S. (2008). Roles of microRNA in plant defense and virus offense interaction. *Plant cell reports*, 27, 1571-1579.
31. Maciel-Zambolim, E., Kunieda-Alonso, S., Matsuoka, K., De Carvalho, M. G., & Zerbini, F. M. (2003). Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. *Plant Pathology*, 52(3), 389-394.
32. Maiden, M. C., Van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., & McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 728-736

33. Madrigal, F., & Boza, M. (2013). La competitividad en las exportaciones de papaya de México: un análisis cuantitativo. *Revista de Análisis de Economía, Comercio y Negocios Internacionales*, 2, 27-54.
34. Maurastoni, M., Sá Antunes, T. F., Abreu, E. F. M., et al. (2023). A Capsid Protein Fragment of a Fusagra-like Virus Found in *Carica papaya* Latex Interacts with the 50S Ribosomal Protein L17. *Viruses*, 15(2), 541.
35. Mackowiak S. D. (2011). Identification of novel and known miRNAs in deep-sequencing data with miRDeep2. *Current protocols in bioinformatics, Chapter 12*, 12.10.1–12.10.15.
36. McCormack, J. C., Yuan, X., Yingling, Y. G., Kasprzak, W., Zamora, R. E., Shapiro, B. A., & Simon, A. E. (2008). Structural Domains within the 3' Untranslated Region of Turnip Crinkle Virus. *Journal of Virology*, 82(17), 8706-8720.
37. Mitter, N.; Koundal, V.; Williams, S.; Pappu, H. Differential expression of tomato spotted wilt virus-derived viral small RNAs in infected commercial and experimental host plants. *PLoS ONE* **2013**, 8, e76276.
38. Molnár A., T. Csorba, L. Lakatos, E. Várallyay, C. Lacomme and J. Burgyán (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79:7812-7818.
39. Naveed, K.; Mitter, N.; Harper, A.; Dhingra, A.; Pappu, H.R. Comparative analysis of virus-specific small RNA profiles of three biologically distinct strains of Potato virus Y in infected potato (*Solanum tuberosum*) cv. Russet Burbank. *Virus Res.* **2014**, 191, 153–160.
40. Panaviene, Z., Panavas, T., & Nagy, P. D. (2005). Role of an Internal and Two 3'-Terminal RNA Elements in Assembly of Tombusvirus Replicase. *J. VIROL.*, 79, 11.

-
41. Pantaleo, V, Masuta C, Shimura H (2021), Plant antiviral defense: Gene silencing Pathways, in Encyclopedia of virology, 4th edition Volume 3
42. Pathania, N., Justo, V., Magdalita, P., de la Cueva, F., Herradura, L., Waje, A., Lobres, A., Cueto, A., Dillon, N., Vawdrey, L., Hucks, L., Chambers, D., Sun, G., and Cheesman, J. 2019. Integrated disease management strategies for the productive, profitable and sustainable production of high-quality papaya fruit in the southern Philippines and Australia (FR2019-89). Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia. https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/projectpagedocs/final_report_hort.2012.113.pdf
43. Payet, R., & Billmeier, M. (2023). Small RNA Profiling by Next-Generation Sequencing Using High-Definition Adapters. In *MicroRNA Detection and Target Identification: Methods and Protocols* (pp. 103-115). New York, NY: Springer US.
44. Perez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Cortes-Velazquez, A., Quijano-Ramayo, A., Nexticapan-Garcez, A., & Martín-Mex, R. (2012). First report of Papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology*, 11(71), 13564-13570.
45. Porter, B. W., Aizawa, K. S., Zhu, Y. J., & Christopher, D. A. (2008). Differentially expressed and new non-protein-coding genes from a *Carica papaya* root transcriptome survey. *Plant Science*, 174(1), 38-50
46. Quito-Avila, D. F., Reyes-Proañó, E., Cañada, G., Cornejo-Franco, J. F., Alvarez-Quinto, R., Moreira, L., & Karasev, A. V. (2023). Papaya Sticky Disease Caused by Virus “Couples”: A Challenge for Disease Detection and Management. *Plant disease*, 107(6), 1649-1663.
47. Ramphan S, Chumchanchira C, Sornjai W, Chailangkarn T, Jongkaewwattana A, Assavalapsakul W, Smith DR (2023). Strain Variation Can Significantly Modulate the miRNA Response to Zika Virus Infection. *Int J Mol Sci*. Nov 11;24(22):16216.

-
48. Rosa, C., Kuo, Y. W., Wuriyanghan, H., & Falk, B. W. (2018). RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. *Annual review of phytopathology*, 56, 581-610.
49. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Cell 110:513-520
50. Ryabov and Taliansky, 2021. Umbravirus (Tombusviridae) in Encycopedia of virology, 4th edition Volume 3
51. Sá Antunes TF, Amaral RJV, Ventura JA, Godinho MT, Amaral JG, Souza FO, et al. (2016) The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. PLoS ONE 11(5): e0155240.
52. Sá Antunes, T. F., Maurastoni, M., Madroñero, L. J., et al. (2020). Battle of Three: The Curious Case of Papaya Sticky Disease. *Plant Disease*, 104(11), 2754–2763.
53. SADER (2021) México, principal exportador de papaya en el mundo; crece producción 3.2 por ciento en 2020. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural en México.
54. Shi, J., Jiang, Q., Zhang, S., Dai, X., Wang, F., & Ma, Y. (2022). MIR390 Is Involved in Regulating Anthracnose Resistance in Apple. *Plants*, 11*(3), 3299.
55. Shimura H, Masuta C. [RNA silencing and viral disease induction in plants]. *Uirusu*. 2012 Jun;62(1):19-26.
56. Shrestha, N., & Bujarski, J. J. (2020). Long noncoding RNAs in plant viroids and viruses: a review. *Pathogens*, 9 (9), 765.
57. Tapia-Tussell, R., Magaña-Alvarez, A., Cortes-Velazquez, A., Itza-Kuk, G., Nexticapan-Garcez, A., Quijano-Ramayo, A., ... & Perez-Brito, D. (2015). Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. *Plant pathology*, 64(2), 272-275

58. Toriz-Bravo A, Lopez-Ochoa L, Ramirez-Prado J, Serra-Hernandez W, Zamudio-Moreno E, MacFarlane S and Taliansky M. Analysis of genomic and structural features of Papaya meleira virus Mexican variant (PMeV-Mx). *Plant Pathol. J* Sometido.
59. Toriz Bravo Alethia Fernanda (2022). Tesis de Maestría. Caracterización molecular del RNA largo no codificante del Virus PMeV-Mx mediante el desarrollo de una clona infectiva. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Repositorio Institucional de CICY.
60. Walsh, E., Elmore, J. M., & Taylor, C. G. (2017). Root-knot nematode parasitism suppresses host RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(4), 295-300
61. Wang J, Wang L, Mao Y, Cai W, Xue H (2005) Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis. *Plant Cell* 17:2204–2216
62. Yue, J., VanBuren, R., Liu, J., Fang, J., Zhang, X., Liao, Z., ... & Ming, R. (2022). SunUp and Sunset genomes revealed impact of particle bombardment mediated transformation and domestication history in papaya. *Nature Genetics*, 54(5), 715-724.
63. Zamudio-Moreno, E., Ramirez-Prado, J. H., Moreno-Valenzuela, O. A., & Lopez-Ochoa, L. A. (2015). Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1145-1154

ANEXOS

Anexo 1. Abundancia de los miRNA conocidos

| Plantas sanas | Secuencia | Total abundancia sanas | Total abundancia infectadas |
|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Cpa-miR156a | UGACAGAAGAGAGUGAGCAC | 49 | 82 |
| Cpa-miR156a_isomir a | UGACAGAAGAUAGAGAGCAC | 12 | 32 |
| Cpa-miR156e | UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC | 16 | 68 |
| Cpa-miR156f | UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC | 16 | 68 |
| Cpa-miR159b | CUUGGAUUGAAGGGAGCUCC | 2122 | 1743 |
| Cpa-miR159* | GAGCUCCUUGAAGUCCAUAUG | 39 | 121 |
| Cpa-miR160a_isomir | UGCCUGGCUCCUGUAUGCU | 9 | 7 |
| Cpa-miR160d | UGCCUGGCUCCUGAAUGCCA | 397 | 1223 |
| Cpa-miR160d_isomir a | UGCCUGGCUCCUGAAUGCC | 121 | 287 |
| Cpa-miR162a_isomir a | UCGAUAAACCUCUGCAUCCAGU | 129 | 527 |
| Cpa-miR162_isomir b | UCGAUAAACCUCUGCAUCCCG | 201 | 7 |
| Cpa-miR162a_isomir c | UCGAUAAACCUCUGCAUCCAA | 19 | 46 |
| Cpa-miR162a_isomir d | UCGAUAAACCUCUGCAUCCAGC | 40 | 146 |
| Cpa-miR162a_isomir e | UCGAUAAACCUCUGCAUUCAG | 22 | 26 |
| Cpa-miR164a | UGGAGAAGCAGGGCAGUGCA | 3 | 1 |
| Cpa-miR164a_isomir | UGGAGAAGCAGGGCAGUGU | 1 | 4 |
| Cpa-miR166a_isomir a | UCGGACCAGGCUUCAUCCCA | 338 | 411 |
| Cpa-miR166a_isomir b | UCGGACCAGGCUUCAUCCU | 74 | 173 |
| Cpa-miR166a_isomir c | UCGGACCAGACUUCAUCCCC | 153 | 105 |
| Cpa-miR166a_isomir d | UUGGACCAGGCUUCAUCCCC | 168 | 118 |
| Cpa-miR166a_isomir e | UCGGACCAGGCUUCAUCCCU | 121 | 151 |
| Cpa-miR166d_isomir a | UCGGACCAGGCUUCAUCC | 18 | 49 |
| Cpa_miR166d_isomir b | CUCGGACCAGGCUUCAUCCCG | 213 | 169 |
| Cpa_miR166d_isomir c | UCUCGGACCAGGCUUCAUCC | 4457 | 7517 |
| Cpa-miR167a_isomir a | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGG | 597 | 1056 |
| Cpa-miR167c_isomir a | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU | 481 | 2117 |
| Cpa-miR167d_isomir b | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUGA | 255 | 703 |
| Cpa-miR167d_isomir c | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUAGC | 75 | 116 |
| Cpa-miR167c b | AGAUCAUAUGGCAGUUUCACC | 142 | 351 |
| Cpa_miR167c_isomir c | GAUCAUAUGGCAGUUUCACC | 316 | 330 |
| Cpa-miR167c_isomir d | UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUUU | 165 | 642 |
| Cpa-miR169 | CAGCCAAGAAUGACUUGCCGA | 3 | 1 |
| Cpa_miR171d | UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC | 581 | 1889 |
| Cpa-miR172 | GGGAAUCUUGAUGAUGCUGCA | 6 | 5 |
| Cpa-miR319 | AUUGGACUGAAGGGAGCUCC | 0 | 10 |
| Cpa-miR390a | AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC | 252 | 1150 |
| Cpa-miR390_isomir a | AGCUCAGGAGGGAUAGCGCC | 36 | 65 |
| Cpa-miR390_isomir b | aagcucaggaggauagcgc | 6 | 11 |
| Cpa-miR390-5p | CGCUAUCUAUCCUGAGUUUCA | 120 | 810 |
| Cpa-miR390-5p_isomir a | CGCUAUCUAUCCUGAGUUUU | 9 | 45 |
| Cpa-miR390_isomir b | AAGCUCAGGAGGGAUAGCGC | 6 | 11 |
| Cpa-miR393 | UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC | 5 | 2 |
| Cpa-miR394 | Guggcauucuguccaccucc | 0 | 11 |
| Cpa-miR395 | UGAAGUGUUUGGGGAACUC | 22 | 13 |
| Cpa-miR395_isomir a | CUGAAGUGUUUGGGGAACUC | 102 | 68 |

| | | | |
|-------------------------|--------------------------|------|------|
| Cpa-miR396-5p | GUUCAUAAAGCUGUGGGAAG | 1698 | 4015 |
| Cpa-mir396 | UUCAUAAAGCUGUGGGAAG | 558 | 396 |
| Cpa-miR396_isomir | uuccacagcCuucuugaacug | 14 | 16 |
| Cpa-miR398b | UGUGUUCUCAGGUCGCCCU | 488 | 234 |
| Cpa-miR398b_isomir a | UCGUGUGUUCUCAGGUCGCC | 5182 | 873 |
| Cpa-miR398b_isomir b | GUGUGUUCUCAGGUCGCCCU | 1791 | 718 |
| Cpa-miR398b_isomir c | CUGUGUUCUCAGGUCGCCCU | 876 | 112 |
| Cpa-miR398b_isomir d | UGAGUUCUCAGGUCGCCCU | 373 | 93 |
| Cpa-miR398b_isomir e | CGUGUGUUCUCAGGUCGCC | 974 | 126 |
| Cpa-miR398b_isomir f | UGUGUACUCAGGUCGCCCU | 575 | 85 |
| Cpa-miR398b_isomir g | UGUGUUCUCAGUUCGCCCU | 229 | 78 |
| Cpa-miR398b_isomir h | UGUGUUCUCAGGCCGCCCU | 538 | 59 |
| Cpa-miR398b_isomir i | UGUGUUCUCAGGGCGGCCAG | 2755 | 210 |
| Cpa-miR408_isomir a | UGCACUGCCUCUCCCU | 63 | 5 |
| Cpa-miR408_isomir b | UGCACUGCCUCUCCCU | 44 | 4 |
| Cpa-miR408_isomir c | CUGCACUGCCUCUCCCU | 246 | 17 |
| Cpa-miR477_isomir a | AUUGGAGGAUUUUGGGGAGC | 3 | 62 |
| Cpa-miR477_isomir b | AUUGGAGGAUUUUGGGCGAGC | 1 | 75 |
| Cpa-miR535 | UGACAACGAGAGAGACGC | 693 | 1017 |
| Cpa-miR535_5p | GUGCUCUAUGUCGUUGUCAU | 231 | 279 |
| Cpa-mir8135 | AGGAUUUUGCAGGGUUGAU | 2 | 2 |
| Cpa-miR8137 | UUCGCCAGCCAUUCACAAAAU | 429 | 1231 |
| Cpa-miR8137_isomir a | UUCGCCAGCCAUUCACAAAAU | 31 | 195 |
| Cpa-miR8137-5p | UUGUGUGAAUGGCUUGCGAAA | 43 | 115 |
| Cpa-miR8137-5p_isomir a | UGUGUGAAUGGCUUGCGAAAG | 354 | 688 |
| Cpa-miR8140 | CUUUUCAAGACUUCAGCUUCA | 410 | 596 |
| Cpa-miR8135 | AGGAUUUUGCAGGGUUGAU | 7 | 18 |
| Cpa-miR8148_isomir a | GCUGACUGGAUCUGCUGACGUGGC | 27 | 115 |
| Cpa-miR8150 | AAAACCGAGUCAGAUGAGCG | 4 | 14 |

Anexo 2. Total de lecturas en las posiciones del ORF 1.

| Posición ORF1 | Total de lecturas |
|---------------|-------------------|
| 6 | 9 |
| 7 | 18 |
| 8 | 16 |
| 9 | 148 |
| 10 | 7 |
| 11 | 10 |
| 12 | 71 |
| 13 | 273 |
| 14 | 88 |
| 15 | 128 |
| 16 | 291 |
| 17 | 34 |
| 18 | 3634 |
| 19 | 3904 |
| 20 | 1536 |

| | |
|----|-----|
| 21 | 25 |
| 22 | 0 |
| 23 | 328 |
| 24 | 11 |
| 25 | 12 |
| 26 | 19 |
| 27 | 478 |
| 28 | 10 |
| 29 | 2 |
| 30 | 1 |
| 31 | 0 |
| 32 | 0 |
| 33 | 0 |
| 34 | 0 |
| 35 | 1 |
| 36 | 36 |
| 37 | 6 |
| 38 | 11 |
| 39 | 0 |
| 40 | 166 |
| 41 | 18 |
| 42 | 14 |
| 43 | 34 |
| 44 | 1 |
| 45 | 6 |
| 46 | 0 |
| 47 | 3 |
| 48 | 0 |
| 49 | 0 |
| 50 | 43 |
| 51 | 25 |
| 52 | 6 |
| 53 | 0 |
| 54 | 0 |
| 55 | 0 |
| 56 | 0 |
| 57 | 0 |
| 58 | 3 |
| 59 | 1 |
| 60 | 0 |
| 61 | 1 |
| 62 | 4 |
| 63 | 9 |

| | |
|-----|-----|
| 64 | 3 |
| 65 | 4 |
| 66 | 0 |
| 67 | 0 |
| 68 | 0 |
| 69 | 1 |
| 70 | 1 |
| 71 | 0 |
| 72 | 5 |
| 73 | 25 |
| 74 | 4 |
| 75 | 4 |
| 76 | 59 |
| 77 | 16 |
| 78 | 8 |
| 79 | 11 |
| 80 | 7 |
| 81 | 2 |
| 82 | 3 |
| 83 | 1 |
| 84 | 12 |
| 85 | 1 |
| 86 | 0 |
| 87 | 0 |
| 88 | 2 |
| 89 | 1 |
| 90 | 182 |
| 91 | 132 |
| 92 | 18 |
| 93 | 8 |
| 94 | 32 |
| 95 | 47 |
| 96 | 18 |
| 97 | 41 |
| 98 | 13 |
| 99 | 34 |
| 100 | 803 |
| 101 | 1 |
| 102 | 3 |
| 103 | 53 |
| 104 | 2 |
| 105 | 13 |
| 106 | 8 |

| | |
|-----|-----|
| 107 | 49 |
| 108 | 133 |
| 109 | 7 |
| 110 | 1 |
| 111 | 3 |
| 112 | 1 |
| 113 | 11 |
| 114 | 3 |
| 115 | 13 |
| 116 | 19 |
| 117 | 2 |
| 118 | 2 |
| 119 | 4 |
| 120 | 2 |
| 121 | 209 |
| 122 | 11 |
| 123 | 33 |
| 124 | 7 |
| 125 | 18 |
| 126 | 10 |
| 127 | 17 |
| 128 | 1 |
| 129 | 12 |
| 130 | 4 |
| 131 | 26 |
| 132 | 32 |
| 133 | 31 |
| 134 | 16 |
| 135 | 6 |
| 136 | 6 |
| 137 | 8 |
| 138 | 1 |
| 139 | 0 |
| 140 | 0 |
| 141 | 0 |
| 142 | 151 |
| 143 | 14 |
| 144 | 18 |
| 145 | 5 |
| 146 | 8 |
| 147 | 0 |
| 148 | 0 |
| 149 | 0 |

| | |
|-----|-----|
| 150 | 4 |
| 151 | 3 |
| 152 | 0 |
| 153 | 0 |
| 154 | 0 |
| 155 | 34 |
| 156 | 67 |
| 157 | 12 |
| 158 | 12 |
| 159 | 1 |
| 160 | 0 |
| 161 | 2 |
| 162 | 10 |
| 163 | 68 |
| 164 | 119 |
| 165 | 16 |
| 166 | 6 |
| 167 | 6 |
| 168 | 25 |
| 169 | 44 |
| 170 | 35 |
| 171 | 48 |
| 172 | 106 |
| 173 | 97 |
| 174 | 676 |
| 175 | 36 |
| 176 | 17 |
| 177 | 4 |
| 178 | 13 |
| 179 | 14 |
| 180 | 0 |
| 181 | 4 |
| 182 | 1 |
| 183 | 0 |
| 184 | 0 |
| 185 | 6 |
| 186 | 24 |
| 187 | 63 |
| 188 | 10 |
| 189 | 12 |
| 190 | 6 |
| 191 | 11 |
| 192 | 0 |

| | |
|-----|------|
| 193 | 1 |
| 194 | 1 |
| 195 | 49 |
| 196 | 18 |
| 197 | 16 |
| 198 | 6 |
| 199 | 0 |
| 200 | 0 |
| 201 | 1 |
| 202 | 6 |
| 203 | 0 |
| 204 | 0 |
| 205 | 5 |
| 206 | 8 |
| 207 | 16 |
| 208 | 31 |
| 209 | 5 |
| 210 | 3 |
| 211 | 2 |
| 212 | 13 |
| 213 | 29 |
| 214 | 60 |
| 215 | 5 |
| 216 | 11 |
| 217 | 7 |
| 218 | 4 |
| 219 | 0 |
| 220 | 0 |
| 221 | 0 |
| 222 | 5 |
| 223 | 3 |
| 224 | 41 |
| 225 | 12 |
| 226 | 18 |
| 227 | 1849 |
| 228 | 143 |
| 229 | 23 |
| 230 | 9 |
| 231 | 26 |
| 232 | 99 |
| 233 | 36 |
| 234 | 9 |
| 235 | 11 |

| | |
|-----|-----|
| 236 | 17 |
| 237 | 6 |
| 238 | 6 |
| 239 | 4 |
| 240 | 12 |
| 241 | 11 |
| 242 | 111 |
| 243 | 28 |
| 244 | 6 |
| 245 | 5 |
| 246 | 13 |
| 247 | 20 |
| 248 | 2 |
| 249 | 0 |
| 250 | 0 |
| 251 | 0 |
| 252 | 0 |
| 253 | 0 |
| 254 | 1 |
| 255 | 14 |
| 256 | 91 |
| 257 | 115 |
| 258 | 0 |
| 259 | 84 |
| 260 | 4 |
| 261 | 102 |
| 262 | 9 |
| 263 | 0 |
| 264 | 13 |
| 265 | 16 |
| 266 | 2 |
| 267 | 12 |
| 268 | 0 |
| 269 | 0 |
| 270 | 0 |
| 271 | 0 |
| 272 | 0 |
| 273 | 0 |
| 274 | 0 |
| 275 | 0 |
| 276 | 0 |
| 277 | 0 |
| 278 | 0 |

| | |
|-----|-----|
| 279 | 0 |
| 280 | 0 |
| 281 | 0 |
| 282 | 0 |
| 283 | 0 |
| 284 | 0 |
| 285 | 0 |
| 286 | 0 |
| 287 | 0 |
| 288 | 0 |
| 289 | 0 |
| 290 | 0 |
| 291 | 0 |
| 292 | 0 |
| 293 | 3 |
| 294 | 4 |
| 295 | 10 |
| 296 | 4 |
| 297 | 0 |
| 298 | 0 |
| 299 | 0 |
| 300 | 0 |
| 301 | 0 |
| 302 | 1 |
| 303 | 13 |
| 304 | 5 |
| 305 | 0 |
| 306 | 2 |
| 307 | 0 |
| 308 | 0 |
| 309 | 0 |
| 310 | 0 |
| 311 | 0 |
| 312 | 0 |
| 313 | 0 |
| 314 | 1 |
| 315 | 2 |
| 316 | 1 |
| 317 | 110 |
| 318 | 31 |
| 319 | 34 |
| 320 | 1 |
| 321 | 1 |

| | |
|-----|----|
| 322 | 4 |
| 323 | 3 |
| 324 | 0 |
| 325 | 0 |
| 326 | 0 |
| 327 | 0 |
| 328 | 0 |
| 329 | 3 |
| 330 | 1 |
| 331 | 1 |
| 332 | 2 |
| 333 | 1 |
| 334 | 0 |
| 335 | 2 |
| 336 | 0 |
| 337 | 0 |
| 338 | 0 |
| 339 | 0 |
| 340 | 3 |
| 341 | 1 |
| 342 | 0 |
| 343 | 6 |
| 344 | 2 |
| 345 | 1 |
| 346 | 6 |
| 347 | 17 |
| 348 | 1 |
| 349 | 0 |
| 350 | 4 |
| 351 | 13 |
| 352 | 14 |
| 353 | 14 |
| 354 | 11 |
| 355 | 14 |
| 356 | 2 |
| 357 | 6 |
| 358 | 10 |
| 359 | 22 |
| 360 | 75 |
| 361 | 9 |
| 362 | 2 |
| 363 | 0 |
| 364 | 0 |

| | |
|-----|-----|
| 365 | 4 |
| 366 | 15 |
| 367 | 1 |
| 368 | 4 |
| 369 | 15 |
| 370 | 18 |
| 371 | 0 |
| 372 | 0 |
| 373 | 11 |
| 374 | 9 |
| 375 | 29 |
| 376 | 161 |
| 377 | 22 |
| 378 | 8 |
| 379 | 5 |
| 380 | 40 |
| 381 | 13 |
| 382 | 39 |
| 383 | 40 |
| 384 | 7 |
| 385 | 7 |
| 386 | 60 |
| 387 | 11 |
| 388 | 87 |
| 389 | 53 |
| 390 | 7 |
| 391 | 84 |
| 392 | 9 |
| 393 | 59 |
| 394 | 49 |
| 395 | 31 |
| 396 | 36 |
| 397 | 104 |
| 398 | 5 |
| 399 | 56 |
| 400 | 4 |
| 401 | 7 |
| 402 | 6 |
| 403 | 0 |
| 404 | 0 |
| 405 | 0 |
| 406 | 0 |
| 407 | 0 |

| | |
|-----|----|
| 408 | 0 |
| 409 | 0 |
| 410 | 0 |
| 411 | 0 |
| 412 | 0 |
| 413 | 0 |
| 414 | 0 |
| 415 | 0 |
| 416 | 0 |
| 417 | 0 |
| 418 | 0 |
| 419 | 0 |
| 420 | 0 |
| 421 | 0 |
| 422 | 0 |
| 423 | 0 |
| 424 | 0 |
| 425 | 0 |
| 426 | 0 |
| 427 | 1 |
| 428 | 1 |
| 429 | 0 |
| 430 | 0 |
| 431 | 0 |
| 432 | 0 |
| 433 | 0 |
| 434 | 0 |
| 435 | 0 |
| 436 | 0 |
| 437 | 0 |
| 438 | 0 |
| 439 | 0 |
| 440 | 0 |
| 441 | 0 |
| 442 | 0 |
| 443 | 0 |
| 444 | 0 |
| 445 | 0 |
| 446 | 0 |
| 447 | 0 |
| 448 | 1 |
| 449 | 0 |
| 450 | 23 |

| | |
|-----|-----|
| 451 | 263 |
| 452 | 10 |
| 453 | 19 |
| 454 | 17 |
| 455 | 1 |
| 456 | 11 |
| 457 | 0 |
| 458 | 1 |
| 459 | 2 |
| 460 | 0 |
| 461 | 0 |
| 462 | 1 |
| 463 | 1 |
| 464 | 1 |
| 465 | 5 |
| 466 | 4 |
| 467 | 105 |
| 468 | 15 |
| 469 | 15 |
| 470 | 4 |
| 471 | 8 |
| 472 | 18 |
| 473 | 6 |
| 474 | 6 |
| 475 | 9 |
| 476 | 6 |
| 477 | 23 |
| 478 | 6 |
| 479 | 3 |
| 480 | 14 |
| 481 | 8 |
| 482 | 26 |
| 483 | 25 |
| 484 | 45 |
| 485 | 93 |
| 486 | 36 |
| 487 | 93 |
| 488 | 47 |
| 489 | 216 |
| 490 | 35 |
| 491 | 4 |
| 492 | 3 |
| 493 | 2 |

| | |
|-----|------|
| 494 | 2 |
| 495 | 7 |
| 496 | 0 |
| 497 | 0 |
| 498 | 0 |
| 499 | 9 |
| 500 | 0 |
| 501 | 0 |
| 502 | 6 |
| 503 | 2 |
| 504 | 13 |
| 505 | 6 |
| 506 | 2 |
| 507 | 0 |
| 508 | 20 |
| 509 | 1 |
| 510 | 76 |
| 511 | 1 |
| 512 | 51 |
| 513 | 41 |
| 514 | 44 |
| 515 | 50 |
| 516 | 10 |
| 517 | 7 |
| 518 | 15 |
| 519 | 6 |
| 520 | 25 |
| 521 | 18 |
| 522 | 17 |
| 523 | 4 |
| 524 | 1 |
| 525 | 9 |
| 526 | 0 |
| 527 | 2 |
| 528 | 0 |
| 529 | 43 |
| 530 | 95 |
| 531 | 22 |
| 532 | 5 |
| 533 | 13 |
| 534 | 46 |
| 535 | 37 |
| 536 | 2418 |

| | |
|-----|-----|
| 537 | 315 |
| 538 | 2 |
| 539 | 1 |
| 540 | 0 |
| 541 | 2 |
| 542 | 4 |
| 543 | 0 |
| 544 | 11 |
| 545 | 0 |
| 546 | 59 |
| 547 | 35 |
| 548 | 0 |
| 549 | 4 |
| 550 | 3 |
| 551 | 6 |
| 552 | 3 |
| 553 | 16 |
| 554 | 83 |
| 555 | 2 |
| 556 | 0 |
| 557 | 3 |
| 558 | 1 |
| 559 | 5 |
| 560 | 8 |
| 561 | 3 |
| 562 | 0 |
| 563 | 0 |
| 564 | 0 |
| 565 | 3 |
| 566 | 0 |
| 567 | 1 |
| 568 | 0 |
| 569 | 7 |
| 570 | 3 |
| 571 | 13 |
| 572 | 7 |
| 573 | 16 |
| 574 | 14 |
| 575 | 7 |
| 576 | 2 |
| 577 | 14 |
| 578 | 0 |
| 579 | 1 |

| | |
|-----|-----|
| 580 | 2 |
| 581 | 62 |
| 582 | 4 |
| 583 | 8 |
| 584 | 3 |
| 585 | 10 |
| 586 | 1 |
| 587 | 0 |
| 588 | 4 |
| 589 | 110 |
| 590 | 1 |
| 591 | 25 |
| 592 | 42 |
| 593 | 86 |
| 594 | 126 |
| 595 | 53 |
| 596 | 0 |
| 597 | 14 |
| 598 | 0 |
| 599 | 6 |
| 600 | 2 |
| 601 | 16 |
| 602 | 4 |
| 603 | 1 |
| 604 | 0 |
| 605 | 14 |
| 606 | 0 |
| 607 | 20 |
| 608 | 1 |
| 609 | 2 |
| 610 | 8 |
| 611 | 13 |
| 612 | 9 |
| 613 | 1 |
| 614 | 8 |
| 615 | 6 |
| 616 | 2 |
| 617 | 0 |
| 618 | 0 |
| 619 | 0 |
| 620 | 1 |
| 621 | 0 |
| 622 | 2 |

| | |
|-----|-----|
| 623 | 5 |
| 624 | 12 |
| 625 | 6 |
| 626 | 1 |
| 627 | 2 |
| 628 | 0 |
| 629 | 395 |
| 630 | 58 |
| 631 | 6 |
| 632 | 0 |
| 633 | 0 |
| 634 | 1 |
| 635 | 0 |
| 636 | 0 |
| 637 | 2 |
| 638 | 7 |
| 639 | 18 |
| 640 | 8 |
| 641 | 7 |
| 642 | 5 |
| 643 | 7 |
| 644 | 5 |
| 645 | 4 |
| 646 | 15 |
| 647 | 2 |
| 648 | 2 |
| 649 | 0 |
| 650 | 0 |
| 651 | 3 |
| 652 | 2 |
| 653 | 14 |
| 654 | 7 |
| 655 | 31 |
| 656 | 19 |
| 657 | 72 |
| 658 | 26 |
| 659 | 112 |
| 660 | 6 |
| 661 | 584 |
| 662 | 75 |
| 663 | 11 |
| 664 | 23 |
| 665 | 3 |

| | |
|-----|-----|
| 666 | 1 |
| 667 | 0 |
| 668 | 0 |
| 669 | 5 |
| 670 | 6 |
| 671 | 100 |
| 672 | 5 |
| 673 | 3 |
| 674 | 5 |
| 675 | 11 |
| 676 | 66 |
| 677 | 5 |
| 678 | 26 |
| 679 | 8 |
| 680 | 23 |
| 681 | 15 |
| 682 | 92 |
| 683 | 57 |
| 684 | 13 |
| 685 | 12 |
| 686 | 2 |
| 687 | 8 |
| 688 | 1 |
| 689 | 1 |
| 690 | 158 |
| 691 | 39 |
| 692 | 8 |
| 693 | 50 |
| 694 | 210 |
| 695 | 9 |
| 696 | 11 |
| 697 | 8 |
| 698 | 0 |
| 699 | 0 |
| 700 | 7 |
| 701 | 5 |
| 702 | 4 |
| 703 | 9 |
| 704 | 3 |
| 705 | 0 |
| 706 | 3 |
| 707 | 1 |
| 708 | 2 |

| | |
|-----|-----|
| 709 | 2 |
| 710 | 0 |
| 711 | 10 |
| 712 | 2 |
| 713 | 0 |
| 714 | 4 |
| 715 | 0 |
| 716 | 2 |
| 717 | 0 |
| 718 | 0 |
| 719 | 1 |
| 720 | 0 |
| 721 | 0 |
| 722 | 4 |
| 723 | 2 |
| 724 | 0 |
| 725 | 2 |
| 726 | 8 |
| 727 | 9 |
| 728 | 2 |
| 729 | 76 |
| 730 | 20 |
| 731 | 25 |
| 732 | 43 |
| 733 | 45 |
| 734 | 71 |
| 735 | 16 |
| 736 | 21 |
| 737 | 478 |
| 738 | 7 |
| 739 | 8 |
| 740 | 2 |
| 741 | 7 |
| 742 | 41 |
| 743 | 0 |
| 744 | 154 |
| 745 | 24 |
| 746 | 23 |
| 747 | 48 |
| 748 | 134 |
| 749 | 82 |
| 750 | 239 |
| 751 | 38 |

| | |
|-----|-----|
| 752 | 48 |
| 753 | 5 |
| 754 | 0 |
| 755 | 0 |
| 756 | 1 |
| 757 | 0 |
| 758 | 21 |
| 759 | 53 |
| 760 | 51 |
| 761 | 63 |
| 762 | 2 |
| 763 | 18 |
| 764 | 2 |
| 765 | 9 |
| 766 | 46 |
| 767 | 59 |
| 768 | 3 |
| 769 | 7 |
| 770 | 16 |
| 771 | 34 |
| 772 | 0 |
| 773 | 1 |
| 774 | 0 |
| 775 | 0 |
| 776 | 0 |
| 777 | 0 |
| 778 | 0 |
| 779 | 0 |
| 780 | 0 |
| 781 | 0 |
| 782 | 0 |
| 783 | 2 |
| 784 | 0 |
| 785 | 0 |
| 786 | 0 |
| 787 | 1 |
| 788 | 0 |
| 789 | 14 |
| 790 | 13 |
| 791 | 597 |
| 792 | 150 |
| 793 | 136 |
| 794 | 17 |

| | |
|-----|----|
| 795 | 22 |
| 796 | 2 |
| 797 | 2 |
| 798 | 0 |
| 799 | 1 |
| 800 | 0 |
| 801 | 0 |
| 802 | 0 |
| 803 | 0 |
| 804 | 0 |
| 805 | 3 |
| 806 | 0 |
| 807 | 0 |
| 808 | 1 |
| 809 | 1 |
| 810 | 0 |
| 811 | 0 |
| 812 | 0 |
| 813 | 0 |
| 814 | 0 |
| 815 | 0 |
| 816 | 0 |
| 817 | 0 |
| 818 | 0 |
| 819 | 0 |
| 820 | 0 |
| 821 | 0 |
| 822 | 0 |
| 823 | 0 |
| 824 | 4 |
| 825 | 24 |
| 826 | 4 |
| 827 | 1 |
| 828 | 0 |
| 829 | 0 |
| 830 | 0 |
| 831 | 0 |
| 832 | 0 |
| 833 | 0 |
| 834 | 1 |
| 835 | 0 |
| 836 | 2 |
| 837 | 1 |

| | |
|-----|----|
| 838 | 0 |
| 839 | 0 |
| 840 | 0 |
| 841 | 21 |
| 842 | 6 |
| 843 | 0 |
| 844 | 0 |
| 845 | 0 |
| 846 | 0 |
| 847 | 0 |
| 848 | 0 |
| 849 | 0 |
| 850 | 2 |
| 851 | 0 |
| 852 | 3 |
| 853 | 4 |
| 854 | 0 |
| 855 | 0 |
| 856 | 0 |
| 857 | 0 |
| 858 | 0 |
| 859 | 0 |
| 860 | 0 |
| 861 | 0 |
| 862 | 0 |
| 863 | 0 |
| 864 | 0 |
| 865 | 0 |
| 866 | 0 |
| 867 | 0 |
| 868 | 0 |
| 869 | 0 |
| 870 | 0 |
| 871 | 0 |
| 872 | 0 |
| 873 | 0 |
| 874 | 0 |
| 875 | 3 |
| 876 | 31 |
| 877 | 15 |
| 878 | 11 |
| 879 | 0 |
| 880 | 8 |

| | |
|-----|-----|
| 881 | 40 |
| 882 | 91 |
| 883 | 4 |
| 884 | 23 |
| 885 | 33 |
| 886 | 83 |
| 887 | 115 |
| 888 | 182 |
| 889 | 130 |
| 890 | 106 |
| 891 | 39 |
| 892 | 162 |
| 893 | 123 |
| 894 | 242 |
| 895 | 63 |
| 896 | 42 |
| 897 | 296 |
| 898 | 16 |
| 899 | 10 |
| 900 | 6 |
| 901 | 1 |
| 902 | 0 |
| 903 | 4 |
| 904 | 23 |
| 905 | 4 |
| 906 | 10 |
| 907 | 20 |
| 908 | 5 |
| 909 | 23 |
| 910 | 586 |
| 911 | 168 |
| 912 | 35 |
| 913 | 2 |
| 914 | 0 |
| 915 | 0 |
| 916 | 0 |
| 917 | 13 |
| 918 | 349 |
| 919 | 8 |
| 920 | 4 |
| 921 | 10 |
| 922 | 15 |
| 923 | 10 |

| | |
|-----|-----|
| 924 | 94 |
| 925 | 4 |
| 926 | 9 |
| 927 | 9 |
| 928 | 1 |
| 929 | 2 |
| 930 | 2 |
| 931 | 20 |
| 932 | 4 |
| 933 | 8 |
| 934 | 8 |
| 935 | 13 |
| 936 | 46 |
| 937 | 17 |
| 938 | 27 |
| 939 | 78 |
| 940 | 25 |
| 941 | 28 |
| 942 | 13 |
| 943 | 5 |
| 944 | 44 |
| 945 | 249 |
| 946 | 8 |
| 947 | 70 |
| 948 | 53 |
| 949 | 36 |
| 950 | 59 |
| 951 | 1 |
| 952 | 121 |
| 953 | 29 |
| 954 | 51 |
| 955 | 104 |
| 956 | 43 |
| 957 | 59 |
| 958 | 391 |
| 959 | 5 |
| 960 | 51 |
| 961 | 10 |
| 962 | 4 |
| 963 | 295 |
| 964 | 11 |
| 965 | 84 |
| 966 | 16 |

| | |
|-----|-----|
| 967 | 13 |
| 968 | 11 |
| 969 | 18 |
| 970 | 11 |
| 971 | 283 |
| 972 | 0 |
| 973 | 1 |

Anexo 3. Posición de la región del lncRNA de la estructura secundaria descrita por Toriz-Bravo et al, 2022 datos sin publicar.

| Posiciones | Total de lecturas |
|------------|-------------------|
| 4308 | 0 |
| 4309 | 0 |
| 4310 | 0 |
| 4311 | 0 |
| 4312 | 0 |
| 4313 | 0 |
| 4314 | 0 |
| 4315 | 0 |
| 4316 | 0 |
| 4317 | 0 |
| 4318 | 0 |
| 4319 | 0 |
| 4320 | 0 |
| 4321 | 0 |
| 4322 | 0 |

| | |
|------|---|
| 4323 | 0 |
| 4324 | 0 |
| 4325 | 0 |
| 4326 | 0 |
| 4327 | 0 |
| 4328 | 0 |
| 4329 | 0 |
| 4330 | 0 |
| 4331 | 0 |
| 4332 | 0 |
| 4333 | 0 |
| 4334 | 0 |
| 4335 | 0 |
| 4336 | 0 |
| 4337 | 0 |
| 4338 | 0 |
| 4339 | 0 |
| 4340 | 0 |
| 4341 | 0 |
| 4342 | 0 |
| 4343 | 0 |
| 4344 | 0 |
| 4345 | 0 |
| 4346 | 0 |

*Posición de inicio de la estructura secundaria

Anexo 4. Total de lecturas en las posiciones del ORF2.

| Posición ORF2 | Total de lecturas |
|----------------------|--------------------------|
| 1241 | 3 |
| 1242 | 1 |
| 1243 | 1 |
| 1244 | 4 |
| 1245 | 226 |
| 1246 | 501 |
| 1247 | 98 |
| 1248 | 5 |
| 1249 | 4 |
| 1250 | 2 |
| 1251 | 2 |
| 1252 | 1 |
| 1253 | 6 |
| 1254 | 10 |
| 1255 | 8 |
| 1256 | 0 |
| 1257 | 0 |
| 1258 | 5 |
| 1259 | 13 |
| 1260 | 18 |
| 1261 | 28 |
| 1263 | 33 |
| 1264 | 66 |
| 1265 | 34 |
| 1266 | 21 |
| 1267 | 36 |
| 1268 | 12 |
| 1269 | 11 |
| 1270 | 4 |
| 1271 | 36 |
| 1272 | 18 |
| 1273 | 16 |
| 1274 | 193 |
| 1275 | 0 |
| 1276 | 59 |
| 1277 | 62 |
| 1278 | 34 |
| 1279 | 81 |
| 1280 | 8 |

| | |
|------|-----|
| 1281 | 48 |
| 1282 | 13 |
| 1283 | 117 |
| 1284 | 3 |
| 1285 | 61 |
| 1286 | 60 |
| 1287 | 59 |
| 1288 | 34 |
| 1289 | 66 |
| 1290 | 95 |
| 1291 | 65 |
| 1292 | 17 |
| 1293 | 335 |
| 1294 | 17 |
| 1295 | 9 |
| 1296 | 7 |
| 1297 | 3 |
| 1298 | 267 |
| 1299 | 7 |
| 1300 | 65 |
| 1301 | 0 |
| 1302 | 0 |
| 1303 | 0 |
| 1304 | 1 |
| 1305 | 6 |
| 1306 | 150 |
| 1307 | 50 |
| 1308 | 145 |
| 1309 | 217 |
| 1310 | 18 |
| 1311 | 231 |
| 1312 | 68 |
| 1313 | 48 |
| 1314 | 16 |
| 1315 | 75 |
| 1316 | 8 |
| 1317 | 13 |
| 1318 | 16 |
| 1319 | 2 |
| 1320 | 2 |
| 1321 | 274 |
| 1322 | 11 |

| | |
|------|-----|
| 1323 | 1 |
| 1324 | 17 |
| 1325 | 27 |
| 1326 | 8 |
| 1327 | 10 |
| 1328 | 2 |
| 1329 | 21 |
| 1330 | 7 |
| 1331 | 12 |
| 1332 | 21 |
| 1333 | 113 |
| 1334 | 21 |
| 1335 | 154 |
| 1336 | 20 |
| 1337 | 5 |
| 1338 | 23 |
| 1339 | 20 |
| 1340 | 5 |
| 1341 | 9 |
| 1342 | 9 |
| 1343 | 14 |
| 1344 | 23 |
| 1345 | 16 |
| 1346 | 20 |
| 1347 | 16 |
| 1348 | 40 |
| 1349 | 7 |
| 1350 | 8 |
| 1351 | 25 |
| 1352 | 23 |
| 1353 | 19 |
| 1354 | 66 |
| 1355 | 10 |
| 1356 | 35 |
| 1357 | 0 |
| 1358 | 41 |
| 1359 | 8 |
| 1360 | 25 |
| 1361 | 6 |
| 1362 | 11 |
| 1363 | 9 |
| 1364 | 14 |

| | |
|------|-----|
| 1365 | 34 |
| 1366 | 15 |
| 1367 | 4 |
| 1368 | 21 |
| 1369 | 18 |
| 1370 | 11 |
| 1371 | 178 |
| 1372 | 16 |
| 1373 | 32 |
| 1374 | 13 |
| 1375 | 93 |
| 1376 | 28 |
| 1377 | 91 |
| 1378 | 51 |
| 1379 | 102 |
| 1381 | 75 |
| 1382 | 76 |
| 1383 | 151 |
| 1384 | 3 |
| 1385 | 9 |
| 1386 | 0 |
| 1387 | 0 |
| 1388 | 0 |
| 1389 | 0 |
| 1390 | 0 |
| 1391 | 0 |
| 1392 | 2 |
| 1393 | 4 |
| 1394 | 14 |
| 1395 | 12 |
| 1396 | 22 |
| 1397 | 111 |
| 1398 | 249 |
| 1399 | 118 |
| 1400 | 120 |
| 1401 | 141 |
| 1403 | 52 |
| 1404 | 41 |
| 1405 | 23 |
| 1406 | 6 |
| 1407 | 4 |
| 1408 | 5 |

| | |
|------|-----|
| 1409 | 75 |
| 1410 | 164 |
| 1411 | 104 |
| 1412 | 7 |
| 1413 | 10 |
| 1414 | 16 |
| 1415 | 0 |
| 1416 | 0 |
| 1417 | 0 |
| 1418 | 0 |
| 1419 | 0 |
| 1420 | 2 |
| 1421 | 1 |
| 1422 | 1 |
| 1423 | 2 |
| 1424 | 13 |
| 1425 | 25 |
| 1426 | 0 |
| 1427 | 0 |
| 1428 | 0 |
| 1429 | 38 |
| 1430 | 98 |
| 1431 | 210 |
| 1432 | 416 |
| 1433 | 751 |
| 1434 | 69 |
| 1435 | 131 |
| 1436 | 8 |
| 1437 | 15 |
| 1438 | 51 |
| 1439 | 63 |
| 1440 | 3 |
| 1441 | 10 |
| 1442 | 27 |
| 1444 | 24 |
| 1445 | 55 |
| 1446 | 8 |
| 1447 | 4 |
| 1448 | 12 |
| 1449 | 10 |
| 1450 | 0 |
| 1451 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 1452 | 4 |
| 1453 | 4 |
| 1454 | 16 |
| 1455 | 13 |
| 1456 | 45 |
| 1457 | 205 |
| 1458 | 60 |
| 1459 | 14 |
| 1460 | 54 |
| 1461 | 8 |
| 1463 | 9 |
| 1464 | 96 |
| 1465 | 36 |
| 1466 | 28 |
| 1467 | 130 |
| 1468 | 0 |
| 1469 | 0 |
| 1470 | 0 |
| 1471 | 1 |
| 1472 | 5 |
| 1473 | 57 |
| 1474 | 3 |
| 1475 | 15 |
| 1476 | 0 |
| 1477 | 8 |
| 1478 | 59 |
| 1479 | 56 |
| 1480 | 53 |
| 1481 | 5 |
| 1482 | 0 |
| 1483 | 7 |
| 1484 | 3 |
| 1485 | 3 |
| 1486 | 29 |
| 1487 | 18 |
| 1488 | 225 |
| 1489 | 2 |
| 1490 | 1 |
| 1491 | 0 |
| 1492 | 3 |
| 1493 | 6 |
| 1494 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 1495 | 28 |
| 1496 | 2 |
| 1497 | 29 |
| 1498 | 7 |
| 1499 | 11 |
| 1500 | 11 |
| 1501 | 5 |
| 1502 | 71 |
| 1503 | 26 |
| 1504 | 35 |
| 1505 | 83 |
| 1506 | 5 |
| 1507 | 13 |
| 1508 | 42 |
| 1509 | 69 |
| 1510 | 54 |
| 1511 | 26 |
| 1512 | 15 |
| 1513 | 53 |
| 1514 | 27 |
| 1515 | 6 |
| 1516 | 28 |
| 1517 | 9 |
| 1518 | 3 |
| 1519 | 10 |
| 1520 | 2 |
| 1521 | 9 |
| 1522 | 38 |
| 1523 | 841 |
| 1524 | 239 |
| 1525 | 53 |
| 1526 | 594 |
| 1527 | 140 |
| 1528 | 240 |
| 1529 | 13 |
| 1530 | 54 |
| 1531 | 1 |
| 1532 | 206 |
| 1533 | 9 |
| 1534 | 0 |
| 1535 | 8 |
| 1536 | 11 |

| | |
|------|-----|
| 1537 | 2 |
| 1538 | 34 |
| 1539 | 8 |
| 1541 | 23 |
| 1542 | 266 |
| 1543 | 216 |
| 1544 | 17 |
| 1545 | 2 |
| 1546 | 23 |
| 1547 | 0 |
| 1548 | 0 |
| 1549 | 0 |
| 1550 | 0 |
| 1551 | 2 |
| 1552 | 6 |
| 1553 | 121 |
| 1554 | 189 |
| 1555 | 30 |
| 1556 | 37 |
| 1557 | 4 |
| 1558 | 90 |
| 1559 | 52 |
| 1560 | 161 |
| 1561 | 1 |
| 1562 | 0 |
| 1563 | 0 |
| 1564 | 0 |
| 1565 | 0 |
| 1566 | 3 |
| 1567 | 3 |
| 1568 | 5 |
| 1569 | 0 |
| 1570 | 7 |
| 1571 | 4 |
| 1572 | 4 |
| 1573 | 19 |
| 1574 | 9 |
| 1575 | 27 |
| 1576 | 13 |
| 1577 | 95 |
| 1578 | 60 |
| 1579 | 73 |

| | |
|------|-----|
| 1580 | 135 |
| 1581 | 73 |
| 1582 | 60 |
| 1583 | 48 |
| 1584 | 23 |
| 1585 | 13 |
| 1586 | 41 |
| 1587 | 383 |
| 1588 | 62 |
| 1589 | 399 |
| 1590 | 14 |
| 1591 | 29 |
| 1592 | 4 |
| 1593 | 5 |
| 1594 | 17 |
| 1595 | 7 |
| 1596 | 4 |
| 1597 | 438 |
| 1598 | 162 |
| 1599 | 12 |
| 1600 | 11 |
| 1601 | 0 |
| 1602 | 0 |
| 1603 | 10 |
| 1604 | 0 |
| 1605 | 23 |
| 1606 | 70 |
| 1607 | 15 |
| 1608 | 76 |
| 1609 | 17 |
| 1610 | 16 |
| 1611 | 26 |
| 1612 | 18 |
| 1613 | 19 |
| 1614 | 104 |
| 1615 | 98 |
| 1616 | 220 |
| 1617 | 248 |
| 1618 | 32 |
| 1619 | 0 |
| 1620 | 11 |
| 1621 | 21 |

| | |
|------|-----|
| 1622 | 73 |
| 1623 | 54 |
| 1624 | 43 |
| 1625 | 15 |
| 1626 | 11 |
| 1627 | 78 |
| 1628 | 290 |
| 1629 | 48 |
| 1630 | 7 |
| 1631 | 0 |
| 1632 | 79 |
| 1633 | 3 |
| 1634 | 2 |
| 1635 | 11 |
| 1636 | 41 |
| 1637 | 3 |
| 1638 | 16 |
| 1639 | 10 |
| 1640 | 45 |
| 1641 | 17 |
| 1642 | 149 |
| 1643 | 13 |
| 1644 | 9 |
| 1645 | 5 |
| 1646 | 4 |
| 1647 | 59 |
| 1648 | 33 |
| 1649 | 2 |
| 1650 | 0 |
| 1651 | 0 |
| 1652 | 0 |
| 1653 | 0 |
| 1654 | 2 |
| 1655 | 0 |
| 1656 | 0 |
| 1657 | 4 |
| 1658 | 10 |
| 1659 | 8 |
| 1660 | 26 |
| 1662 | 80 |
| 1663 | 69 |
| 1664 | 110 |

| | |
|------|-----|
| 1665 | 31 |
| 1666 | 16 |
| 1667 | 23 |
| 1668 | 24 |
| 1669 | 36 |
| 1670 | 114 |
| 1671 | 22 |
| 1672 | 2 |
| 1673 | 48 |
| 1674 | 127 |
| 1675 | 44 |
| 1676 | 1 |
| 1677 | 2 |
| 1678 | 28 |
| 1679 | 19 |
| 1681 | 224 |
| 1682 | 44 |
| 1683 | 0 |
| 1684 | 24 |
| 1685 | 12 |
| 1686 | 5 |
| 1687 | 56 |
| 1688 | 34 |
| 1689 | 34 |
| 1690 | 62 |
| 1691 | 33 |
| 1692 | 21 |
| 1693 | 10 |
| 1694 | 13 |
| 1695 | 22 |
| 1696 | 5 |
| 1697 | 1 |
| 1698 | 4 |
| 1699 | 50 |
| 1700 | 2 |
| 1701 | 3 |
| 1702 | 47 |
| 1703 | 17 |
| 1704 | 13 |
| 1705 | 45 |
| 1706 | 6 |
| 1707 | 11 |

| | |
|------|-----|
| 1708 | 8 |
| 1709 | 15 |
| 1710 | 385 |
| 1711 | 38 |
| 1712 | 10 |
| 1713 | 42 |
| 1714 | 14 |
| 1715 | 23 |
| 1716 | 103 |
| 1717 | 64 |
| 1719 | 154 |
| 1720 | 5 |
| 1721 | 7 |
| 1722 | 4 |
| 1723 | 374 |
| 1724 | 33 |
| 1725 | 59 |
| 1726 | 433 |
| 1727 | 306 |
| 1728 | 20 |
| 1730 | 546 |
| 1731 | 54 |
| 1732 | 4 |
| 1733 | 33 |
| 1734 | 200 |
| 1735 | 18 |
| 1736 | 58 |
| 1737 | 159 |
| 1738 | 18 |
| 1739 | 298 |
| 1740 | 8 |
| 1741 | 136 |
| 1742 | 46 |
| 1744 | 103 |
| 1748 | 90 |
| 1750 | 9 |
| 1751 | 553 |
| 1752 | 37 |
| 1753 | 269 |
| 1754 | 20 |
| 1755 | 50 |
| 1756 | 17 |

| | |
|------|-----|
| 1757 | 417 |
| 1758 | 149 |
| 1759 | 54 |
| 1760 | 187 |
| 1761 | 522 |
| 1762 | 4 |
| 1763 | 238 |
| 1764 | 1 |
| 1765 | 14 |
| 1766 | 4 |
| 1767 | 0 |
| 1768 | 0 |
| 1769 | 0 |
| 1770 | 1 |
| 1771 | 0 |
| 1772 | 234 |
| 1774 | 40 |
| 1775 | 1 |
| 1776 | 160 |
| 1777 | 124 |
| 1778 | 100 |
| 1779 | 39 |
| 1780 | 30 |
| 1781 | 13 |
| 1782 | 27 |
| 1784 | 57 |
| 1785 | 5 |
| 1786 | 36 |
| 1787 | 1 |
| 1788 | 17 |
| 1789 | 0 |
| 1790 | 5 |
| 1791 | 2 |
| 1792 | 0 |
| 1793 | 0 |
| 1794 | 6 |
| 1795 | 38 |
| 1796 | 41 |
| 1797 | 41 |
| 1798 | 34 |
| 1799 | 81 |
| 1800 | 22 |

| | |
|------|-----|
| 1801 | 286 |
| 1802 | 53 |
| 1803 | 202 |
| 1804 | 7 |
| 1805 | 42 |
| 1806 | 21 |
| 1807 | 1 |
| 1808 | 2 |
| 1809 | 0 |
| 1810 | 0 |
| 1811 | 0 |
| 1812 | 0 |
| 1813 | 0 |
| 1814 | 0 |
| 1815 | 0 |
| 1816 | 0 |
| 1817 | 0 |
| 1818 | 53 |
| 1819 | 36 |
| 1820 | 2 |
| 1821 | 1 |
| 1822 | 45 |
| 1823 | 20 |
| 1824 | 19 |
| 1825 | 2 |
| 1826 | 51 |
| 1827 | 138 |
| 1828 | 24 |
| 1829 | 6 |
| 1830 | 17 |
| 1831 | 21 |
| 1832 | 97 |
| 1833 | 8 |
| 1834 | 47 |
| 1835 | 8 |
| 1836 | 43 |
| 1837 | 30 |
| 1838 | 78 |
| 1839 | 52 |
| 1840 | 57 |
| 1841 | 595 |
| 1842 | 42 |

| | |
|------|-----|
| 1843 | 9 |
| 1844 | 16 |
| 1845 | 164 |
| 1846 | 48 |
| 1847 | 15 |
| 1848 | 9 |
| 1849 | 7 |
| 1850 | 0 |
| 1851 | 0 |
| 1852 | 0 |
| 1853 | 1 |
| 1854 | 0 |
| 1855 | 0 |
| 1856 | 0 |
| 1857 | 0 |
| 1858 | 0 |
| 1859 | 0 |
| 1860 | 0 |
| 1861 | 0 |
| 1862 | 16 |
| 1863 | 0 |
| 1864 | 5 |
| 1865 | 95 |
| 1866 | 6 |
| 1867 | 91 |
| 1868 | 2 |
| 1869 | 2 |
| 1870 | 0 |
| 1871 | 0 |
| 1872 | 0 |
| 1873 | 3 |
| 1874 | 0 |
| 1875 | 5 |
| 1876 | 4 |
| 1877 | 8 |
| 1878 | 3 |
| 1879 | 14 |
| 1880 | 28 |
| 1881 | 9 |
| 1882 | 20 |
| 1883 | 6 |
| 1884 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 1885 | 3 |
| 1886 | 0 |
| 1887 | 4 |
| 1888 | 8 |
| 1889 | 1 |
| 1890 | 8 |
| 1891 | 2 |
| 1892 | 0 |
| 1893 | 3 |
| 1894 | 12 |
| 1895 | 1 |
| 1896 | 12 |
| 1897 | 44 |
| 1898 | 6 |
| 1899 | 348 |
| 1900 | 1 |
| 1901 | 16 |
| 1902 | 2 |
| 1903 | 1 |
| 1904 | 3 |
| 1905 | 104 |
| 1906 | 28 |
| 1907 | 0 |
| 1908 | 7 |
| 1909 | 5 |
| 1910 | 0 |
| 1911 | 0 |
| 1912 | 5 |
| 1913 | 1 |
| 1914 | 11 |
| 1915 | 27 |
| 1916 | 10 |
| 1917 | 141 |
| 1918 | 35 |
| 1919 | 29 |
| 1920 | 40 |
| 1921 | 27 |
| 1922 | 3 |
| 1923 | 44 |
| 1924 | 3 |
| 1925 | 46 |
| 1926 | 13 |

| | |
|------|-----|
| 1927 | 3 |
| 1928 | 403 |
| 1929 | 221 |
| 1930 | 11 |
| 1931 | 3 |
| 1932 | 0 |
| 1933 | 0 |
| 1934 | 0 |
| 1935 | 0 |
| 1936 | 0 |
| 1937 | 0 |
| 1938 | 0 |
| 1939 | 0 |
| 1940 | 0 |
| 1941 | 0 |
| 1942 | 0 |
| 1943 | 0 |
| 1944 | 0 |
| 1945 | 0 |
| 1946 | 0 |
| 1947 | 0 |
| 1948 | 0 |
| 1949 | 1 |
| 1950 | 0 |
| 1951 | 19 |
| 1952 | 0 |
| 1953 | 8 |
| 1954 | 0 |
| 1955 | 8 |
| 1956 | 5 |
| 1957 | 2 |
| 1958 | 2 |
| 1959 | 2 |
| 1960 | 0 |
| 1961 | 0 |
| 1962 | 0 |
| 1963 | 5 |
| 1964 | 36 |
| 1965 | 1 |
| 1966 | 3 |
| 1967 | 0 |
| 1968 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 1969 | 1 |
| 1970 | 1 |
| 1971 | 4 |
| 1972 | 0 |
| 1973 | 0 |
| 1974 | 0 |
| 1975 | 0 |
| 1976 | 0 |
| 1977 | 0 |
| 1978 | 0 |
| 1979 | 0 |
| 1980 | 0 |
| 1981 | 0 |
| 1982 | 0 |
| 1983 | 0 |
| 1984 | 0 |
| 1985 | 0 |
| 1986 | 4 |
| 1987 | 0 |
| 1988 | 0 |
| 1989 | 5 |
| 1990 | 23 |
| 1991 | 24 |
| 1992 | 50 |
| 1993 | 96 |
| 1994 | 29 |
| 1995 | 731 |
| 1996 | 318 |
| 1997 | 99 |
| 1998 | 4 |
| 1999 | 24 |
| 2000 | 79 |
| 2001 | 538 |
| 2005 | 81 |
| 2006 | 5 |
| 2007 | 13 |
| 2008 | 1 |
| 2009 | 7 |
| 2010 | 0 |
| 2011 | 0 |
| 2012 | 0 |
| 2013 | 0 |

| | |
|------|----|
| 2014 | 0 |
| 2015 | 0 |
| 2016 | 0 |
| 2017 | 0 |
| 2018 | 0 |
| 2019 | 0 |
| 2020 | 0 |
| 2021 | 0 |
| 2022 | 0 |
| 2023 | 0 |
| 2024 | 0 |
| 2025 | 0 |
| 2026 | 0 |
| 2027 | 0 |
| 2028 | 0 |
| 2029 | 0 |
| 2030 | 0 |
| 2031 | 0 |
| 2032 | 0 |
| 2033 | 0 |
| 2034 | 0 |
| 2035 | 0 |
| 2036 | 0 |
| 2037 | 0 |
| 2038 | 0 |
| 2039 | 0 |
| 2040 | 0 |
| 2041 | 0 |
| 2042 | 0 |
| 2043 | 0 |
| 2044 | 0 |
| 2045 | 0 |
| 2046 | 0 |
| 2047 | 0 |
| 2048 | 0 |
| 2049 | 0 |
| 2050 | 4 |
| 2051 | 7 |
| 2052 | 42 |
| 2053 | 61 |
| 2054 | 0 |
| 2055 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2056 | 0 |
| 2057 | 160 |
| 2058 | 20 |
| 2059 | 55 |
| 2060 | 67 |
| 2061 | 2 |
| 2062 | 171 |
| 2063 | 10 |
| 2064 | 3 |
| 2065 | 187 |
| 2066 | 39 |
| 2067 | 58 |
| 2068 | 146 |
| 2069 | 3 |
| 2070 | 114 |
| 2071 | 7 |
| 2072 | 210 |
| 2073 | 27 |
| 2074 | 5 |
| 2076 | 6 |
| 2077 | 242 |
| 2078 | 46 |
| 2079 | 5 |
| 2080 | 96 |
| 2081 | 1 |
| 2082 | 24 |
| 2083 | 307 |
| 2084 | 80 |
| 2085 | 365 |
| 2086 | 62 |
| 2087 | 76 |
| 2088 | 19 |
| 2089 | 26 |
| 2090 | 12 |
| 2091 | 6 |
| 2092 | 6 |
| 2093 | 1 |
| 2094 | 11 |
| 2095 | 11 |
| 2096 | 55 |
| 2097 | 79 |
| 2098 | 47 |

| | |
|------|-----|
| 2099 | 7 |
| 2100 | 5 |
| 2101 | 5 |
| 2102 | 2 |
| 2103 | 11 |
| 2104 | 10 |
| 2105 | 7 |
| 2107 | 108 |
| 2108 | 6 |
| 2109 | 94 |
| 2110 | 6 |
| 2111 | 28 |
| 2112 | 2 |
| 2113 | 88 |
| 2114 | 139 |
| 2115 | 67 |
| 2116 | 13 |
| 2117 | 129 |
| 2118 | 6 |
| 2119 | 168 |
| 2120 | 17 |
| 2121 | 21 |
| 2122 | 2 |
| 2123 | 7 |
| 2124 | 15 |
| 2125 | 8 |
| 2126 | 3 |
| 2127 | 51 |
| 2128 | 149 |
| 2129 | 11 |
| 2130 | 13 |
| 2131 | 8 |
| 2132 | 77 |
| 2133 | 17 |
| 2134 | 8 |
| 2135 | 5 |
| 2136 | 1 |
| 2137 | 17 |
| 2138 | 9 |
| 2139 | 7 |
| 2140 | 9 |
| 2141 | 1 |

| | |
|------|-----|
| 2142 | 25 |
| 2143 | 31 |
| 2144 | 121 |
| 2145 | 158 |
| 2146 | 164 |
| 2148 | 466 |
| 2150 | 479 |
| 2151 | 138 |
| 2152 | 173 |
| 2153 | 353 |
| 2155 | 28 |
| 2156 | 188 |
| 2157 | 81 |
| 2158 | 17 |
| 2159 | 311 |
| 2160 | 131 |
| 2161 | 159 |
| 2162 | 8 |
| 2163 | 24 |
| 2164 | 45 |
| 2165 | 56 |
| 2166 | 15 |
| 2167 | 75 |
| 2168 | 8 |
| 2169 | 3 |
| 2170 | 1 |
| 2171 | 22 |
| 2172 | 3 |
| 2173 | 3 |
| 2174 | 3 |
| 2175 | 305 |
| 2176 | 36 |
| 2177 | 6 |
| 2178 | 23 |
| 2179 | 87 |
| 2180 | 15 |
| 2181 | 17 |
| 2182 | 4 |
| 2183 | 11 |
| 2184 | 6 |
| 2185 | 23 |
| 2186 | 1 |

| | |
|------|-----|
| 2187 | 5 |
| 2188 | 0 |
| 2189 | 0 |
| 2190 | 12 |
| 2191 | 86 |
| 2192 | 318 |
| 2193 | 159 |
| 2194 | 21 |
| 2195 | 0 |
| 2196 | 25 |
| 2197 | 3 |
| 2198 | 1 |
| 2199 | 0 |
| 2200 | 0 |
| 2201 | 0 |
| 2202 | 0 |
| 2203 | 0 |
| 2204 | 0 |
| 2205 | 0 |
| 2206 | 0 |
| 2207 | 0 |
| 2208 | 0 |
| 2209 | 0 |
| 2210 | 0 |
| 2211 | 0 |
| 2212 | 1 |
| 2213 | 7 |
| 2214 | 51 |
| 2215 | 147 |
| 2216 | 40 |
| 2217 | 71 |
| 2218 | 25 |
| 2219 | 31 |
| 2220 | 223 |
| 2221 | 3 |
| 2222 | 133 |
| 2223 | 58 |
| 2224 | 1 |
| 2225 | 0 |
| 2226 | 0 |
| 2227 | 24 |
| 2228 | 171 |

| | |
|------|-----|
| 2229 | 1 |
| 2230 | 53 |
| 2231 | 49 |
| 2232 | 180 |
| 2233 | 2 |
| 2234 | 35 |
| 2235 | 11 |
| 2236 | 81 |
| 2237 | 50 |
| 2238 | 49 |
| 2239 | 23 |
| 2240 | 4 |
| 2241 | 4 |
| 2242 | 2 |
| 2243 | 35 |
| 2244 | 31 |
| 2245 | 37 |
| 2246 | 8 |
| 2247 | 10 |
| 2248 | 12 |
| 2249 | 29 |
| 2250 | 9 |
| 2251 | 0 |
| 2252 | 74 |
| 2253 | 1 |
| 2254 | 41 |
| 2255 | 34 |
| 2256 | 970 |
| 2257 | 188 |
| 2258 | 194 |
| 2259 | 45 |
| 2260 | 5 |
| 2261 | 7 |
| 2262 | 2 |
| 2263 | 0 |
| 2264 | 1 |
| 2265 | 1 |
| 2266 | 0 |
| 2267 | 0 |
| 2268 | 0 |
| 2269 | 0 |
| 2270 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2271 | 0 |
| 2272 | 0 |
| 2273 | 0 |
| 2274 | 0 |
| 2275 | 9 |
| 2276 | 1 |
| 2277 | 27 |
| 2278 | 8 |
| 2279 | 5 |
| 2280 | 49 |
| 2281 | 144 |
| 2282 | 44 |
| 2283 | 0 |
| 2284 | 12 |
| 2285 | 1 |
| 2286 | 17 |
| 2287 | 83 |
| 2288 | 4 |
| 2289 | 0 |
| 2290 | 1 |
| 2291 | 0 |
| 2292 | 0 |
| 2293 | 2 |
| 2294 | 3 |
| 2295 | 49 |
| 2296 | 0 |
| 2297 | 2 |
| 2298 | 0 |
| 2299 | 0 |
| 2300 | 0 |
| 2301 | 2 |
| 2302 | 0 |
| 2303 | 0 |
| 2304 | 0 |
| 2305 | 0 |
| 2306 | 1 |
| 2307 | 0 |
| 2308 | 0 |
| 2309 | 0 |
| 2310 | 0 |
| 2311 | 0 |
| 2312 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2313 | 0 |
| 2314 | 0 |
| 2315 | 0 |
| 2316 | 0 |
| 2317 | 0 |
| 2318 | 0 |
| 2319 | 0 |
| 2320 | 2 |
| 2321 | 92 |
| 2322 | 33 |
| 2323 | 221 |
| 2324 | 45 |
| 2325 | 53 |
| 2326 | 3 |
| 2327 | 0 |
| 2328 | 0 |
| 2329 | 0 |
| 2330 | 0 |
| 2331 | 0 |
| 2332 | 0 |
| 2333 | 52 |
| 2334 | 29 |
| 2335 | 0 |
| 2336 | 1 |
| 2337 | 2 |
| 2338 | 12 |
| 2339 | 2 |
| 2340 | 11 |
| 2341 | 2 |
| 2342 | 33 |
| 2343 | 3 |
| 2344 | 0 |
| 2345 | 0 |
| 2346 | 0 |
| 2347 | 0 |
| 2348 | 2 |
| 2349 | 4 |
| 2350 | 65 |
| 2351 | 58 |
| 2352 | 114 |
| 2353 | 4 |
| 2354 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2355 | 1 |
| 2356 | 7 |
| 2357 | 12 |
| 2358 | 207 |
| 2359 | 72 |
| 2360 | 2 |
| 2361 | 0 |
| 2362 | 0 |
| 2363 | 0 |
| 2364 | 0 |
| 2365 | 0 |
| 2366 | 0 |
| 2367 | 0 |
| 2368 | 0 |
| 2369 | 0 |
| 2370 | 0 |
| 2371 | 0 |
| 2372 | 0 |
| 2373 | 2 |
| 2374 | 0 |
| 2375 | 0 |
| 2376 | 0 |
| 2377 | 0 |
| 2378 | 0 |
| 2379 | 0 |
| 2380 | 0 |
| 2381 | 0 |
| 2382 | 0 |
| 2383 | 1 |
| 2384 | 0 |
| 2385 | 0 |
| 2386 | 0 |
| 2387 | 0 |
| 2388 | 0 |
| 2389 | 0 |
| 2390 | 0 |
| 2391 | 0 |
| 2392 | 0 |
| 2393 | 0 |
| 2394 | 7 |
| 2395 | 4 |
| 2396 | 5 |

| | |
|------|---|
| 2397 | 8 |
| 2398 | 0 |
| 2399 | 0 |
| 2400 | 0 |
| 2401 | 0 |
| 2402 | 0 |
| 2403 | 0 |
| 2404 | 0 |
| 2405 | 0 |
| 2406 | 0 |
| 2407 | 0 |
| 2408 | 0 |
| 2409 | 0 |
| 2410 | 0 |
| 2411 | 0 |
| 2412 | 0 |
| 2413 | 0 |
| 2414 | 0 |
| 2415 | 0 |
| 2416 | 0 |
| 2417 | 0 |
| 2418 | 0 |
| 2419 | 0 |
| 2420 | 0 |
| 2421 | 0 |
| 2422 | 0 |
| 2423 | 0 |
| 2424 | 0 |
| 2425 | 0 |
| 2426 | 0 |
| 2427 | 0 |
| 2428 | 0 |
| 2429 | 0 |
| 2430 | 0 |
| 2431 | 0 |
| 2432 | 0 |
| 2433 | 0 |
| 2434 | 0 |
| 2435 | 3 |
| 2436 | 8 |
| 2437 | 4 |
| 2438 | 5 |

| | |
|------|-----|
| 2439 | 2 |
| 2440 | 6 |
| 2441 | 29 |
| 2442 | 17 |
| 2443 | 61 |
| 2444 | 157 |
| 2445 | 6 |
| 2446 | 1 |

Anexo 5. Total de lecturas en la región intergénica.

| POSICIÓN REGIÓN INTERGENICA | TOTAL DE LECTURAS |
|------------------------------------|--------------------------|
| 974 | 1 |
| 975 | 156 |
| 976 | 7 |
| 977 | 11 |
| 978 | 0 |
| 979 | 59 |
| 980 | 4 |
| 981 | 29 |
| 982 | 14 |
| 983 | 7 |
| 984 | 5 |
| 985 | 2 |
| 986 | 2 |
| 987 | 39 |
| 988 | 0 |
| 989 | 6 |
| 990 | 8 |
| 991 | 44 |
| 992 | 241 |
| 993 | 14 |
| 994 | 21 |
| 995 | 3 |
| 996 | 62 |
| 997 | 0 |
| 998 | 5 |
| 999 | 56 |
| 1000 | 35 |
| 1001 | 0 |
| 1002 | 0 |
| 1003 | 4 |
| 1004 | 11 |
| 1005 | 0 |
| 1006 | 5 |
| 1007 | 8 |
| 1008 | 5 |
| 1009 | 12 |
| 1010 | 5 |
| 1011 | 5 |
| 1012 | 0 |

| | |
|------|------|
| 1013 | 4 |
| 1014 | 4 |
| 1015 | 20 |
| 1016 | 0 |
| 1017 | 3 |
| 1018 | 1 |
| 1019 | 3 |
| 1020 | 22 |
| 1021 | 6 |
| 1022 | 5 |
| 1023 | 70 |
| 1024 | 11 |
| 1025 | 41 |
| 1026 | 5 |
| 1027 | 3 |
| 1028 | 5 |
| 1029 | 8 |
| 1030 | 7 |
| 1031 | 18 |
| 1032 | 0 |
| 1033 | 6 |
| 1034 | 37 |
| 1035 | 10 |
| 1036 | 10 |
| 1037 | 1 |
| 1038 | 1 |
| 1039 | 8 |
| 1040 | 3 |
| 1041 | 4 |
| 1042 | 1 |
| 1043 | 4 |
| 1044 | 0 |
| 1045 | 14 |
| 1046 | 1 |
| 1047 | 11 |
| 1048 | 13 |
| 1049 | 50 |
| 1050 | 18 |
| 1051 | 162 |
| 1052 | 55 |
| 1053 | 1487 |
| 1054 | 45 |

| | |
|------|-----|
| 1055 | 17 |
| 1056 | 91 |
| 1057 | 17 |
| 1058 | 15 |
| 1059 | 33 |
| 1060 | 6 |
| 1061 | 48 |
| 1062 | 75 |
| 1063 | 5 |
| 1064 | 1 |
| 1065 | 41 |
| 1066 | 6 |
| 1067 | 30 |
| 1068 | 5 |
| 1069 | 20 |
| 1070 | 8 |
| 1071 | 188 |
| 1072 | 46 |
| 1073 | 35 |
| 1074 | 0 |
| 1075 | 1 |
| 1076 | 0 |
| 1077 | 0 |
| 1078 | 5 |
| 1079 | 7 |
| 1080 | 1 |
| 1081 | 70 |
| 1082 | 2 |
| 1083 | 5 |
| 1084 | 44 |
| 1085 | 25 |
| 1086 | 46 |
| 1087 | 9 |
| 1088 | 17 |
| 1089 | 9 |
| 1090 | 0 |
| 1091 | 19 |
| 1092 | 2 |
| 1093 | 8 |
| 1094 | 306 |
| 1095 | 89 |
| 1096 | 109 |

| | |
|------|------|
| 1097 | 374 |
| 1098 | 340 |
| 1099 | 310 |
| 1100 | 433 |
| 1102 | 10 |
| 1103 | 45 |
| 1104 | 17 |
| 1105 | 61 |
| 1106 | 59 |
| 1107 | 76 |
| 1108 | 44 |
| 1109 | 11 |
| 1110 | 0 |
| 1111 | 0 |
| 1112 | 5 |
| 1113 | 91 |
| 1114 | 489 |
| 1115 | 8 |
| 1116 | 28 |
| 1117 | 22 |
| 1118 | 27 |
| 1119 | 114 |
| 1120 | 265 |
| 1121 | 101 |
| 1122 | 76 |
| 1123 | 38 |
| 1124 | 63 |
| 1125 | 4 |
| 1126 | 79 |
| 1127 | 44 |
| 1128 | 0 |
| 1129 | 12 |
| 1130 | 8 |
| 1131 | 9 |
| 1132 | 5 |
| 1133 | 7 |
| 1134 | 25 |
| 1135 | 23 |
| 1136 | 709 |
| 1137 | 696 |
| 1138 | 1548 |
| 1139 | 113 |

| | |
|------|-----|
| 1140 | 2 |
| 1141 | 11 |
| 1142 | 0 |
| 1143 | 134 |
| 1144 | 5 |
| 1145 | 91 |
| 1146 | 9 |
| 1147 | 121 |
| 1148 | 10 |
| 1149 | 2 |
| 1150 | 2 |
| 1151 | 4 |
| 1152 | 8 |
| 1153 | 4 |
| 1154 | 7 |
| 1155 | 3 |
| 1156 | 9 |
| 1157 | 57 |
| 1158 | 12 |
| 1159 | 15 |
| 1160 | 133 |
| 1161 | 6 |
| 1162 | 7 |
| 1163 | 9 |
| 1164 | 0 |
| 1165 | 3 |
| 1166 | 0 |
| 1167 | 1 |
| 1168 | 2 |
| 1169 | 0 |
| 1170 | 7 |
| 1171 | 2 |
| 1172 | 6 |
| 1173 | 2 |
| 1174 | 2 |
| 1175 | 3 |
| 1176 | 1 |
| 1177 | 8 |
| 1178 | 20 |
| 1179 | 36 |
| 1180 | 17 |
| 1181 | 3 |

| | |
|------|------|
| 1182 | 2 |
| 1183 | 5 |
| 1184 | 46 |
| 1185 | 84 |
| 1186 | 18 |
| 1187 | 54 |
| 1188 | 15 |
| 1189 | 70 |
| 1190 | 30 |
| 1191 | 52 |
| 1192 | 103 |
| 1193 | 327 |
| 1194 | 343 |
| 1195 | 24 |
| 1196 | 20 |
| 1197 | 32 |
| 1198 | 98 |
| 1199 | 181 |
| 1200 | 6 |
| 1201 | 32 |
| 1202 | 22 |
| 1203 | 36 |
| 1204 | 163 |
| 1205 | 52 |
| 1206 | 77 |
| 1207 | 310 |
| 1208 | 1255 |
| 1209 | 104 |
| 1210 | 58 |
| 1211 | 218 |
| 1212 | 4 |
| 1213 | 4 |
| 1214 | 0 |
| 1215 | 10 |
| 1216 | 112 |
| 1217 | 16 |
| 1218 | 113 |
| 1219 | 9 |
| 1220 | 146 |
| 1221 | 39 |
| 1222 | 25 |
| 1223 | 1 |

| | |
|------|----|
| 1224 | 26 |
| 1225 | 0 |
| 1226 | 0 |
| 1227 | 1 |
| 1228 | 0 |
| 1229 | 0 |
| 1230 | 0 |
| 1231 | 0 |
| 1232 | 0 |
| 1233 | 0 |
| 1234 | 0 |
| 1235 | 0 |
| 1236 | 18 |
| 1237 | 4 |
| 1238 | 3 |
| 1239 | 11 |
| 1240 | 12 |

Anexo 6. Total de lecturas en la posición lncRNA.

| Posiciones lncRNA | Total de abundancia |
|--------------------------|----------------------------|
| 2448 | 2 |
| 2449 | 9 |
| 2450 | 5 |
| 2451 | 3 |
| 2452 | 7 |
| 2453 | 0 |
| 2454 | 2 |
| 2455 | 19 |
| 2456 | 0 |
| 2457 | 0 |
| 2458 | 4 |
| 2459 | 1 |
| 2460 | 2 |
| 2461 | 5 |
| 2462 | 3 |
| 2463 | 2 |
| 2464 | 9 |
| 2465 | 73 |
| 2466 | 17 |
| 2467 | 16 |
| 2468 | 75 |
| 2469 | 13 |
| 2470 | 4 |
| 2471 | 0 |
| 2472 | 9 |
| 2473 | 1 |
| 2474 | 0 |
| 2475 | 0 |
| 2476 | 0 |
| 2477 | 0 |
| 2478 | 0 |
| 2479 | 0 |
| 2480 | 0 |
| 2481 | 0 |
| 2482 | 0 |
| 2483 | 0 |
| 2484 | 0 |
| 2485 | 0 |
| 2486 | 0 |
| 2487 | 0 |
| 2488 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2489 | 0 |
| 2490 | 0 |
| 2491 | 0 |
| 2492 | 0 |
| 2493 | 36 |
| 2494 | 16 |
| 2495 | 26 |
| 2496 | 41 |
| 2497 | 143 |
| 2498 | 277 |
| 2499 | 57 |
| 2500 | 31 |
| 2501 | 26 |
| 2502 | 53 |
| 2503 | 50 |
| 2504 | 27 |
| 2505 | 27 |
| 2506 | 223 |
| 2507 | 46 |
| 2508 | 444 |
| 2509 | 331 |
| 2511 | 122 |
| 2513 | 382 |
| 2518 | 86 |
| 2519 | 14 |
| 2520 | 1 |
| 2521 | 0 |
| 2522 | 0 |
| 2523 | 1 |
| 2524 | 0 |
| 2525 | 1 |
| 2526 | 0 |
| 2527 | 0 |
| 2528 | 0 |
| 2529 | 0 |
| 2530 | 0 |
| 2531 | 0 |
| 2532 | 0 |
| 2533 | 0 |
| 2534 | 0 |
| 2535 | 0 |
| 2536 | 0 |

| | |
|------|---|
| 2537 | 0 |
| 2538 | 0 |
| 2539 | 0 |
| 2540 | 0 |
| 2541 | 0 |
| 2542 | 0 |
| 2543 | 0 |
| 2544 | 0 |
| 2545 | 0 |
| 2546 | 0 |
| 2547 | 0 |
| 2548 | 0 |
| 2549 | 0 |
| 2550 | 0 |
| 2551 | 0 |
| 2552 | 0 |
| 2553 | 0 |
| 2554 | 0 |
| 2555 | 0 |
| 2556 | 0 |
| 2557 | 0 |
| 2558 | 0 |
| 2559 | 0 |
| 2560 | 0 |
| 2561 | 0 |
| 2562 | 0 |
| 2563 | 0 |
| 2564 | 0 |
| 2565 | 0 |
| 2566 | 0 |
| 2567 | 0 |
| 2568 | 0 |
| 2569 | 0 |
| 2570 | 0 |
| 2571 | 0 |
| 2572 | 0 |
| 2573 | 0 |
| 2574 | 0 |
| 2575 | 0 |
| 2576 | 0 |
| 2577 | 0 |
| 2578 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2579 | 0 |
| 2580 | 0 |
| 2581 | 0 |
| 2582 | 0 |
| 2583 | 0 |
| 2584 | 0 |
| 2585 | 0 |
| 2586 | 0 |
| 2587 | 0 |
| 2588 | 0 |
| 2589 | 0 |
| 2590 | 0 |
| 2591 | 0 |
| 2592 | 0 |
| 2593 | 0 |
| 2594 | 0 |
| 2595 | 0 |
| 2596 | 0 |
| 2597 | 0 |
| 2598 | 0 |
| 2599 | 0 |
| 2600 | 2 |
| 2601 | 5 |
| 2602 | 4 |
| 2603 | 12 |
| 2604 | 10 |
| 2605 | 48 |
| 2606 | 8 |
| 2607 | 19 |
| 2608 | 17 |
| 2609 | 103 |
| 2610 | 18 |
| 2611 | 14 |
| 2612 | 3 |
| 2613 | 107 |
| 2614 | 1 |
| 2615 | 0 |
| 2616 | 0 |
| 2617 | 0 |
| 2618 | 0 |
| 2619 | 0 |
| 2620 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2621 | 0 |
| 2622 | 0 |
| 2623 | 0 |
| 2624 | 0 |
| 2625 | 0 |
| 2626 | 0 |
| 2627 | 0 |
| 2628 | 0 |
| 2629 | 0 |
| 2630 | 0 |
| 2631 | 0 |
| 2632 | 0 |
| 2633 | 0 |
| 2634 | 0 |
| 2635 | 0 |
| 2636 | 4 |
| 2637 | 1 |
| 2638 | 3 |
| 2639 | 23 |
| 2640 | 18 |
| 2641 | 7 |
| 2642 | 25 |
| 2643 | 3 |
| 2644 | 173 |
| 2645 | 1 |
| 2646 | 37 |
| 2647 | 3 |
| 2648 | 205 |
| 2649 | 6 |
| 2650 | 6 |
| 2651 | 1 |
| 2652 | 605 |
| 2653 | 0 |
| 2654 | 78 |
| 2655 | 0 |
| 2656 | 0 |
| 2657 | 9 |
| 2658 | 2 |
| 2659 | 1 |
| 2660 | 14 |
| 2661 | 311 |
| 2663 | 139 |

| | |
|------|-----|
| 2664 | 4 |
| 2665 | 53 |
| 2666 | 3 |
| 2667 | 4 |
| 2668 | 5 |
| 2669 | 223 |
| 2670 | 159 |
| 2671 | 6 |
| 2672 | 390 |
| 2673 | 300 |
| 2675 | 71 |
| 2676 | 547 |
| 2677 | 251 |
| 2678 | 82 |
| 2679 | 95 |
| 2680 | 0 |
| 2681 | 0 |
| 2682 | 1 |
| 2683 | 0 |
| 2684 | 0 |
| 2685 | 0 |
| 2686 | 0 |
| 2687 | 0 |
| 2688 | 0 |
| 2689 | 0 |
| 2690 | 0 |
| 2691 | 0 |
| 2692 | 0 |
| 2693 | 0 |
| 2694 | 0 |
| 2695 | 0 |
| 2696 | 0 |
| 2697 | 0 |
| 2698 | 0 |
| 2699 | 0 |
| 2700 | 0 |
| 2701 | 0 |
| 2702 | 0 |
| 2703 | 3 |
| 2704 | 30 |
| 2705 | 16 |
| 2706 | 292 |

| | |
|------|-----|
| 2707 | 56 |
| 2709 | 539 |
| 2710 | 50 |
| 2711 | 9 |
| 2712 | 11 |
| 2713 | 76 |
| 2714 | 7 |
| 2715 | 1 |
| 2716 | 21 |
| 2717 | 22 |
| 2718 | 79 |
| 2719 | 264 |
| 2720 | 55 |
| 2721 | 12 |
| 2722 | 0 |
| 2723 | 0 |
| 2724 | 0 |
| 2725 | 0 |
| 2726 | 0 |
| 2727 | 0 |
| 2728 | 0 |
| 2729 | 0 |
| 2730 | 0 |
| 2731 | 0 |
| 2732 | 0 |
| 2733 | 0 |
| 2734 | 0 |
| 2735 | 0 |
| 2736 | 0 |
| 2737 | 0 |
| 2738 | 0 |
| 2739 | 0 |
| 2740 | 0 |
| 2741 | 0 |
| 2742 | 0 |
| 2743 | 0 |
| 2744 | 0 |
| 2745 | 0 |
| 2746 | 0 |
| 2747 | 0 |
| 2748 | 0 |
| 2749 | 0 |

| | |
|------|---|
| 2750 | 0 |
| 2751 | 0 |
| 2752 | 0 |
| 2753 | 0 |
| 2754 | 0 |
| 2755 | 0 |
| 2756 | 0 |
| 2757 | 0 |
| 2758 | 0 |
| 2759 | 0 |
| 2760 | 0 |
| 2761 | 0 |
| 2762 | 0 |
| 2763 | 0 |
| 2764 | 0 |
| 2765 | 0 |
| 2766 | 0 |
| 2767 | 0 |
| 2768 | 0 |
| 2769 | 0 |
| 2770 | 0 |
| 2771 | 0 |
| 2772 | 0 |
| 2773 | 0 |
| 2774 | 0 |
| 2775 | 0 |
| 2776 | 0 |
| 2777 | 0 |
| 2778 | 0 |
| 2779 | 0 |
| 2780 | 0 |
| 2781 | 0 |
| 2782 | 0 |
| 2783 | 0 |
| 2784 | 0 |
| 2785 | 0 |
| 2786 | 0 |
| 2787 | 0 |
| 2788 | 0 |
| 2789 | 0 |
| 2790 | 0 |
| 2791 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2792 | 0 |
| 2793 | 0 |
| 2794 | 0 |
| 2795 | 0 |
| 2796 | 0 |
| 2797 | 0 |
| 2798 | 0 |
| 2799 | 0 |
| 2800 | 0 |
| 2801 | 0 |
| 2802 | 0 |
| 2803 | 0 |
| 2804 | 1 |
| 2805 | 89 |
| 2806 | 85 |
| 2807 | 30 |
| 2808 | 17 |
| 2809 | 2 |
| 2810 | 10 |
| 2811 | 40 |
| 2812 | 60 |
| 2813 | 40 |
| 2814 | 116 |
| 2815 | 8 |
| 2816 | 23 |
| 2817 | 27 |
| 2818 | 6 |
| 2819 | 3 |
| 2820 | 0 |
| 2821 | 0 |
| 2822 | 1 |
| 2823 | 16 |
| 2824 | 3 |
| 2825 | 9 |
| 2826 | 14 |
| 2827 | 8 |
| 2828 | 21 |
| 2829 | 8 |
| 2830 | 94 |
| 2831 | 50 |
| 2832 | 208 |
| 2833 | 193 |

| | |
|------|-----|
| 2834 | 5 |
| 2835 | 233 |
| 2836 | 20 |
| 2837 | 83 |
| 2838 | 261 |
| 2839 | 10 |
| 2840 | 0 |
| 2841 | 0 |
| 2842 | 0 |
| 2843 | 1 |
| 2844 | 1 |
| 2845 | 1 |
| 2846 | 13 |
| 2847 | 14 |
| 2848 | 6 |
| 2849 | 50 |
| 2850 | 67 |
| 2851 | 131 |
| 2852 | 19 |
| 2853 | 430 |
| 2854 | 12 |
| 2855 | 0 |
| 2856 | 183 |
| 2857 | 7 |
| 2858 | 1 |
| 2859 | 0 |
| 2860 | 6 |
| 2861 | 25 |
| 2862 | 56 |
| 2863 | 15 |
| 2864 | 35 |
| 2865 | 10 |
| 2866 | 55 |
| 2867 | 9 |
| 2868 | 91 |
| 2869 | 100 |
| 2870 | 63 |
| 2871 | 85 |
| 2872 | 71 |
| 2873 | 20 |
| 2874 | 19 |
| 2875 | 62 |

| | |
|------|-----|
| 2876 | 74 |
| 2877 | 398 |
| 2878 | 20 |
| 2879 | 68 |
| 2880 | 291 |
| 2881 | 16 |
| 2882 | 0 |
| 2883 | 0 |
| 2884 | 0 |
| 2885 | 0 |
| 2886 | 0 |
| 2887 | 0 |
| 2888 | 0 |
| 2889 | 0 |
| 2890 | 0 |
| 2891 | 0 |
| 2892 | 0 |
| 2893 | 0 |
| 2894 | 0 |
| 2895 | 0 |
| 2896 | 0 |
| 2897 | 0 |
| 2898 | 0 |
| 2899 | 0 |
| 2900 | 0 |
| 2901 | 0 |
| 2902 | 0 |
| 2903 | 12 |
| 2904 | 14 |
| 2905 | 0 |
| 2906 | 0 |
| 2907 | 0 |
| 2908 | 0 |
| 2909 | 0 |
| 2910 | 1 |
| 2911 | 0 |
| 2912 | 0 |
| 2913 | 0 |
| 2914 | 0 |
| 2915 | 0 |
| 2916 | 0 |
| 2917 | 0 |

| | |
|------|---|
| 2918 | 0 |
| 2919 | 0 |
| 2920 | 0 |
| 2921 | 0 |
| 2922 | 0 |
| 2923 | 0 |
| 2924 | 0 |
| 2925 | 0 |
| 2926 | 0 |
| 2927 | 0 |
| 2928 | 0 |
| 2929 | 0 |
| 2930 | 0 |
| 2931 | 0 |
| 2932 | 0 |
| 2933 | 0 |
| 2934 | 0 |
| 2935 | 0 |
| 2936 | 0 |
| 2937 | 0 |
| 2938 | 0 |
| 2939 | 0 |
| 2940 | 0 |
| 2941 | 0 |
| 2942 | 0 |
| 2943 | 0 |
| 2944 | 0 |
| 2945 | 0 |
| 2946 | 0 |
| 2947 | 0 |
| 2948 | 0 |
| 2949 | 0 |
| 2950 | 0 |
| 2951 | 0 |
| 2952 | 0 |
| 2953 | 0 |
| 2954 | 0 |
| 2955 | 0 |
| 2956 | 0 |
| 2957 | 0 |
| 2958 | 0 |
| 2959 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 2960 | 0 |
| 2961 | 0 |
| 2962 | 0 |
| 2963 | 0 |
| 2964 | 0 |
| 2965 | 0 |
| 2966 | 0 |
| 2967 | 0 |
| 2968 | 0 |
| 2969 | 0 |
| 2970 | 0 |
| 2971 | 0 |
| 2972 | 0 |
| 2973 | 0 |
| 2974 | 0 |
| 2975 | 0 |
| 2976 | 16 |
| 2977 | 127 |
| 2978 | 76 |
| 2979 | 15 |
| 2980 | 9 |
| 2981 | 75 |
| 2982 | 32 |
| 2983 | 6 |
| 2984 | 5 |
| 2985 | 2 |
| 2986 | 17 |
| 2987 | 19 |
| 2988 | 16 |
| 2989 | 348 |
| 2990 | 5 |
| 2991 | 12 |
| 2992 | 334 |
| 2993 | 20 |
| 2994 | 60 |
| 2995 | 217 |
| 2996 | 17 |
| 2997 | 26 |
| 2998 | 3 |
| 2999 | 7 |
| 3000 | 31 |
| 3001 | 9 |

| | |
|------|----|
| 3002 | 6 |
| 3003 | 2 |
| 3004 | 5 |
| 3005 | 9 |
| 3006 | 29 |
| 3007 | 4 |
| 3008 | 3 |
| 3009 | 1 |
| 3010 | 1 |
| 3011 | 3 |
| 3012 | 0 |
| 3013 | 4 |
| 3014 | 1 |
| 3015 | 0 |
| 3016 | 6 |
| 3017 | 81 |
| 3018 | 17 |
| 3019 | 6 |
| 3020 | 0 |
| 3021 | 0 |
| 3022 | 0 |
| 3023 | 0 |
| 3024 | 0 |
| 3025 | 0 |
| 3026 | 0 |
| 3027 | 0 |
| 3028 | 0 |
| 3029 | 0 |
| 3030 | 0 |
| 3031 | 0 |
| 3032 | 0 |
| 3033 | 0 |
| 3034 | 0 |
| 3035 | 0 |
| 3036 | 0 |
| 3037 | 0 |
| 3038 | 0 |
| 3039 | 0 |
| 3040 | 0 |
| 3041 | 0 |
| 3042 | 0 |
| 3043 | 0 |

| | |
|------|---|
| 3044 | 0 |
| 3045 | 0 |
| 3046 | 0 |
| 3047 | 0 |
| 3048 | 0 |
| 3049 | 0 |
| 3050 | 0 |
| 3051 | 0 |
| 3052 | 0 |
| 3053 | 0 |
| 3054 | 0 |
| 3055 | 0 |
| 3056 | 0 |
| 3057 | 0 |
| 3058 | 0 |
| 3059 | 0 |
| 3060 | 0 |
| 3061 | 0 |
| 3062 | 0 |
| 3063 | 0 |
| 3064 | 0 |
| 3065 | 0 |
| 3066 | 0 |
| 3067 | 0 |
| 3068 | 0 |
| 3069 | 0 |
| 3070 | 0 |
| 3071 | 0 |
| 3072 | 0 |
| 3073 | 0 |
| 3074 | 0 |
| 3075 | 0 |
| 3076 | 0 |
| 3077 | 0 |
| 3078 | 0 |
| 3079 | 0 |
| 3080 | 0 |
| 3081 | 0 |
| 3082 | 0 |
| 3083 | 0 |
| 3084 | 0 |
| 3085 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3086 | 0 |
| 3087 | 0 |
| 3088 | 0 |
| 3089 | 0 |
| 3090 | 0 |
| 3091 | 0 |
| 3092 | 0 |
| 3093 | 0 |
| 3094 | 0 |
| 3095 | 0 |
| 3096 | 0 |
| 3097 | 0 |
| 3098 | 0 |
| 3099 | 0 |
| 3100 | 0 |
| 3101 | 0 |
| 3102 | 0 |
| 3103 | 0 |
| 3104 | 0 |
| 3105 | 0 |
| 3106 | 0 |
| 3107 | 0 |
| 3108 | 0 |
| 3109 | 0 |
| 3110 | 0 |
| 3111 | 0 |
| 3112 | 0 |
| 3113 | 0 |
| 3114 | 0 |
| 3115 | 0 |
| 3116 | 0 |
| 3117 | 0 |
| 3118 | 0 |
| 3119 | 0 |
| 3120 | 0 |
| 3121 | 0 |
| 3122 | 0 |
| 3123 | 0 |
| 3124 | 9 |
| 3125 | 43 |
| 3126 | 0 |
| 3127 | 116 |

| | |
|------|---|
| 3128 | 1 |
| 3129 | 0 |
| 3130 | 3 |
| 3131 | 8 |
| 3132 | 0 |
| 3133 | 0 |
| 3134 | 0 |
| 3135 | 0 |
| 3136 | 0 |
| 3137 | 0 |
| 3138 | 0 |
| 3139 | 0 |
| 3140 | 0 |
| 3141 | 0 |
| 3142 | 0 |
| 3143 | 0 |
| 3144 | 0 |
| 3145 | 0 |
| 3146 | 0 |
| 3147 | 0 |
| 3148 | 0 |
| 3149 | 0 |
| 3150 | 0 |
| 3151 | 0 |
| 3152 | 0 |
| 3153 | 0 |
| 3154 | 0 |
| 3155 | 0 |
| 3156 | 0 |
| 3157 | 0 |
| 3158 | 0 |
| 3159 | 0 |
| 3160 | 0 |
| 3161 | 0 |
| 3162 | 0 |
| 3163 | 0 |
| 3164 | 0 |
| 3165 | 0 |
| 3166 | 0 |
| 3167 | 0 |
| 3168 | 0 |
| 3169 | 0 |

| | |
|------|---|
| 3170 | 0 |
| 3171 | 0 |
| 3172 | 0 |
| 3173 | 0 |
| 3174 | 0 |
| 3175 | 0 |
| 3176 | 0 |
| 3177 | 0 |
| 3178 | 0 |
| 3179 | 0 |
| 3180 | 0 |
| 3181 | 0 |
| 3182 | 0 |
| 3183 | 0 |
| 3184 | 0 |
| 3185 | 0 |
| 3186 | 0 |
| 3187 | 0 |
| 3188 | 0 |
| 3189 | 0 |
| 3190 | 0 |
| 3191 | 0 |
| 3192 | 0 |
| 3193 | 0 |
| 3194 | 0 |
| 3195 | 0 |
| 3196 | 0 |
| 3197 | 0 |
| 3198 | 0 |
| 3199 | 0 |
| 3200 | 0 |
| 3201 | 0 |
| 3202 | 0 |
| 3203 | 0 |
| 3204 | 0 |
| 3205 | 0 |
| 3206 | 0 |
| 3207 | 0 |
| 3208 | 0 |
| 3209 | 0 |
| 3210 | 0 |
| 3211 | 0 |

| | |
|------|---|
| 3212 | 0 |
| 3213 | 0 |
| 3214 | 0 |
| 3215 | 0 |
| 3216 | 0 |
| 3217 | 0 |
| 3218 | 0 |
| 3219 | 0 |
| 3220 | 0 |
| 3221 | 0 |
| 3222 | 0 |
| 3223 | 0 |
| 3224 | 0 |
| 3225 | 0 |
| 3226 | 0 |
| 3227 | 0 |
| 3228 | 0 |
| 3229 | 0 |
| 3230 | 0 |
| 3231 | 0 |
| 3232 | 0 |
| 3233 | 0 |
| 3234 | 0 |
| 3235 | 0 |
| 3236 | 0 |
| 3237 | 0 |
| 3238 | 0 |
| 3239 | 0 |
| 3240 | 0 |
| 3241 | 0 |
| 3242 | 0 |
| 3243 | 0 |
| 3244 | 0 |
| 3245 | 0 |
| 3246 | 0 |
| 3247 | 0 |
| 3248 | 0 |
| 3249 | 0 |
| 3250 | 0 |
| 3251 | 0 |
| 3252 | 0 |
| 3253 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3254 | 0 |
| 3255 | 0 |
| 3256 | 0 |
| 3257 | 0 |
| 3258 | 0 |
| 3259 | 0 |
| 3260 | 0 |
| 3261 | 0 |
| 3262 | 0 |
| 3263 | 57 |
| 3264 | 0 |
| 3265 | 6 |
| 3266 | 659 |
| 3267 | 33 |
| 3268 | 3 |
| 3269 | 0 |
| 3270 | 0 |
| 3271 | 0 |
| 3272 | 0 |
| 3273 | 0 |
| 3274 | 0 |
| 3275 | 0 |
| 3276 | 0 |
| 3277 | 0 |
| 3278 | 0 |
| 3279 | 0 |
| 3280 | 0 |
| 3281 | 0 |
| 3282 | 0 |
| 3283 | 0 |
| 3284 | 0 |
| 3285 | 0 |
| 3286 | 0 |
| 3287 | 0 |
| 3288 | 0 |
| 3289 | 0 |
| 3290 | 0 |
| 3291 | 0 |
| 3292 | 0 |
| 3293 | 0 |
| 3294 | 0 |
| 3295 | 0 |

| | |
|------|---|
| 3296 | 0 |
| 3297 | 0 |
| 3298 | 0 |
| 3299 | 0 |
| 3300 | 0 |
| 3301 | 0 |
| 3302 | 0 |
| 3303 | 0 |
| 3304 | 0 |
| 3305 | 0 |
| 3306 | 0 |
| 3307 | 0 |
| 3308 | 0 |
| 3309 | 0 |
| 3310 | 0 |
| 3311 | 0 |
| 3312 | 0 |
| 3313 | 0 |
| 3314 | 0 |
| 3315 | 0 |
| 3316 | 0 |
| 3317 | 0 |
| 3318 | 0 |
| 3319 | 0 |
| 3320 | 0 |
| 3321 | 0 |
| 3322 | 0 |
| 3323 | 0 |
| 3324 | 0 |
| 3325 | 0 |
| 3326 | 0 |
| 3327 | 0 |
| 3328 | 0 |
| 3329 | 0 |
| 3330 | 0 |
| 3331 | 0 |
| 3332 | 0 |
| 3333 | 0 |
| 3334 | 0 |
| 3335 | 0 |
| 3336 | 0 |
| 3337 | 0 |

| | |
|------|----|
| 3338 | 0 |
| 3339 | 0 |
| 3340 | 0 |
| 3341 | 0 |
| 3342 | 0 |
| 3343 | 0 |
| 3344 | 0 |
| 3345 | 0 |
| 3346 | 0 |
| 3347 | 0 |
| 3348 | 0 |
| 3349 | 0 |
| 3350 | 0 |
| 3351 | 1 |
| 3352 | 6 |
| 3353 | 6 |
| 3354 | 0 |
| 3355 | 0 |
| 3356 | 0 |
| 3357 | 0 |
| 3358 | 0 |
| 3359 | 0 |
| 3360 | 0 |
| 3361 | 0 |
| 3362 | 0 |
| 3363 | 0 |
| 3364 | 0 |
| 3365 | 0 |
| 3366 | 0 |
| 3367 | 0 |
| 3368 | 0 |
| 3369 | 0 |
| 3370 | 0 |
| 3371 | 0 |
| 3372 | 0 |
| 3373 | 0 |
| 3374 | 1 |
| 3375 | 24 |
| 3376 | 5 |
| 3377 | 20 |
| 3378 | 49 |
| 3379 | 25 |

| | |
|------|-----|
| 3380 | 18 |
| 3381 | 6 |
| 3382 | 32 |
| 3383 | 76 |
| 3384 | 229 |
| 3385 | 35 |
| 3386 | 309 |
| 3387 | 682 |
| 3390 | 282 |
| 3391 | 261 |
| 3392 | 289 |
| 3393 | 331 |
| 3394 | 42 |
| 3395 | 11 |
| 3396 | 8 |
| 3397 | 14 |
| 3398 | 1 |
| 3399 | 20 |
| 3400 | 26 |
| 3401 | 1 |
| 3402 | 0 |
| 3403 | 0 |
| 3404 | 0 |
| 3405 | 5 |
| 3406 | 0 |
| 3407 | 3 |
| 3408 | 0 |
| 3409 | 0 |
| 3410 | 0 |
| 3411 | 0 |
| 3412 | 0 |
| 3413 | 0 |
| 3414 | 0 |
| 3415 | 1 |
| 3416 | 0 |
| 3417 | 0 |
| 3418 | 0 |
| 3419 | 19 |
| 3420 | 58 |
| 3421 | 31 |
| 3422 | 89 |
| 3423 | 90 |

| | |
|------|-----|
| 3424 | 34 |
| 3425 | 467 |
| 3427 | 46 |
| 3428 | 23 |
| 3429 | 0 |
| 3430 | 0 |
| 3431 | 28 |
| 3432 | 46 |
| 3433 | 54 |
| 3434 | 58 |
| 3435 | 119 |
| 3436 | 11 |
| 3437 | 0 |
| 3438 | 0 |
| 3439 | 0 |
| 3440 | 0 |
| 3441 | 0 |
| 3442 | 0 |
| 3443 | 0 |
| 3444 | 0 |
| 3445 | 0 |
| 3446 | 9 |
| 3447 | 4 |
| 3448 | 4 |
| 3449 | 0 |
| 3450 | 0 |
| 3451 | 0 |
| 3452 | 0 |
| 3453 | 0 |
| 3454 | 0 |
| 3455 | 0 |
| 3456 | 0 |
| 3457 | 0 |
| 3458 | 1 |
| 3459 | 1 |
| 3460 | 11 |
| 3461 | 2 |
| 3462 | 3 |
| 3463 | 2 |
| 3464 | 0 |
| 3465 | 6 |
| 3466 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3467 | 1 |
| 3468 | 0 |
| 3469 | 120 |
| 3470 | 32 |
| 3471 | 20 |
| 3472 | 24 |
| 3473 | 32 |
| 3474 | 3 |
| 3475 | 54 |
| 3476 | 4 |
| 3477 | 14 |
| 3478 | 28 |
| 3479 | 28 |
| 3480 | 49 |
| 3481 | 36 |
| 3482 | 5 |
| 3483 | 59 |
| 3484 | 3 |
| 3485 | 150 |
| 3486 | 146 |
| 3487 | 23 |
| 3488 | 31 |
| 3489 | 11 |
| 3490 | 5 |
| 3491 | 577 |
| 3492 | 31 |
| 3493 | 241 |
| 3494 | 67 |
| 3495 | 39 |
| 3496 | 8 |
| 3497 | 1 |
| 3498 | 105 |
| 3499 | 10 |
| 3500 | 6 |
| 3501 | 7 |
| 3502 | 0 |
| 3503 | 15 |
| 3504 | 4 |
| 3506 | 980 |
| 3507 | 208 |
| 3508 | 19 |
| 3509 | 18 |

| | |
|------|-----|
| 3510 | 0 |
| 3511 | 0 |
| 3512 | 0 |
| 3513 | 2 |
| 3514 | 2 |
| 3515 | 4 |
| 3516 | 1 |
| 3517 | 101 |
| 3518 | 24 |
| 3519 | 171 |
| 3520 | 55 |
| 3521 | 129 |
| 3522 | 16 |
| 3523 | 5 |
| 3524 | 13 |
| 3525 | 3 |
| 3526 | 1 |
| 3527 | 0 |
| 3528 | 0 |
| 3529 | 0 |
| 3530 | 9 |
| 3531 | 11 |
| 3532 | 64 |
| 3533 | 13 |
| 3534 | 12 |
| 3535 | 50 |
| 3536 | 25 |
| 3537 | 167 |
| 3538 | 589 |
| 3541 | 170 |
| 3542 | 82 |
| 3543 | 14 |
| 3544 | 423 |
| 3545 | 142 |
| 3546 | 75 |
| 3547 | 574 |
| 3548 | 660 |
| 3549 | 55 |
| 3550 | 42 |
| 3552 | 53 |
| 3553 | 31 |
| 3554 | 14 |

| | |
|------|-----|
| 3555 | 14 |
| 3556 | 13 |
| 3557 | 6 |
| 3558 | 218 |
| 3559 | 31 |
| 3560 | 39 |
| 3561 | 18 |
| 3562 | 8 |
| 3563 | 52 |
| 3564 | 31 |
| 3565 | 41 |
| 3566 | 323 |
| 3567 | 86 |
| 3568 | 884 |
| 3569 | 13 |
| 3570 | 37 |
| 3571 | 663 |
| 3572 | 261 |
| 3573 | 1 |
| 3574 | 0 |
| 3575 | 0 |
| 3576 | 0 |
| 3577 | 0 |
| 3578 | 0 |
| 3579 | 0 |
| 3580 | 0 |
| 3581 | 0 |
| 3582 | 0 |
| 3583 | 0 |
| 3584 | 0 |
| 3585 | 0 |
| 3586 | 0 |
| 3587 | 1 |
| 3588 | 0 |
| 3589 | 0 |
| 3590 | 0 |
| 3591 | 0 |
| 3592 | 0 |
| 3593 | 0 |
| 3594 | 0 |
| 3595 | 0 |
| 3596 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3597 | 0 |
| 3598 | 0 |
| 3599 | 0 |
| 3600 | 0 |
| 3601 | 0 |
| 3602 | 0 |
| 3603 | 0 |
| 3604 | 0 |
| 3605 | 0 |
| 3606 | 0 |
| 3607 | 0 |
| 3608 | 0 |
| 3609 | 0 |
| 3610 | 0 |
| 3611 | 0 |
| 3612 | 1 |
| 3613 | 17 |
| 3614 | 26 |
| 3615 | 9 |
| 3616 | 11 |
| 3617 | 1 |
| 3618 | 1 |
| 3619 | 2 |
| 3620 | 4 |
| 3621 | 52 |
| 3622 | 4 |
| 3623 | 259 |
| 3624 | 57 |
| 3625 | 110 |
| 3626 | 317 |
| 3627 | 65 |
| 3628 | 86 |
| 3629 | 51 |
| 3632 | 191 |
| 3633 | 109 |
| 3634 | 360 |
| 3635 | 526 |
| 3637 | 223 |
| 3638 | 13 |
| 3639 | 11 |
| 3640 | 9 |
| 3641 | 2 |

| | |
|------|-----|
| 3642 | 1 |
| 3643 | 91 |
| 3644 | 13 |
| 3645 | 8 |
| 3646 | 3 |
| 3647 | 24 |
| 3648 | 18 |
| 3649 | 44 |
| 3650 | 7 |
| 3651 | 1 |
| 3652 | 5 |
| 3653 | 2 |
| 3654 | 1 |
| 3655 | 4 |
| 3656 | 1 |
| 3657 | 12 |
| 3658 | 2 |
| 3659 | 21 |
| 3660 | 25 |
| 3661 | 63 |
| 3662 | 519 |
| 3664 | 153 |
| 3666 | 159 |
| 3667 | 23 |
| 3669 | 238 |
| 3670 | 9 |
| 3671 | 81 |
| 3672 | 30 |
| 3673 | 450 |
| 3674 | 64 |
| 3675 | 128 |
| 3676 | 194 |
| 3677 | 162 |
| 3678 | 4 |
| 3679 | 2 |
| 3680 | 19 |
| 3681 | 3 |
| 3682 | 0 |
| 3683 | 5 |
| 3684 | 0 |
| 3685 | 4 |
| 3686 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3687 | 0 |
| 3688 | 0 |
| 3689 | 2 |
| 3690 | 0 |
| 3691 | 0 |
| 3692 | 0 |
| 3693 | 0 |
| 3694 | 0 |
| 3695 | 0 |
| 3696 | 0 |
| 3697 | 0 |
| 3698 | 0 |
| 3699 | 0 |
| 3700 | 0 |
| 3701 | 0 |
| 3702 | 0 |
| 3703 | 0 |
| 3704 | 69 |
| 3705 | 18 |
| 3706 | 5 |
| 3707 | 343 |
| 3708 | 23 |
| 3709 | 0 |
| 3710 | 2 |
| 3711 | 0 |
| 3712 | 0 |
| 3713 | 0 |
| 3714 | 4 |
| 3715 | 15 |
| 3716 | 10 |
| 3717 | 73 |
| 3718 | 722 |
| 3719 | 36 |
| 3720 | 104 |
| 3721 | 12 |
| 3722 | 448 |
| 3723 | 99 |
| 3724 | 21 |
| 3725 | 8 |
| 3726 | 127 |
| 3727 | 547 |
| 3728 | 232 |

| | |
|------|-----|
| 3729 | 93 |
| 3730 | 9 |
| 3731 | 4 |
| 3732 | 27 |
| 3733 | 0 |
| 3734 | 0 |
| 3735 | 0 |
| 3736 | 0 |
| 3737 | 0 |
| 3738 | 28 |
| 3739 | 197 |
| 3740 | 8 |
| 3741 | 30 |
| 3742 | 11 |
| 3743 | 13 |
| 3744 | 11 |
| 3745 | 8 |
| 3746 | 8 |
| 3747 | 8 |
| 3748 | 2 |
| 3749 | 3 |
| 3750 | 3 |
| 3751 | 20 |
| 3752 | 6 |
| 3753 | 17 |
| 3754 | 10 |
| 3755 | 3 |
| 3756 | 1 |
| 3757 | 12 |
| 3758 | 1 |
| 3759 | 5 |
| 3760 | 2 |
| 3761 | 2 |
| 3762 | 0 |
| 3763 | 0 |
| 3764 | 0 |
| 3765 | 0 |
| 3766 | 0 |
| 3767 | 0 |
| 3768 | 0 |
| 3769 | 0 |
| 3770 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3771 | 0 |
| 3772 | 0 |
| 3773 | 0 |
| 3774 | 0 |
| 3775 | 0 |
| 3776 | 0 |
| 3777 | 0 |
| 3778 | 1 |
| 3779 | 8 |
| 3780 | 218 |
| 3781 | 54 |
| 3782 | 159 |
| 3783 | 27 |
| 3784 | 114 |
| 3785 | 160 |
| 3786 | 297 |
| 3787 | 33 |
| 3788 | 28 |
| 3789 | 1 |
| 3790 | 4 |
| 3791 | 3 |
| 3792 | 0 |
| 3793 | 0 |
| 3794 | 0 |
| 3795 | 0 |
| 3796 | 0 |
| 3797 | 0 |
| 3798 | 0 |
| 3799 | 0 |
| 3800 | 0 |
| 3801 | 0 |
| 3802 | 0 |
| 3803 | 1 |
| 3804 | 0 |
| 3805 | 0 |
| 3806 | 0 |
| 3807 | 0 |
| 3808 | 57 |
| 3809 | 46 |
| 3810 | 18 |
| 3811 | 91 |
| 3812 | 78 |

| | |
|------|-----|
| 3813 | 63 |
| 3814 | 23 |
| 3815 | 16 |
| 3816 | 9 |
| 3817 | 2 |
| 3818 | 0 |
| 3819 | 0 |
| 3820 | 0 |
| 3821 | 0 |
| 3822 | 0 |
| 3823 | 0 |
| 3824 | 2 |
| 3825 | 0 |
| 3826 | 2 |
| 3827 | 5 |
| 3828 | 12 |
| 3829 | 2 |
| 3830 | 3 |
| 3831 | 1 |
| 3832 | 2 |
| 3833 | 5 |
| 3834 | 0 |
| 3835 | 1 |
| 3836 | 0 |
| 3837 | 0 |
| 3838 | 0 |
| 3839 | 0 |
| 3840 | 0 |
| 3841 | 0 |
| 3842 | 0 |
| 3843 | 0 |
| 3844 | 0 |
| 3845 | 0 |
| 3846 | 0 |
| 3847 | 0 |
| 3848 | 0 |
| 3849 | 0 |
| 3850 | 0 |
| 3851 | 54 |
| 3852 | 87 |
| 3853 | 26 |
| 3854 | 422 |

| | |
|------|-----|
| 3855 | 20 |
| 3856 | 12 |
| 3857 | 9 |
| 3858 | 1 |
| 3859 | 17 |
| 3860 | 4 |
| 3861 | 639 |
| 3862 | 375 |
| 3863 | 305 |
| 3864 | 34 |
| 3865 | 4 |
| 3866 | 1 |
| 3867 | 1 |
| 3868 | 31 |
| 3869 | 18 |
| 3870 | 12 |
| 3871 | 5 |
| 3872 | 6 |
| 3873 | 1 |
| 3874 | 2 |
| 3875 | 1 |
| 3876 | 18 |
| 3877 | 11 |
| 3878 | 4 |
| 3879 | 1 |
| 3880 | 1 |
| 3881 | 32 |
| 3882 | 0 |
| 3883 | 36 |
| 3884 | 55 |
| 3885 | 20 |
| 3886 | 36 |
| 3887 | 4 |
| 3888 | 1 |
| 3889 | 0 |
| 3890 | 2 |
| 3891 | 1 |
| 3892 | 10 |
| 3893 | 7 |
| 3894 | 13 |
| 3895 | 261 |
| 3896 | 672 |

| | |
|------|-----|
| 3897 | 1 |
| 3898 | 265 |
| 3899 | 859 |
| 3900 | 903 |
| 3901 | 4 |
| 3902 | 9 |
| 3903 | 12 |
| 3904 | 5 |
| 3905 | 0 |
| 3906 | 0 |
| 3907 | 0 |
| 3908 | 0 |
| 3909 | 0 |
| 3910 | 0 |
| 3911 | 0 |
| 3912 | 0 |
| 3913 | 0 |
| 3914 | 0 |
| 3915 | 0 |
| 3916 | 0 |
| 3917 | 0 |
| 3918 | 0 |
| 3919 | 0 |
| 3920 | 0 |
| 3921 | 0 |
| 3922 | 0 |
| 3923 | 0 |
| 3924 | 0 |
| 3925 | 0 |
| 3926 | 0 |
| 3927 | 0 |
| 3928 | 0 |
| 3929 | 0 |
| 3930 | 0 |
| 3931 | 0 |
| 3932 | 0 |
| 3933 | 0 |
| 3934 | 0 |
| 3935 | 0 |
| 3936 | 0 |
| 3937 | 0 |
| 3938 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3939 | 0 |
| 3940 | 0 |
| 3941 | 0 |
| 3942 | 0 |
| 3943 | 0 |
| 3944 | 0 |
| 3945 | 0 |
| 3946 | 0 |
| 3947 | 0 |
| 3948 | 0 |
| 3949 | 0 |
| 3950 | 0 |
| 3951 | 0 |
| 3952 | 0 |
| 3953 | 0 |
| 3954 | 2 |
| 3955 | 0 |
| 3956 | 0 |
| 3957 | 15 |
| 3958 | 27 |
| 3959 | 6 |
| 3960 | 0 |
| 3961 | 3 |
| 3962 | 5 |
| 3963 | 16 |
| 3964 | 19 |
| 3965 | 33 |
| 3966 | 379 |
| 3967 | 188 |
| 3968 | 354 |
| 3969 | 244 |
| 3970 | 6 |
| 3971 | 422 |
| 3972 | 6 |
| 3974 | 3 |
| 3975 | 4 |
| 3976 | 0 |
| 3977 | 0 |
| 3978 | 0 |
| 3979 | 0 |
| 3980 | 0 |
| 3981 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 3982 | 0 |
| 3983 | 0 |
| 3984 | 0 |
| 3985 | 0 |
| 3986 | 0 |
| 3987 | 0 |
| 3988 | 0 |
| 3989 | 0 |
| 3990 | 0 |
| 3991 | 0 |
| 3992 | 0 |
| 3993 | 0 |
| 3994 | 0 |
| 3995 | 0 |
| 3996 | 0 |
| 3997 | 0 |
| 3998 | 0 |
| 3999 | 0 |
| 4000 | 0 |
| 4001 | 0 |
| 4002 | 0 |
| 4003 | 1 |
| 4004 | 1 |
| 4005 | 1 |
| 4006 | 13 |
| 4007 | 46 |
| 4008 | 505 |
| 4009 | 240 |
| 4010 | 3 |
| 4011 | 2 |
| 4012 | 1 |
| 4013 | 2 |
| 4014 | 0 |
| 4015 | 2 |
| 4016 | 0 |
| 4017 | 0 |
| 4018 | 0 |
| 4019 | 0 |
| 4020 | 0 |
| 4021 | 0 |
| 4022 | 1 |
| 4023 | 1 |

| | |
|------|-----|
| 4024 | 0 |
| 4025 | 0 |
| 4026 | 0 |
| 4027 | 0 |
| 4028 | 0 |
| 4029 | 0 |
| 4030 | 0 |
| 4031 | 0 |
| 4032 | 164 |
| 4033 | 43 |
| 4034 | 49 |
| 4035 | 1 |
| 4036 | 85 |
| 4037 | 0 |
| 4038 | 0 |
| 4039 | 5 |
| 4040 | 55 |
| 4041 | 32 |
| 4042 | 0 |
| 4043 | 0 |
| 4044 | 0 |
| 4045 | 215 |
| 4046 | 20 |
| 4047 | 297 |
| 4049 | 8 |
| 4050 | 61 |
| 4051 | 11 |
| 4052 | 33 |
| 4053 | 0 |
| 4054 | 0 |
| 4055 | 0 |
| 4056 | 0 |
| 4057 | 0 |
| 4058 | 0 |
| 4059 | 0 |
| 4060 | 0 |
| 4061 | 0 |
| 4062 | 0 |
| 4063 | 0 |
| 4064 | 0 |
| 4065 | 0 |
| 4066 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 4067 | 0 |
| 4068 | 0 |
| 4069 | 0 |
| 4070 | 0 |
| 4071 | 0 |
| 4072 | 0 |
| 4073 | 0 |
| 4074 | 0 |
| 4075 | 7 |
| 4076 | 0 |
| 4077 | 105 |
| 4078 | 1 |
| 4079 | 0 |
| 4080 | 0 |
| 4081 | 2 |
| 4082 | 4 |
| 4083 | 5 |
| 4084 | 4 |
| 4085 | 6 |
| 4086 | 39 |
| 4087 | 35 |
| 4088 | 117 |
| 4089 | 3 |
| 4090 | 1 |
| 4091 | 1 |
| 4092 | 0 |
| 4093 | 1 |
| 4094 | 1 |
| 4095 | 3 |
| 4096 | 0 |
| 4097 | 2 |
| 4098 | 6 |
| 4099 | 4 |
| 4100 | 11 |
| 4101 | 0 |
| 4102 | 0 |
| 4103 | 0 |
| 4104 | 0 |
| 4105 | 0 |
| 4106 | 0 |
| 4107 | 0 |
| 4108 | 0 |

| | |
|------|-----|
| 4109 | 0 |
| 4110 | 0 |
| 4111 | 1 |
| 4112 | 1 |
| 4113 | 2 |
| 4114 | 0 |
| 4115 | 0 |
| 4116 | 0 |
| 4117 | 0 |
| 4118 | 2 |
| 4119 | 0 |
| 4120 | 0 |
| 4121 | 693 |
| 4122 | 13 |
| 4123 | 10 |
| 4124 | 33 |
| 4125 | 54 |
| 4126 | 138 |
| 4127 | 295 |
| 4128 | 699 |
| 4130 | 118 |
| 4131 | 5 |
| 4132 | 20 |
| 4133 | 64 |
| 4134 | 10 |
| 4135 | 9 |
| 4136 | 110 |
| 4137 | 53 |
| 4138 | 1 |
| 4139 | 7 |
| 4140 | 23 |
| 4141 | 3 |
| 4142 | 203 |
| 4143 | 6 |
| 4144 | 38 |
| 4145 | 1 |
| 4146 | 5 |
| 4147 | 8 |
| 4148 | 10 |
| 4149 | 8 |
| 4150 | 7 |
| 4151 | 14 |

| | |
|------|-----|
| 4152 | 3 |
| 4153 | 19 |
| 4154 | 4 |
| 4156 | 8 |
| 4157 | 5 |
| 4158 | 6 |
| 4159 | 13 |
| 4160 | 0 |
| 4161 | 10 |
| 4162 | 0 |
| 4163 | 0 |
| 4164 | 0 |
| 4165 | 0 |
| 4166 | 0 |
| 4167 | 0 |
| 4168 | 0 |
| 4169 | 0 |
| 4170 | 7 |
| 4171 | 28 |
| 4172 | 2 |
| 4173 | 1 |
| 4174 | 0 |
| 4175 | 0 |
| 4176 | 0 |
| 4177 | 0 |
| 4178 | 0 |
| 4179 | 0 |
| 4180 | 0 |
| 4181 | 1 |
| 4182 | 0 |
| 4183 | 1 |
| 4184 | 62 |
| 4185 | 135 |
| 4186 | 3 |
| 4187 | 5 |
| 4188 | 2 |
| 4189 | 25 |
| 4190 | 12 |
| 4191 | 53 |
| 4192 | 95 |
| 4193 | 44 |
| 4194 | 38 |

| | |
|------|-----|
| 4195 | 80 |
| 4196 | 91 |
| 4197 | 85 |
| 4198 | 83 |
| 4199 | 82 |
| 4200 | 111 |
| 4201 | 42 |
| 4202 | 70 |
| 4203 | 19 |
| 4204 | 0 |
| 4205 | 265 |
| 4206 | 3 |
| 4207 | 0 |
| 4208 | 11 |
| 4209 | 5 |
| 4210 | 50 |
| 4211 | 8 |
| 4212 | 46 |
| 4213 | 3 |
| 4214 | 18 |
| 4215 | 104 |
| 4216 | 0 |
| 4217 | 0 |
| 4218 | 0 |
| 4219 | 0 |
| 4220 | 0 |
| 4221 | 0 |
| 4222 | 0 |
| 4223 | 0 |
| 4224 | 0 |
| 4225 | 0 |
| 4226 | 0 |
| 4227 | 0 |
| 4228 | 0 |
| 4229 | 0 |
| 4230 | 0 |
| 4231 | 0 |
| 4232 | 0 |
| 4233 | 0 |
| 4234 | 0 |
| 4235 | 0 |
| 4236 | 0 |

| | |
|------|----|
| 4237 | 0 |
| 4238 | 0 |
| 4239 | 0 |
| 4240 | 0 |
| 4241 | 0 |
| 4242 | 0 |
| 4243 | 0 |
| 4244 | 0 |
| 4245 | 0 |
| 4246 | 0 |
| 4247 | 0 |
| 4248 | 0 |
| 4249 | 0 |
| 4250 | 0 |
| 4251 | 0 |
| 4252 | 0 |
| 4253 | 0 |
| 4254 | 0 |
| 4255 | 0 |
| 4256 | 0 |
| 4257 | 0 |
| 4258 | 0 |
| 4259 | 0 |
| 4260 | 0 |
| 4261 | 0 |
| 4262 | 0 |
| 4263 | 0 |
| 4264 | 0 |
| 4265 | 0 |
| 4266 | 0 |
| 4267 | 0 |
| 4268 | 0 |
| 4269 | 16 |
| 4270 | 0 |
| 4271 | 4 |
| 4272 | 5 |
| 4273 | 2 |
| 4274 | 4 |
| 4275 | 0 |
| 4276 | 0 |
| 4277 | 5 |
| 4278 | 9 |

| | |
|------|-----|
| 4279 | 3 |
| 4280 | 3 |
| 4281 | 19 |
| 4282 | 0 |
| 4283 | 0 |
| 4284 | 0 |
| 4285 | 1 |
| 4286 | 0 |
| 4287 | 0 |
| 4288 | 4 |
| 4289 | 7 |
| 4290 | 106 |
| 4291 | 107 |
| 4292 | 90 |
| 4294 | 23 |
| 4295 | 40 |
| 4296 | 63 |
| 4297 | 53 |
| 4298 | 104 |
| 4299 | 87 |
| 4300 | 506 |
| 4301 | 122 |
| 4302 | 324 |
| 4303 | 222 |
| 4304 | 532 |
| 4305 | 44 |
| 4306 | 47 |
| 4307 | 2 |
| 4308 | 0 |
| 4309 | 0 |
| 4310 | 0 |
| 4311 | 0 |
| 4312 | 0 |
| 4313 | 0 |
| 4314 | 0 |
| 4315 | 0 |
| 4316 | 0 |
| 4317 | 0 |
| 4318 | 0 |
| 4319 | 0 |
| 4320 | 0 |
| 4321 | 0 |

| | |
|------|---|
| 4322 | 0 |
| 4323 | 0 |
| 4324 | 0 |
| 4325 | 0 |
| 4326 | 0 |
| 4327 | 0 |
| 4328 | 0 |
| 4329 | 0 |
| 4330 | 0 |
| 4331 | 0 |
| 4332 | 0 |
| 4333 | 0 |
| 4334 | 0 |
| 4335 | 0 |
| 4336 | 0 |
| 4337 | 0 |
| 4338 | 0 |
| 4339 | 0 |
| 4340 | 0 |
| 4341 | 0 |
| 4342 | 0 |
| 4343 | 0 |
| 4344 | 0 |
| 4345 | 0 |
| 4346 | 0 |

