



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Programa de Doctorado de Biotecnología

# **Caracterización de mecanismos implicados en la regulación de la respuesta a estrés por frío en plantas**

Tesis elaborada por

Antonio Bustamante González

Directores

Dr. José Miguel Mulet

Dr. Gustavo Gómez

Valencia septiembre 2018

**Dedicado a**

María Fernanda  
Sebastián  
Miguel  
Antonio  
Zully  
Isaura  
Carmen  
German

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecer en estas líneas, la ayuda que muchas personas me han prestado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo. En primer lugar, quisiera agradecer a mi esposa, hijos y padres, que me han ayudado y apoyado en todo el proceso para obtener mi título, a mis tutores, JM Mulet y Gustavo Gómez, por haberme orientado en todos los momentos que necesité de sus consejos.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria del Ecuador; por todas las atenciones y apoyo brindado a lo largo de esta indagación.

A todos mis amigos de, LAB 2.01, LAB 2.05, LAB 1.08 y demás personal del IBMCP que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

A la Universidad Politécnica de Valencia y al IBMCP por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años.

## INDICE

<b>1</b>	<b>Lista de ABREVIATURAS.....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
3.1	El estrés en las plantas.....	7
1.1.	El estrés abiótico y la agricultura.....	9
3.2	Respuesta general de las plantas a estrés por frío.....	10
1.1.1.	Respuesta de la membrana celular frente al estrés inducido por frío.....	11
1.1.2.	Regulación transcripcional del estrés por frío.....	13
1.1.3.	Regulación hormonal en frío.....	14
1.1.4.	Chaperonas Moleculares.....	15
3.3	Implicación de las aquaporinas en la respuesta de la membrana a frío.....	16
1.1.5.	Clasificación de las aquaporinas.....	17
1.1.6.	Función de las aquaporinas.....	19
3.4	Regulación de la respuesta a frío mediada por silenciamiento de RNA.....	23
1.1.7.	Micro RNAs (miRNAs).....	24
1.1.8.	Implicación de los miRNA en la respuesta a estrés.....	27
<b>4</b>	<b>Capítulo 1 <i>BvCOLD1</i> una nueva aquaporina de remolacha azucarera (<i>Beta vulgaris L.</i>) que tiene un papel en la respuesta a frío y en la homeostasis de boro.....</b>	<b>31</b>
4.1	Introducción.....	31
4.2	Objetivos.....	34
4.3	Materiales y métodos.....	35
4.3.1	Construcción de la biblioteca de cDNA y rastreo en levadura.....	35
4.3.2	Medida de la concentración de B intracelular.....	36
4.3.3	Construcciones para la sobreexpresión de <i>BvCOLD1</i> y la proteína de fusión GFP. ...	36
4.3.4	Construcciones de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> y condiciones de crecimiento.....	38
4.3.5	Condiciones de crecimiento de <i>Beta vulgaris</i> .....	38
4.3.6	Extracción del RNA y análisis de transferencia <i>Northern</i> .....	39
4.3.7	Expresión génica transitoria mediada por <i>Agrobacterium</i> en <i>N. benthamiana</i> .....	40
4.3.8	Microscopía confocal.....	40
4.4	Resultados.....	41
4.4.1	Cribado de una biblioteca de cDNA de hojas de <i>Beta vulgaris</i> y aislamiento de <i>BvCOLD1</i> .....	41
4.4.2	Análisis de secuencia de <i>BvCOLD1</i> .....	42
4.4.3	Análisis filogenético de <i>BvCOLD1</i> .....	45
4.4.4	Expresión <i>BvCOLD1</i> y localización en remolacha azucarera.....	47
4.4.5	Caracterización funcional de <i>BVCOLD1</i> en levadura.....	49
4.4.6	La sobreexpresión de <i>BvCOLD1</i> mejora la tolerancia al estrés por frío y diferentes estreses abióticos en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
4.4.7	Las plantas que sobreexpresan <i>BvCOLD1</i> son tolerantes a un medio con B limitante. 56	
4.4.8	El dominio c-terminal de <i>BvCOLD1</i> es esencial para su función.....	57
4.5	Discusión del capítulo 1.....	59
<b>5</b>	<b>Capítulo 2 identificación de miRNAs relacionados con la respuesta AL estrés inducido por frío en melón (<i>Cucumis melo</i>).....</b>	<b>61</b>
5.1	Introducción.....	61

<b>5.2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>65</b>
5.3.1	Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos de estrés.....	65
5.3.2	Extracción de RNA y purificación de sRNA.....	65
5.3.3	Secuenciación de sRNA.....	65
5.3.4	Análisis bioinformático de la expresión de los miRNAs.....	66
5.3.5	Ensayos qRT-PCR.....	66
<b>5.4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>68</b>
5.4.1	Análisis de la población de RNAs.....	68
5.4.2	Los miRNAs están generalmente regulados negativamente en respuesta a estrés por frío. 71	
5.4.3	Los miRNA y su función biológica mediada por la regulación de sus genes dianas..	73
<b>5.5</b>	<b>Discusión del capítulo 2</b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Capítulo 3.- El procesamiento alternativo de su precursor regula la acumulación de miR319 en plantas de melón expuestas al frío</b> .....	<b>82</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>82</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>85</b>
6.3.1	Análisis bioinformático de la expresión de miR319.....	85
6.3.2	Alineación de sRNAs.....	85
6.3.3	Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	85
6.3.4	5'-RLM-RACE.....	86
<b>6.4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>87</b>
6.4.1	La expresión de todos los miembros de la familia miR319 se alteran significativamente en respuesta a frío.....	87
6.4.2	Un miRNA alternativo es procesado diferencialmente a partir del precursor pri-miR319c en plantas de melón expuestas a frío.....	89
6.4.3	La acumulación diferencial de #miR319c esta inversamente relacionada con los niveles de expresión de miR319c maduro.....	92
6.4.4	El miRNA alternativo (#miR319c) no posee actividad biológica convencional demostrable.....	94
6.4.5	La escisión parcial y el procesamiento alterado de su precursor modulan la acumulación de miR319c en plantas de melón expuestas a frío.....	96
6.4.6	La disminución de miR319c inducida por frío se correlaciona con una mayor acumulación de miembros bien establecidos de la vía de señalización de baja temperatura.....	10
	0	
<b>6.5</b>	<b>Discusión del capítulo 3</b> .....	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>116</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Transición de fase de la membrana celular.....	11
Figura 2.- Vías de inicio de la respuesta a estrés por frío. .	12
Figura 3.- Red de regulación de la respuesta a frío mediada por hormonas.....	15
Figura 4.- Clasificación de proteínas HSP de eucariotas.....	16
Figura 5.- Estructura molecular de PIP2. ....	17
Figura 6.- Árbol filogenético de las familias de aquaporinas de arabidopsis.....	19
Figura 7.- Esquema de funcionamiento de las PIP y TIP. ....	21
Figura 8.- Respuesta de las aquaporinas a distintos estreses. ....	22
Figura 9.- Procesamiento de miRNA en plantas.....	26
Figura 10.- miRNA con su dianas y su relación en distintas situaciones de estrés. ....	28
Figura 11.- Mapa del plásmido pXCS-HA-Strep.....	37
Figura 12.- Goteo de levaduras transformadas con el plásmido vacío (línea superior) y con el plásmido conteniendo el gen <i>BvCOLD1</i> . ....	41
Figura 13.- Localización de la expresión del gen <i>BvCOLD1</i> fusionada a una proteína reportera GFP.....	42
Figura 14.- Resultados del análisis BLASTp entre <i>BvCOLD1</i> frente a la base de datos de proteinaS de <i>Beta vulgaris</i> .....	42
Figura 15.- Estructura genómica de <i>BvCOLD1</i> .....	43
Figura 16.- Resultados del análisis BLASTp entre <i>BvCOLD1</i> frente a la base de datos de secuencias de proteínas <i>Spinacia oleracea</i> . ....	43
Figura 17.- Análisis de la secuencia traducida de <i>BvCOLD1</i> . ....	44
Figura 18.- Predicción 3D de la proteína <i>BvCOLD1</i> utilizando el software Rasmol.....	44
Figura 19.- Árbol filogenético de <i>BVCOLD1</i> .....	46
Figura 20.- Alineación múltiple de los aminoácidos del extremo c-terminal de <i>BvCOLD1</i> con las secuencias de mayor similitud. ....	47
Figura 21.- Análisis de transferencia <i>Northern</i> del RNA de remolacha analizando el nivel endógeno de <i>BvCOLD1</i> .....	48
Figura 22.- Imágenes de microscopía confocal de células epidérmicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan transitoriamente <i>BvCOLD1GFP</i> . ....	48
Figura 23.- Microscopía de protoplastos derivados de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan transitoriamente <i>BvCOLD1GFP</i> .....	49
Figura 24.- Sobreexpresión de <i>BvCOLD1</i> en el fondo genético <i>gpd1</i> . ....	50
Figura 25.- Goteo de levadura en cepa mutante <i>bor1</i> transformada con el plásmido vacío (control), y con el plásmido que contiene <i>BvCOLD1</i> .....	51
Figura 26.- Cinética de absorción de B en el mutante de levadura <i>bor1</i> transformada con <i>BvCOLD1</i> . Los cultivos de la cepa <i>bor1</i> transformada con un plásmido vacío (cuadrados) y con el plásmido que contiene <i>BvCOLD1</i> .....	51
Figura 27.- Acumulación de mRNA de plantas de arabidopsis transformadas con el gen <i>BvCOLD1</i> . ....	52
Figura 28.- Porcentaje de germinación y desarrollo temprano de plantas de arabidopsis transformada con <i>BvCOLD1</i> . ....	53
Figura 29.- Placa de germinación en frío. ....	53
Figura 30.- Porcentaje de germinación y desarrollo temprano de arabidopsis transformada con <i>BvCOLD1</i> . ....	54
Figura 31.- Peso fresco de plantas de arabidopsis transformadas con <i>BvCOLD1</i> . ....	55
Figura 32.- Peso seco de planta de arabidopsis transformadas con <i>BvCOLD1</i> .....	55

Figura 33.-Análisis de germinación de líneas transgénicas que sobreexpresan <i>BvCOLD1</i> en condiciones de B limitante. ....	56
Figura 34.-Análisis de la elongación de la raíz bajo condiciones limitantes de B. ....	57
Figura 35.-Análisis de germinación de líneas transgénicas que sobreexpresan <i>BvCOLD1</i> truncado. ....	58
Figura 36.-Análisis de componentes principales de las bibliotecas.....	69
Figura 37.-Distribución de longitudes de lectura.....	70
Figura 38.-Diagrama de Venn que compara el número de los sRNAs diferenciales.....	71
Figura 39.-Sentido general de la expresión para cada familia de miRNA,.....	72
Figura 40.-Diagrama de dispersión de Pearson, entre los datos de acumulación obtenidos por secuenciación y qRT-PCR.....	73
Figura 41.-Diagrama de dispersión q de Pearson, entre los datos de acumulación obtenidos por secuenciación y qRT-PCR para 16 miRNA representativos....	78
Figura 42.-Análisis por 5` <i>RACE</i> de dianas predichas de miRNA representativos. ....	79
Figura 43.-Representación gráfica de los niveles de expresión de los miembros de la familia miR319. ....	88
Figura 44.-Estructura canónica de un precursor pri-mi319. ....	90
Figura 45.-Estructura de los precursores del pri-miRNA319 provenientes de las bibliotecas de <i>Cucumis melo</i> sometidas a condiciones de frío. ....	91
Figura 46.-Acumulación de secuencias del 319c canónico y el alternativo.....	92
Figura 47.-Acumulación del mir319 alternativo en el pri-mir319a.....	93
Figura 48.-Análisis de precursores y su acumulación de secuencias de miRNA,.....	94
Figura 49.-Representación de transcritos degradados, detectados por 5` <i>RLM-RACE</i> . ....	96
Figura 50.-Acumulación de las dianas predichas, para el # mir319c,.....	96
Figura 51.-Procesamiento del precursor del miR319.....	97
Figura 52.-Detección de fragmentos del precursor del 319c.....	99
Figura 53.-Predicción de la diana por psRNATarget.....	101
Figura 54.-Histograma que muestra los niveles de acumulación relativa, estimada por qRT-PCR- del mRNA de TCP2.....	101
Figura 55.-Representación de la transcripción de TCP2 y TCP4 detectada por 5` <i>RLM-RACE</i> . ....	102
Figura 56.-Acumulación de hipocótilo elongado5 (HY5), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI).....	103
Figura 57.-Ruta de regulación de respuesta a frío medida por el miR319c, Modelo propuesto para la función miR319c en la respuesta al frío en melón.....	105

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Tipos de aquaporinas y su relación con el estrés abiótico .....	20
Tabla 2.-	Número de lecturas por tamaño y muestra .....	68
Tabla 3.-	Descripción e información detallada de las dianas predichas para los miRNAs.....	74
Tabla 4.-	Secuencias diferenciales del miR319 en las bibliotecas de melón.....	87
Tabla 5.-	Secuencias del #miR319c .....	91
Tabla 6.-	Dianas del #miR319 predichas por psRNATarget.....	95
Tabla 7.-	Dianas predichas para el miR319c mediante el programa <i>psRNA-Target</i> en sus dos versiones .....	100



## 1 LISTA DE ABREVIATURAS

FAO: *Food and Agriculture Organization*. (organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación).

UV: radiación ultravioleta.

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno).

LEA: *late embryogenesis abundant* (abundante en la embriogénesis tardía).

CBF: *c-repeat binding factors* (factor de unión a repeticiones tipo c).

DREB: *drought response element binding* (unión al elemento de respuesta a sequía).

ABA: ácido abscísico.

AX: auxinas.

CK: citoquininas.

GA: giberelinas.

BR: brasinoesteroides.

HSP: *heat shock proteins* (proteínas de choque térmico).

AQP: aquaporinas.

PIP: *plasma membrane intrinsic protein* (proteínas intrínsecas de la membrana plasmática).

TIP: *tonoplast intrinsic protein* (proteínas intrínsecas de tonoplasto).

NIP: *similar to nodulin-26 intrinsic protein*) proteínas intrínsecas similares a la nodulina26.

[SIP](#): *small basic intrinsic protein* (proteínas intrínsecas básicas pequeñas).

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico).

DNA: *desoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico).

TGS: *transcriptional gene silencing* (silenciamiento génico transcripcional).

PTGS: *posttranscriptional gene silencing* (silenciamiento génico post transcripcional)..

dsRNA: *doubled stranded ribonucleic acid*. (ácido ribonucleico bicatenario).

sRNAs: *small ribonucleic acid* (Ácidos ribonucleicos pequeños).

RISC: *induced silencing complex* (complejo de silenciamiento inducido).

AGO: proteína Argonauta.

mRNA: *messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensajero).

miRNAs: *micro ribonucleic acid* (micro ácido ribonucleico).

cDNA: *complementary desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementario).

PPFD: *photosynthetic photonic flux* (flujo fotónico fotosintético).

DNasa: *Desoxirribonuclease* (Desoxirribonucleasa).

GFP: *green fluorescent proteins* (proteína verde fluorescente).

RE: retículo endoplásmico.

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

tRNAs: *transference ribonucleic acid*. (ácidos ribonucleicos de transferencia).

PCA: *principal component analysis*. (análisis de componentes principales).

## 2 RESUMEN

En un contexto de calentamiento global, el estrés abiótico se ha convertido en una de las mayores amenazas para la productividad agrícola. El estrés por frío es uno de estos factores limitantes. Por lo tanto, estudiar a nivel molecular la respuesta de la planta a este tipo de estrés e identificar los genes o los microRNAs (miRNAs) cuya función es determinante en la resistencia a este tipo de estrés puede aportar información fundamental para desarrollar plantas tolerantes a frío y así poder aumentar la producción de alimentos en condiciones ambientales adversas.

En esta tesis pretendemos dar un enfoque transversal para poder identificar genes implicados en la respuesta a estrés. Por un lado utilizamos un enfoque de biología molecular clásica, y por otro una visión basada en la biología de sistemas y en la secuenciación a gran escala. Mediante esta estrategia hemos sido capaces de identificar y caracterizar el gen *BvCOLD1* de *Beta vulgaris* que codifica una aquaporina localizada en el retículo endoplásmico y que al ser sobreexpresado en plantas de *Arabidopsis thaliana* confiere tolerancia a frío y a condiciones limitantes de boro (B). Por lo que demostramos que es un gen fundamental para el transporte de este oligoelemento esencial.

En paralelo desarrollamos un abordaje de biología de sistemas a partir de plantas de melón (*Cucumis melo*) sometidas a estrés por frío. Lo que nos permitió identificar 20 familias de miRNA implicadas en la respuesta en condiciones de frío. En el tercer capítulo profundizamos en la regulación de uno de estos miRNA (miR319) y descubrimos que el frío induce el procesamiento de una forma alternativa de esta molécula.

## RESUM

En un context d'escalfament global, l'estrès abiòtic s'ha convertit en una de les majors amenaces per a la productivitat agrícola global. L'estrès per fred és un d'aquests factors limitants. Per tant, Estudiar a nivell molecular la resposta de la planta a fred i identificar els gens o els microRNA (miRNA) la funció dels quals és determinant en aquestes condicions pot aportar informació fonamental per desenvolupar plantes tolerants a aquest estrès i així poder augmentar la producció d'aliments en condicions adverses.

En aquesta tesi hem utilitzat un enfocament transversal per poder identificar gens implicats en la resposta a estrès. D'una banda hem fet servir mètodes de biologia molecular clàssica, que ens ha permès identificar i caracteritzar el gen *BvCOLD1* de *Beta vulgaris* que codifica una aquaporina localitzada en el reticle endoplasmàtic i que en ser sobreexpresada en plantes d'*Arabidopsis thaliana* conferia tolerància a fred i a condicions limitants de bor (B). Pel que hem demostrat que és un gen fonamental per al transport d'aquest oligoelement essencial.

En paral·lel hem desenvolupat un abordatge de biologia de sistemes a partir de plantes de meló (*Cucumis melo*) sotmeses a estrès per fred. El que ens va permetre identificar 20 famílies de miRNA implicades en la resposta en condicions de fred. Hem aprofundit en la regulació d'un d'aquests miRNA (el mi319) i hem descobert que el fred indueix la formació d'una forma alternativa d'aquesta molècula.

## SUMMARY

In a context of global warming, abiotic stress has become one of the greatest threats to global agricultural productivity. Cold stress is one of these limiting factors. Therefore, Studying the plant response at the molecular level and identifying the genes or microRNAs (miRNAs) whose function is determinant in these conditions can provide fundamental information to develop plants tolerant to this stress and thus be able to increase the production of food under adverse conditions.

In this Ph.D. Thesis we have used a transversal approach to identify genes involved in stress response. We have used two different approaches. First we used classical molecular biology methods, which has allowed us to identify and characterize the BvCOLD1 gene of *Beta vulgaris* that encodes an aquaporin located in the endoplasmic reticulum and which upon overexpression in *Arabidopsis thaliana* conferred tolerance to cold and limiting conditions of Boron. So we showed that it is a fundamental gene for the transport of this essential trace element.

In parallel, we undertook a systems biology approach based on melon plants (*Cucumis melo*) subjected to cold stress. This allowed us to identify 20 families of miRNA involved in the response to cold conditions. We have further studied the regulation of one of these miRNAs (miR319) and discovered that cold induces the alternative processing of its precursor.

### 3 INTRODUCCIÓN

#### 3.1 El estrés en las plantas

El ámbito de la presente tesis doctoral es el estudio de la biología del estrés abiótico en plantas, con especial interés por el estrés por frío y la aplicación del conocimiento obtenido para contribuir al desarrollo de plantas tolerantes a dicho estrés. Larcher define al agente inductor de estrés como cualquier factor biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico en la planta por debajo de la máxima que podría alcanzar en ausencia de este factor (Larcher *et al.*, 1998). Basándose en este criterio, resulta difícil determinar en qué punto un factor biótico o abiótico se convierte en inductor de estrés, ya que las condiciones idóneas para el desarrollo normal de una especie pueden ser limitantes para otra, incluso dentro de una misma familia. De la misma manera sus limitaciones son diferentes en las distintas fases del crecimiento, por lo que la misma condición en una etapa del desarrollo puede suponer un estrés y en otra no. Por todo ello es complicado definir en qué condiciones una planta está sometida a una situación de estrés (Horns y Hood, 2012).

Una situación de estrés abiótico viene provocada por la acción de condiciones ambientales, ya sean físicas o químicas, cuyo exceso o déficit inducen alteraciones que afectan el desarrollo de la planta. Los principales agentes inductores de este tipo de estrés son la sequía, inundaciones, temperaturas extremas, salinidad, presencia de sustancias tóxicas en el suelo, alteraciones en la intensidad de luz, etc. (Larcher *et al.*, 1998). Por otra parte, la inducción de estrés biótico se desencadena debido al efecto de organismos vivos (hongos, bacterias, insectos, etc.) o virus, que con diversos grados de intensidad, inciden sobre el desarrollo de la planta (Serres y Weretilnyk, 2000).

Las plantas son organismos sésiles y por ello carecen de la habilidad de escapar de las condiciones adversas y buscar entornos más favorables como hacen los animales (Saud *et al.*, 2014). Por este motivo durante su evolución han desarrollado una compleja red de respuestas a estas condiciones para asegurar su supervivencia y en la medida de lo posible continuar con su desarrollo. Los mecanismos que

emplean las plantas para afrontar las situaciones de estrés según (Horns y Hood, 2012) pueden ser:

- Evitar el estrés impidiendo la exposición al agente inductor por medio de mecanismos fisiológicos. Por ejemplo mecanismos que eviten la germinación de las semillas si las condiciones son adversas o desarrollar todo el ciclo vital en determinadas estaciones del año en que las condiciones climáticas son más favorables.
- Emplear mecanismos moleculares que le permitan superar estas condiciones, lo que se denomina tolerancia a estrés, como por ejemplo, acumular osmolitos para impedir la pérdida de agua en condiciones de sequía.

Dependiendo de la duración y la intensidad de las condiciones que inducen el estrés así será la recuperación. Si son cortas y moderadas, la planta puede recuperarse al desaparecer la exposición al agente inductor de estrés, por otro lado, si son duraderas o intensas pueden acabar causando su muerte (Tardieu y Tuberosa 2010; Saud *et al.*, 2013).

Si al someterse a una situación de estrés intenso y de larga duración las plantas no mueren se las puede considerar tolerantes, por el contrario si el estrés compromete su supervivencia se las considera susceptibles. Estos mecanismos capaces de generar resistencia o tolerancia a una situación adversa, se denominan adaptaciones constitutivas y están genéticamente determinadas en la planta (Hopkins y Huner 2004).

Dentro de los diversos mecanismos de adaptación existe un proceso llamado tolerancia cruzada. En un estudio publicado en el año 2000, Bowler y colaboradores analizaron el papel del calcio y de las especies reactivas de oxígeno como moléculas señalizadoras en este proceso, demostrando que la exposición de las plantas a determinados estreses puede generar un cierto grado de tolerancia a otros (Bowler *et al.*, 2000). Esto explicaría parte del proceso de adaptación de las plantas a condiciones adversas. Un ejemplo de este fenómeno se demostró claramente en

plantas de tomate, donde la realización de heridas en las hojas de las plantas (estrés por daño) inducía un aumento de la tolerancia a salinidad (Capiati *et al.*, 2006).

### **1.1. El estrés abiótico y la agricultura.**

Según informes de la FAO se estima que en el 2050 la población mundial será un 34% mayor que la actual, superando los 9.000 millones. Para poder alimentar a este creciente número de personas, la producción de alimentos deberá incrementarse en un 70% (FAO 2009). En este sentido es importante considerar, que el 40% de la tierra cultivable se encuentra en suelos salinos o con pH menor a 5 y expuestos a temperaturas extremas (ya sean altas o bajas), lo que limita su potencial de producción (Hussain *et al.*, 2014). A esto hay que añadir la incidencia de periodos de sequía cada vez más largos, contaminación del suelo por sustancias tóxicas y metales pesados, aumento de la radiación UV y mayor incidencia de plagas que afectan a grandes superficies de cultivo (FAO 2013). Por lo tanto, podríamos concluir que en un futuro cercano una parte considerable de la superficie cultivable del planeta presentará condiciones subóptimas para el desarrollo agrícola, agravando por lo tanto el impacto de esta potencial crisis alimentaria (Ahmad *et al.*, 2012).

Una estrategia válida para afrontar estos condicionantes es el desarrollo de especies de cultivo tolerantes a estrés. La forma tradicional de conseguir nuevas variedades es por medio de la mejora genética clásica o convencional. Sin embargo esta técnica tiene sus limitaciones (Fang y Xiong, 2015). La mejora genética clásica es muy útil para, por ejemplo, obtener variedades más productivas, pero cuando se quiere generar materiales resistentes o tolerantes a condiciones de estrés, la tarea se vuelve complicada y con muy poco éxito debido a que no todos los cultivos disponen de una base genética tolerante a estrés que pueda ser utilizada en estrategias de introgresión génica (Brook *et al.*, 2018).

Por tal motivo una alternativa para lograr la mejora genética de las plantas es basarse en técnicas moleculares como la ingeniería genética o las nuevas técnicas de mejora genética (*new breeding techniques*). Ya que según lo expuesto anteriormente, la exigencia de mejora en los cultivos es mayor y se requiere realizarla en el menor tiempo posible. Además, este tipo de aproximaciones cuentan



con el añadido de que es posible utilizar genes provenientes de otras especies o hacer mejoras muy concretas y muy dirigidas en el genoma de la propia especie (Solymosi y Bertrand, 2012).

### **3.2 Respuesta general de las plantas a estrés por frío.**

Cuando una planta es sometida a una situación de estrés inducida por frío, (considerando como tal una temperatura inferior a la óptima, pero que no produce congelación) se desencadena, en la célula, una compleja cascada de eventos fisiológicos (Fedoroff *et al.*, 2010). La respuesta de la planta se inicia en la membrana, donde existen receptores de las señales provocadas por alteraciones del medio (Arnadóttir y Chalfie, 2010). Esta señal genera segundos mensajeros tales como: especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio e inositol-fosfatos, los cuales modifican la condición intracelular (Mignolet *et al.*, 2016). Diferentes proteínas (que actúan como sensores) detectan el nivel de calcio e inician diversas cascadas de señalización que activan o desactivan factores de transcripción que a su vez controlan la expresión de determinados grupos de genes (Mahajan y Tuteja, 2005). La gran mayoría de los genes activados codifican proteínas que promueven respuestas en tejidos donde todavía no se perciben los efectos del estrés, haciendo que la respuesta desencadenada a nivel celular pueda extenderse sistémicamente a toda la planta (Fedoroff *et al.*, 2010).

Entre los distintos mecanismos que poseen las plantas para reaccionar ante situaciones de estrés inducidas por frío destacan la síntesis y acumulación de las siguientes moléculas (Kosova *et al.*, 2011):

- Enzimas desaturasas de ácidos grasos, que intervienen en la modificación de la composición lipídica de las membranas celulares para su estabilización y para mantener la fluidez en condiciones de frío.
- Chaperonas moleculares, para evitar el plegamiento erróneo de proteínas provocado por el frío.
- Homólogos de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), y otras proteínas altamente hidrofílicas, así como el aminoácido prolina y diversos mono y oligosacáridos que sirven como osmoprotectores.
- Proteínas con capacidad para funcionar como anticongelantes.

- Componentes de la cadena fotosintética que sirven para el transporte de electrones.

### 1.1.1. Respuesta de la membrana celular frente al estrés inducido por frío.

La membrana celular es una estructura fluida, por tal motivo las bajas temperaturas reducen esta fluidez generando rigidez y alterando la conformación de proteínas. Estos fenómenos permiten a la célula detectar la exposición al agente inductor de estrés (Maurel *et al.*, 2015). Este proceso que se conoce como “transición de fases” de las bicapas lipídicas, ocurre en función de la intensidad del estímulo térmico. (Figura 1). Los lípidos que forman la bicapa pueden encontrarse en dos estados o fases diferentes (Theocharis *et al.*, 2012):

1. Gel, parecido a un sólido, con las cadenas hidrocarbonadas en estado relativamente rígido.
2. Cristal líquido, más fluido y con las cadenas hidrocarbonadas con mayor movilidad.

Una membrana celular funcional tiene que encontrarse en estado de cristal líquido, o fluido. Si baja la temperatura la célula debe de iniciar una respuesta para mantener la fluidez de las membranas (Theocharis *et al.*, 2012).

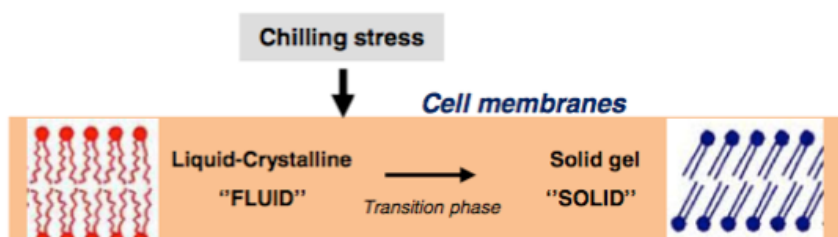


Figura 1.- Transición de fase de la membrana celular (Theocharis *et al.*, 2012).

Por otra parte y tal como se muestra en la figura 2, el aumento de la rigidez de la membrana causada por las bajas temperaturas desencadena una respuesta en la

cual el calcio juega un papel importante como molécula señalizadora para el inicio de la respuesta (Shi *et al.*, 2015).

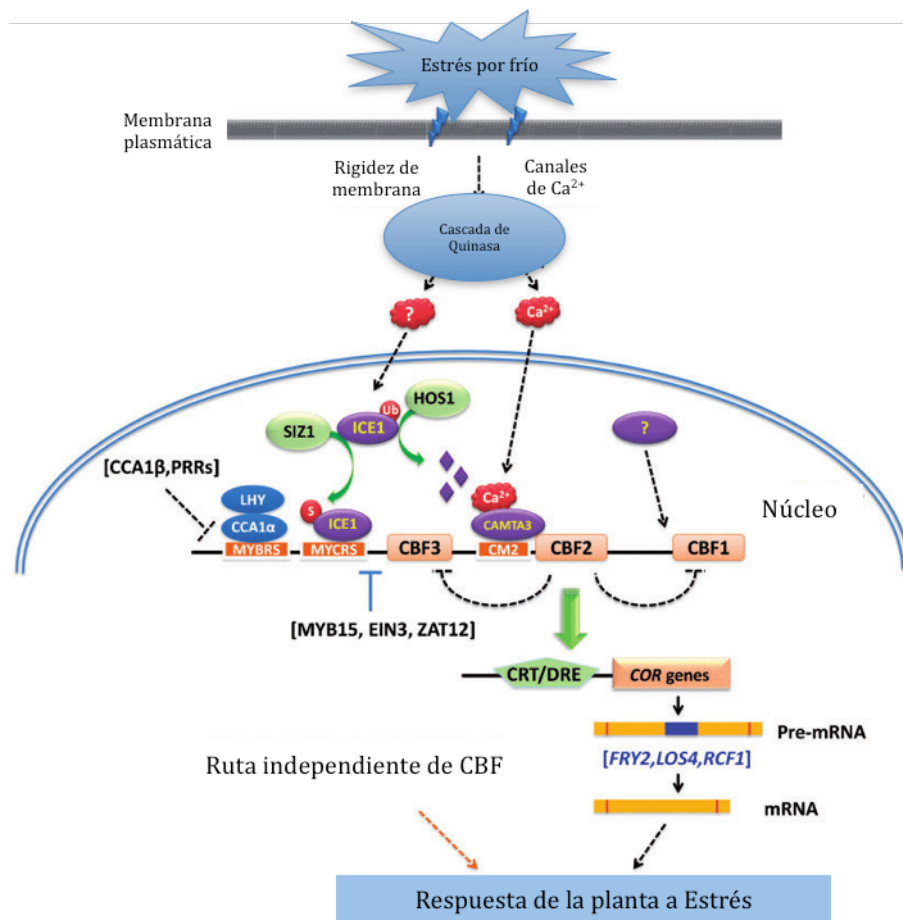


Figura 2.- Vías de inicio de la respuesta a estrés por frío. Se ilustran los principales componentes implicados en la ruta de señalización. Los signos de interrogación indican conexiones aún no determinadas. Las flechas indican una regulación positiva, mientras que las líneas que terminan en una barra indican una regulación negativa. Abreviaturas: CBF, factor de unión de repetición C; CAMTA3, activador de transcripción de unión a calmodulina 3; ICE1, inductor de la expresión 1 de CBF; HOS1, alta expresión de genes osmóticamente sensibles; SIZ1, SAP y Miz 1; CCA1, asociado al reloj circadiano 1; LHY, hipocotilo alargado tardío; PRR, regulador de pseudo respuesta; COR, respuesta fría; FRY2, FIERY 2; LOS4, baja expresión del gen de respuesta osmótica 4; RCF1, regulador de la expresión del gen CBF1; ESK1, esquimal 1; GI, GIGANTEA; EIN3, insensible a etileno 3; CRT, elementos C-repeat; DRE, elementos que responden a la deshidratación; secuencia de reconocimiento del factor de transcripción MYBRS, MYB; secuencia de reconocimiento de factores de transcripción MYCRS, MYC; CM2, ADN conservado motivo2; Ub, ubiquitinación; S, sumoilación (Shi *et al.*, 2015).

Mantener el equilibrio en el gradiente de iones en las diferentes membranas es fundamental para la aclimatación a frío, puesto que todo el transporte de nutrientes y de otras moléculas fundamentales depende de este gradiente. Ensayos realizados en *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) demostraron que la exposición de plantas a

condiciones de frío indujo cambios en las composiciones de proteínas y lípidos de la membrana (Uemura *et al.*, 2003).

La capacidad de las células de cambiar la composición de los lípidos de membrana durante la aclimatación es un factor determinante para la tolerancia a frío (Tambussi, 2004). En plantas aclimatadas cambia la composición lipídica, tanto de la membrana plasmática como de los cloroplastos, de modo que el umbral de temperatura en el que se producen daños en la membrana es menor que el observado en plantas no aclimatadas (Uemura y Steponkus, 1999). Esto se consigue al aumentar el contenido de ácidos grasos insaturados en las membranas durante el proceso de la aclimatación por frío, lo que aumenta su fluidez (Vogg *et al.*, 1998).

### **1.1.2. Regulación transcripcional del estrés por frío.**

Las bajas temperaturas inducen cambios profundos en el transcriptoma de la planta. Se ha estimado que los genes regulados por frío, entre los que destacan una gran cantidad de factores de transcripción tales como CBF (*c-repeat binding factors*), DREB (*drought response element binding*), ICE (*inducer of CBF expression*), etc., constituyen entre el 4% y 14% del genoma de *Arabidopsis* (Hannah *et al.*, 2005).

Los CBF regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo de fosfoinosítidos, la biosíntesis de osmolitos, la detoxificación de ROS, el transporte de membrana, el metabolismo y la señalización de hormonas y muchos otros con funciones protectoras celulares conocidas (Maruyama *et al.*, 2007). Por lo tanto, los CBF juegan un papel fundamental y conservado en la regulación de genes durante la aclimatación en frío en especies de plantas. Esta respuesta es común aún en especies distanciadas evolutivamente (Akhtar *et al.*, 2012).

Se ha descrito que la mayoría de los genes CBF están regulados positivamente en respuesta al estrés por frío, pero algunos genes como *CrCBF* de *Catharanthus roseus* y *OsCBF1C* de *Oryza sativa* se expresan constitutivamente (Dubouzet *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2007).

Las características comunes de la mayoría de los CBF son una respuesta rápida y prolongada en el tiempo. *AtCBF1A* se induce en 10 min a 4 °C y los niveles de transcripción de *EguCBF* y *MbCBF1* son detectables a 15 min y 30 min, respectivamente, en condiciones de estrés por frío (Liu *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Por otra parte, *EguCBF1*, *OsCBF1A / CBF3* y *ZmCBF1A* son inducidos por frío en un período de 30 minutos, 40 minutos y 60 minutos, respectivamente, y permanecen detectables incluso 24 horas después de la exposición a bajas temperaturas (Dubouzet *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2009).

### **1.1.3. Regulación hormonal en frío.**

En los últimos años, se ha caracterizado a nivel molecular el papel de las hormonas vegetales dentro de las respuestas de la planta a condiciones de estrés, descifrándose su papel fundamental en la regulación de esta respuesta.

Existen diferentes clases de hormonas con funciones específicas y superpuestas, así como efectos sinérgicos o antagónicos en la biosíntesis y señalización de otras hormonas, creando una red compleja de interacciones hormonales (Santner *et al.*, 2009).

Nuestro conocimiento de los modelos moleculares regulados por hormonas sigue estando en sus etapas iniciales, pero evidencias recientes sugieren que estas moléculas desempeñan un rol fundamental en la respuesta a estrés por frío como: ácido abscísico (ABA), auxinas (AX), citoquininas (CK), giberelinas (GA), brasinoesteroides (BR), etc. (Eremina *et al.*, 2016).

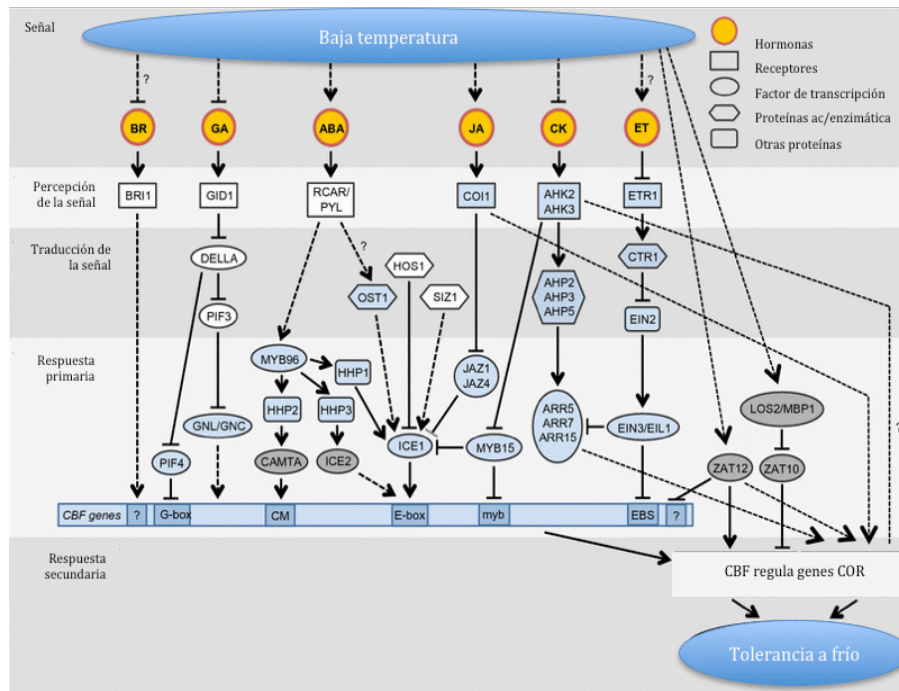


Figura 3.- Red de regulación de la respuesta a frío mediada por hormonas. En azul se encuentran los factores de transcripción (TF) y los componentes de las vías de señalización hormonal, que están reguladas por el frío y las hormonas. En gris, los TF están regulados por frío pero no por hormonas. En blanco son componentes de vías de señalización de hormonas, que no se sabe que estén reguladas en frío. Las flechas y las líneas de inhibición representan procesos de activación y supresión, respectivamente. Las líneas continuas indican una interacción directa; las líneas punteadas representan interacciones indirectas (Eremina *et al.*, 2016).

#### 1.1.4. Chaperonas moleculares.

Las proteínas de choque térmico (HSP, por *Heat Shock Proteins*) son un componente principal de la respuesta al estrés abiótico (Eremina *et al.*, 2016). Las dianas de acción de estas proteínas pueden ser: enzimas metabólicas primarias y/o componentes de rutas de transducción de señal o rutas metabólicas esenciales para el correcto funcionamiento de la célula (Joseph *et al.*, 2012). A su vez las HSP se encuentran controladas por la acción de diversos factores que se activan bajo condiciones de estrés (Huang *et al.*, 2014).

Dentro de las funciones moleculares atribuidas a estas proteínas destacan las siguientes: facilitan el plegamiento de proteínas y contribuyen a estabilizar la estructura de proteínas y membranas (Wang *et al.*, 2004). Desde un punto de vista funcional las HSP actúan como un tampón que impide la acumulación de agregados debidos al plegamiento incorrecto de proteínas. Mediante esta función, las HSP modulan los efectos provocados por las variaciones ambientales y genéticas del proteoma (Krukenberg *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que podrían participar en procesos de señalización, identificación y degradación de proteínas (Huang *et al.*,

2014). La expresión de algunas HSP es constitutiva, mientras que en otras depende del ciclo celular o de otros factores como la presencia de estrés (Joseph *et al.*, 2012).






Familia	Estructura	Tamaño (kDa)	Localización (célula vegetal)	Función
HSP100		84-104	C, P	solubilización de agregados proteicos no funcionales y degradación de proteínas desnaturalizadas.
HSP90		82-96	C, P, ER, M	señalización, control del ciclo celular, transporte y degradación de proteínas.
HSP70		68-110	C	plegamiento de proteínas recién sintetizadas, translocación de proteínas a través de la membrana, desestructuración de complejos oligoméricos, degradación proteolítica de proteínas inestables y control actividad de algunos FT.
HSP60		60	C, P, M	plegamiento de proteínas recién sintetizadas o recién translocadas y función inmunogénica como autoantígeno.
sHSP		15-42	C, P, ER, M, Px	Unión a proteínas desnaturalizadas, prevención de agregaciones irreversibles de proteínas y adquisición de tolerancia al estrés

Figura 4.- Clasificación de proteínas HSP de eucariotas. C, citosol; P, cloroplasto; ER, retículo endoplásmico; M, mitocondria, Px, peroxisoma y FT, factor transcripcional. Adaptada de Katschinski (2004).

### 3.3 Implicación de las aquaporinas en la respuesta de la membrana a frío.

Las aquaporinas (AQP) constituyen una gran familia de proteínas integrales de membrana que están presentes en todos los reinos de los seres vivos, incluyendo las arqueas, bacterias y todas la células eucariotas. Estas generan poros proteicos en diferentes tipos de membranas, que parecen estar diseñados para el paso selectivo de agua, aunque pueden transportar otros elementos como glicerol o urea (Maurel *et al.*, 2015). En plantas, se encuentran como múltiples isoformas que exhiben gran diversidad de localizaciones celulares, selectividad de transporte y propiedades de regulación (Li *et al.*, 2004).

La primera aquaporina identificada fue la AQP1 de los glóbulos rojos humanos. Actualmente hay identificadas más de 450 (Maurel *et al.*, 2015). En plantas, el primer miembro de la familia se identificó en soja (*Glycine max*), esta proteína se denominó Nodulin-26 (Fortin *et al.*, 1987). La primera determinación del transporte de agua en arábido se realizó con AtTIP1 (Maurel *et al.*, 1993). Esta función de transporte fue posteriormente confirmada en numerosas especies de plantas herbáceas o leñosas, silvestres o cultivadas (Li *et al.*, 2014).

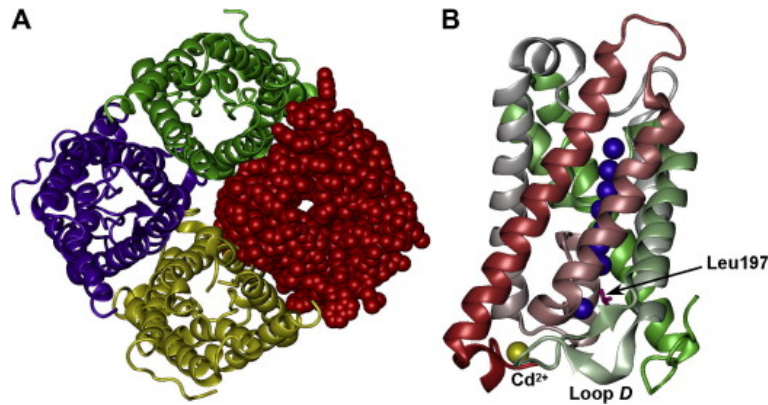


Figura 5.- Estructura molecular de PIP2; 1. (A) Estructura de la conformación abierta que muestra la disposición tetrámerica conservada de las aquaporinas. Cada subunidad delimita una entrada de poro. En el modelo se muestra el relleno de espacio de una subunidad (rojo). (B) Estructura de la conformación cerrada. El diagrama de cinta muestra el relleno de hélice de un monómero. Se muestra la unión de un ion  $Cd^{2+}$  en la cola N-terminal (roja). En el estado cerrado, el lazo D está anclado a esta cola. El residuo Leu197 (flecha) actúa como una compuerta hidrofóbica e interrumpe la continuidad de las moléculas de agua (azul) en el poro (Li *et al.*, 2014).

### 1.1.5. Clasificación de las aquaporinas.

Gracias a los resultados obtenidos por secuenciación masiva, en la actualidad se han descrito genes de aquaporina en todas las especies de plantas estudiadas, tanto en plantas modelo como en plantas de interés agronómico (Anderberg *et al.*, 2012). Estos estudios han revelado una gran diversidad de aquaporinas, con más de 30 isoformas en todas las especies analizadas (Maurel *et al.*, 2015).

Los homólogos de la aquaporina vegetal pueden clasificarse según su secuencia en hasta siete subfamilias pero la clasificación más aceptada es la que se basa en su localización subcelular (Anderberg *et al.*, 2012). Según este criterio se dividen en cuatro subfamilias. Tres de estas, las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIP), las proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIP) y las proteínas intrínsecas similares a la nodulina26 (NIP), están presentes en todas las plantas terrestres, desde no vasculares hasta vasculares (Li *et al.*, 2014). La cuarta familia es la de las proteínas intrínsecas básicas pequeñas (SIP), descritas recientemente. Estas últimas están ausentes en algunas especies de plantas superiores, como las monocotiledóneas o las *Brassicáceas* (Johanson *et al.*, 2002).



#### **1.1.5.1. PIP.**

La familia de genes PIP incluye 13 genes en arábido y maíz, 11 en arroz y 14 en álamo. Se puede subdividir en dos grupos, PIP1 y PIP2 (Kjellbom *et al.*, 1999). Ambos grupos de proteínas actúan como canales de agua, pero mientras las proteínas PIP1 están restringidas a la membrana plasmática, las proteínas PIP2 pueden localizarse también en vesículas del sistema de endocitosis (Fetter *et al.*, 2004; Zelazny *et al.*, 2007).

#### **1.1.5.2. TIP.**

Las proteínas de tipo TIP se localizan en su gran mayoría en la membrana del tonoplasto. Tienen diferentes funciones, entre ellas, pueden participar en la regulación del alargamiento celular y la homeostasis de la turgencia, mediando el transporte de agua y moléculas pequeñas a través de la membrana vacuolar (Wudick *et al.*, 2009). Se ha demostrado que los genes que codifican estas proteínas responden al estrés por sal, frío o sequía en diferentes especies de plantas (Zhang *et al.*, 2013), sugiriendo un impacto positivo de la sobreexpresión de TIP en la tolerancia de las plantas a estrés así como en el aumento de crecimiento y producción de biomasa (Peng *et al.*, 2007).

#### **1.1.5.3. NIP.**

Estas proteínas se localizan en el retículo endoplásmico. En comparación con PIP y TIP, las proteínas NIP tienen una menor actividad de transporte de agua pero una mayor permeabilidad a pequeñas moléculas orgánicas y nutrientes minerales. Se ha descrito que en plantas pueden transportar glicerol, amoníaco, ácido salicílico y diversos tipos de iones metálicos (micronutrientes y metales pesados) (Zangi y Filella, 2012).

Alexandersson y colaboradores (2005) monitorizaron la expresión de los 35 homólogos de aquaporina de arábido en respuesta al estrés por sequía y observaron que los genes NIP tienen una expresión reducida en estas condiciones. En cambio sí que se ha descrito que las proteínas NIP están involucradas en el

estrés por salinidad, posiblemente por su capacidad para transportar pequeños solutos e iones (Zelazny *et al.*, 2007).

Plantas de arabis con sobreexpresión de una NIP de trigo (TaNIP) mostraron una mayor tolerancia al estrés salino. La expresión de TaNIP se induce por un tratamiento con ABA, lo que sugiere su asociación con la señalización de respuesta a estrés dependiente de ABA (Gao *et al.*, 2010).

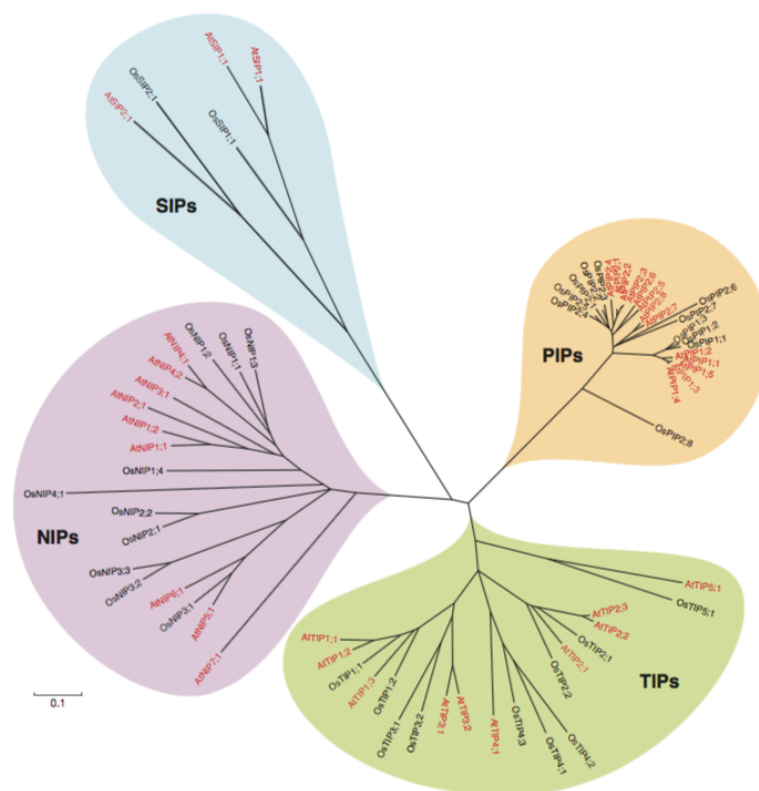


Figura 6.- Árbol filogenético de las familias de aquaporinas de arabis (rojo) y arroz (negro). La historia evolutiva de las aquaporinas de las dos especies de plantas se analizó utilizando el programa MEGA4 (280) (Maruel *et al.*, 2015).

### 1.1.6. Función de las aquaporinas.

El modelo de funcionamiento de la subfamilia PIP, es de apertura y cierre de poros “gating” (Sakurai *et al.*, 2005). Este modelo explica cómo el movimiento reversible de la abertura citoplásmica del poro controla la permeabilidad del agua. La activación de PIP es dependiente del pH y de un residuo de histidina conservado.

Análisis de la estructura-función de TIP, PIP y NIP en oocitos de *Xenopus* han puesto de manifiesto la importancia que tienen varios aminoácidos fosforilados situados en la cara citosólica de la proteína sobre el control del transporte de agua (Maurel *et al.*, 2015).

Tabla 1.- Tipos de aquaporinas y su relación con el estrés abiótico

Gene	Planta	Función	Estrés	Referencia
<b>Pppip2;1/Pppip2;2</b>	<i>P. Patens</i>	Transporte de agua	Sequía	(Lienard <i>et al.</i> , 2008)
<b>Atpip1a/B</b>	Arabidopsis	Transporte de agua	Sequía	(Kaldenho <i>et al.</i> , 1998)
<b>Atpip2;2</b>	Arabidopsis	Transporte de agua	Sequía	(Javot <i>et al.</i> , 2003)
<b>Atnip3-1</b>	Arabidopsis	Translocación de agua en raíz	Todos los estreses	(Xu <i>et al.</i> , 2015)
<b>Attip1;3/Attip5;1</b>	Arabidopsis	Translocación de N	Déficit De N	(Soto <i>et al.</i> , 2010)
<b>Ntaqp1</b>	Tabaco	Transporte de agua	Sequía	(Siefritz <i>et al.</i> , 2002)
<b>Atpip1;2</b>	Arabidopsis	Transporte de CO <sub>2</sub>	Alto contenido de CO <sub>2</sub>	(Uehlein <i>et al.</i> , 2012; Boudichevskaia <i>et al.</i> , 2015)
<b>PaPip1</b>	Olmo	Transporte de agua y CO <sub>2</sub>	Sequía	(Secchi y Zwieniecki, 2013)
<b>OsLsi1</b>	Arroz	Transporte de silicio	Estrés biótico	(Ma <i>et al.</i> , 2006)
<b>ZmNIP3;1 (Tls1)</b>	Maíz	Transporte de B	Déficit de B	(Durbak <i>et al.</i> , 2014)
<b>AtNip5;1</b>	Arabidopsis	Transporte de B	Déficit de B	(Takano <i>et al.</i> , 2006)

En plantas sometidas a estrés por frío, se reduce la presión y conductividad hidráulica de la raíz, lo que afecta el flujo de savia al resto de la planta ocasionando déficit hídrico en brotes y hojas, que a su vez induce el cierre estomático (Yu *et al.*, 2006).

En maíz se ha descrito que la exposición a frío induce una disminución inmediata de casi el 80% en la conductividad hidráulica de la raíz, tanto en variedades susceptibles como tolerantes. Sin embargo, la variedad tolerante muestra una capacidad única para compensar espontáneamente este efecto tras un enfriamiento prolongado (Yu *et al.*, 2006).

El análisis de la expresión génica en raíces y brotes de arroz, maíz y arabidopsis sometidos a bajas temperaturas muestran que el estrés por frío promueve la acumulación de transcritos de PIP, que retorna a niveles normales en unas 24 horas una vez restablecida la temperatura óptima de crecimiento (Sakurai *et al.*, 2005). Sin embargo, al menos en raíces de maíz y de arroz expuestas a frío, no siempre se observa una correlación entre la acumulación del transcrito y de la proteína aquaporina, lo que sugiere la existencia de algún tipo de regulación postranscripcional (Yu *et al.*, 2006).

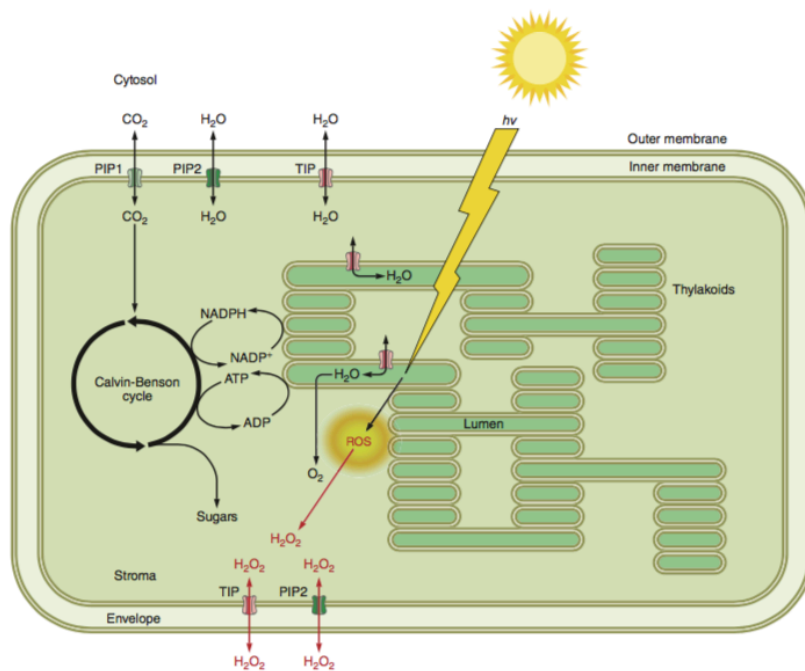


Figura 7.- Esquema de funcionamiento de las PIP y TIP (Maruel *et al.*, 2015).

La respuesta temprana de aquaporinas al estrés por frío ha sido descrita frecuentemente. Por ejemplo, plantas transgénicas de banano que sobreexpresan *MusaPIP1* y *MusaPIP2* mostraron una mayor tolerancia tanto al estrés por frío como a sequía (Shekhawat y Ganapathi, 2013). De forma similar la sobreexpresión de una aquaporina de trigo, *TaAQP7* (*PIP2*), incrementó la tolerancia a frío y sequía en tabaco (Huang *et al.*, 2014).

La mayoría de los estreses abióticos, inducen la producción de ABA, sin embargo experimentos realizados en arabidopsis indicaron que la respuestas de cada aquaporina al tratamiento con esta hormona fueron diferentes, lo que sugiere que la

regulación podría seguir tanto las vías de señalización dependientes como las independientes de ABA (Jang *et al.*, 2004).

En la figura 8 se esquematiza la implicación de las distintas familias de aquaporinas a los condiciones de estrés. Tanto las PIP como las TIP responden mejor a la sequía, la sal y el frío que perturban el equilibrio osmótico celular y las TIP responden mejor a la sequía, la sal y el frío los cuales perturban el equilibrio osmótico celular, regulan la conductividad hidráulica de la raíz y la tasa de transpiración. Las TIP junto con las NIP regulan la conductividad hidráulica de la raíz ( $L_p$ ) y las tasas de transpiración. Las TIP junto con las NIP están involucrados en las respuestas de estrés biótico e intervienen en la regulación de la homeostasis de nutrientes entre el huésped y las respuestas al estrés biótico e interactúan con algunas proteínas de patógenos (Afzal *et al.*, 2016).

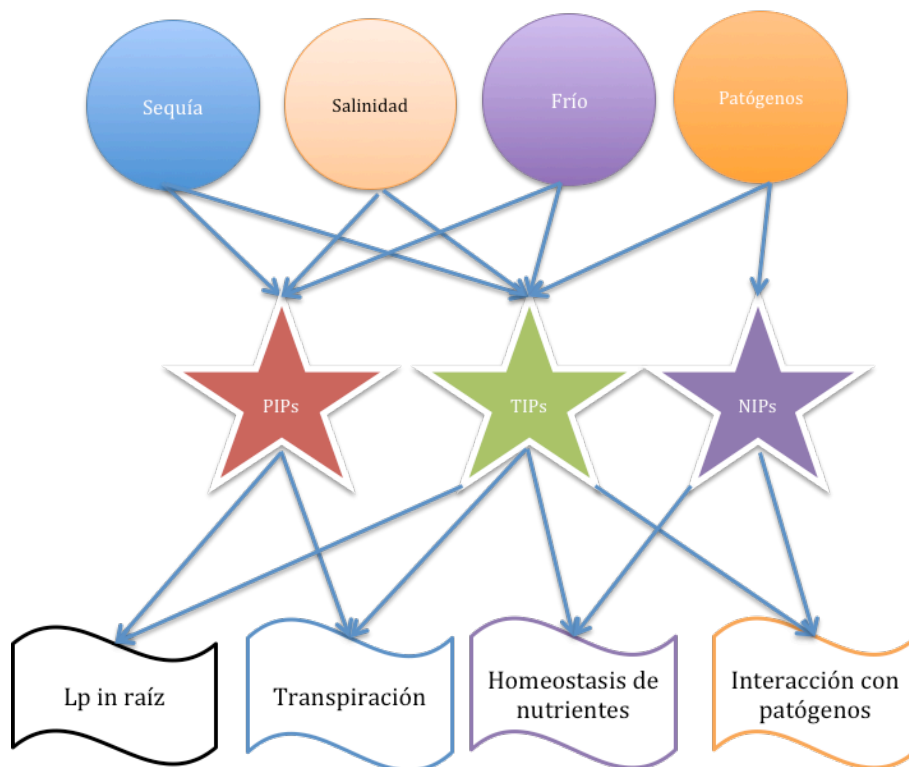


Figura 8.- Respuesta de las aquaporinas a distintos estreses (Afzal *et al.*, 2016).

### 3.4 Regulación de la respuesta a frío mediada por silenciamiento de RNA.

El término silenciamiento de RNA engloba una serie de eventos por los cuales la expresión de uno o más genes se inhibe o suprime por el efecto de una molécula de RNA antisentido. El descubrimiento de que un RNA podía actuar como elemento regulador de los genomas eucariotas ha supuesto una de las últimas revoluciones en el campo de la biología molecular.

En plantas, el silenciamiento de RNA engloba una serie de procesos que actúan a nivel transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) o postranscripcional (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS). Ambos procesos tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA (small RNAs, sRNAs). Este mecanismo regulador está conservado en los eucariotas y sus funciones son diversas: mantenimiento de la estabilidad del genoma (Vaucheret, 2006; Liu *et al.*, 2010), regulación de procesos del desarrollo (Chen, 2009) y defensa frente a ácidos nucleicos invasores (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009).

El silenciamiento se induce por la presencia de RNAs bicatenarios (dsRNA) de diverso origen o RNAs monocatenarios (ssRNAs) con una alta estructura secundaria (*hairpins*) que son procesados en moléculas de RNAs bicatenarias de entre 18 y 25 nts (sRNAs) por RNAsas de tipo III denominadas en plantas como *Dicer-Like* (DCLs). Los sRNAs generados por la acción de DCL poseen dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3' en ambas cadenas. Una RNA helicasa separa ambas cadenas de sRNAs y una de ellas es reclutada en un complejo inductor del silenciamiento (*RNA-induced silencing complex*, RISC), que contiene una proteína Argonauta (AGO) con actividad RNasa H la cual rompe los enlaces 3'-O-P del ácido ribonucleico hibridado con ADN para producir extremos 3'-hidroxil y 5'-fosfato, además de otros componentes. Una vez ensamblado, RISC es guiado por el sRNA hasta un RNA mensajero (mRNA) de secuencia complementaria (diana) al que este complejo se une induciendo la inhibición de su traducción o su degradación. En el TGS, este complejo efector es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria

al cual se une, induce su metilación y bloquea su transcripción, participando en la formación de la heterocromatina.

Los avances en las técnicas de secuenciación masiva y clonado de sRNAs han revelado que al menos en *Arabidopsis* los sRNAs con mayor presencia son los microRNAs (miRNAs) por lo que se supone para ellos un papel fundamental en la regulación de la mayoría de sus procesos celulares (Rajagopalan *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2007).

### 1.1.7. Micro RNAs (miRNAs).

Los miRNAs son pequeños RNAs endógenos que ejercen su acción sobre genes distintos de los que proceden (hetero-silenciamiento) (Bartel, 2004; Vaucheret, 2006). Los miRNAs Lin-4 y let-7 de *Caenorhabditis elegans* fueron los primeros en ser descritos, a partir de un análisis de mutantes deficientes en el desarrollo larvario (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000). El análisis de las secuencias precursoras de estos miRNAs determinó que provenían de un RNA con un apareamiento imperfecto de aproximadamente unos 70 nts. Además, el sRNA de 21 nt que producía tenía una complementariedad parcial con la región 3' no traducida (UTR) del mensajero que reprimían (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Du y Zamore, 2005; Kim, 2005a, 2005b). El descubrimiento de estos miRNAs sentó las bases para que otros laboratorios clonaran otros sRNAs de entre 21 y 24 nts en distintos organismos. Todos los sRNAs que tenían las características de lin-4 y let-7 (derivados de precursores parcialmente plegados en una estructura tipo horquilla distintos del mRNA sobre el que ejercen su efecto) fueron denominados a nivel colectivo como miRNAs.

En plantas los miRNAs tienen un tamaño que oscila entre 20-22 nts y desempeñan un importante papel biológico al regular funciones tan diversas como el control del desarrollo de la hoja y la flor (Aukerman y Sakai, 2003; Emery *et al.*, 2003; Kidner y Martienssen, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Chen, 2004; Juarez *et al.*, 2004a, 2004b; Baker *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005), la formación y desarrollo de raíces laterales (Rhoades *et al.*, 2002; Chen, 2005; Zhang *et al.*, 2006), y la respuesta a estreses abióticos tan diversos como salinidad y frío (Sunkar y Zhu, 2004), sequía (Zhao *et*

*al.*, 2007) o luz ultravioleta (UV) (Zhou *et al.*, 2007). En general las dianas de los miRNAs incluyen a una gran variedad de factores de transcripción, factores del metabolismo de sRNAs, componentes de la ruta de degradación de proteínas mediada por ubiquitina, genes de resistencia y transcritos no codificantes (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Allen *et al.*, 2005; Rajagopalan *et al.*, 2006; Fahlgren *et al.*, 2007).

Los precursores de los miRNAs son RNAs transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) en una estructura llamada miRNA primario (pri-miRNA), con extremo CAP y poliadenilado (Figura 9). Este pri-miRNA forma una estructura secundaria parcialmente plegada que es procesada para dar lugar a una estructura precursora tipo horquilla (pre-miRNA) de la que serán escindidos los duplo de miRNAs (Rogers y Chen, 2013).

En plantas, la secuencia de los genes que dan lugar a los miRNAs (genes MIR) comienzan habitualmente con una adenosina localizada a 40 nts de distancia (en sentido 5'-3') de una secuencia similar a una TATA box (Xie *et al.*, 2010). La longitud del pre-miRNA (70-100 nts) suele ser por lo general más larga que en animales. Su biogénesis es también algo diferente: DCL1 tiene las dos funciones (Drosha y Dicer) y actúa en el núcleo (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Papp *et al.*, 2003; Kurihara y Watanabe, 2004; Borges y Martienssen, 2015). DCL1 interactúa con HYL1 y la proteína con dominio C2H2 de dedos de zinc SERRATE (SE) en unos centros de procesamiento nucleares denominados cuerpos D o cuerpos SmD3/SmB, donde se lleva a cabo la conversión de pri-miRNA a pre-miRNA (Kurihara *et al.*, 2006; Fang y Spector, 2007).

La proteína nuclear de unión a RNA DDL, parece actuar también a este nivel, interaccionando con DCL1 para estabilizar el pri-miRNA, aunque su acción parece extenderse a la biogénesis de miRNAs (Borges y Martienssen, 2015). El duplo miRNA/miRNA\* es metilado por HEN1 (Han *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2004; Hiraguri *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005) y este duplo estabilizado o el miRNA maduro son exportados entonces al citoplasma mediante un ortólogo de EXP5 (HST) (Park *et al.*, 2005) aunque la acumulación de algunos miRNAs no se ve afectada en mutantes *hst* por lo que estos deben de ser exportados de alguna manera alternativa



(tal vez asociados a AGO1) (Xie *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Borges y Martienssen, 2015).

El miRNA maduro se carga en AGO1 por la unión de su extremo 3' al dominio PAZ. El complejo RISC dirigido por el miRNA busca a su mRNA homólogo mediante un mecanismo de escaneo de helicasa y este mRNA es cortado entre la base 10 y 11 desde el extremo 5' del miRNA (Kidner y Martienssen, 2005). Los fragmentos del mRNA resultantes tras el corte son degradados por la 5'-3' EXORIBONUCLEASE4 (XRN4) en el citoplasma. AGO1 no solamente mediaría el corte del mRNA homólogo al miRNA sino que también reprimiría su traducción (Brodersen *et al.*, 2008).

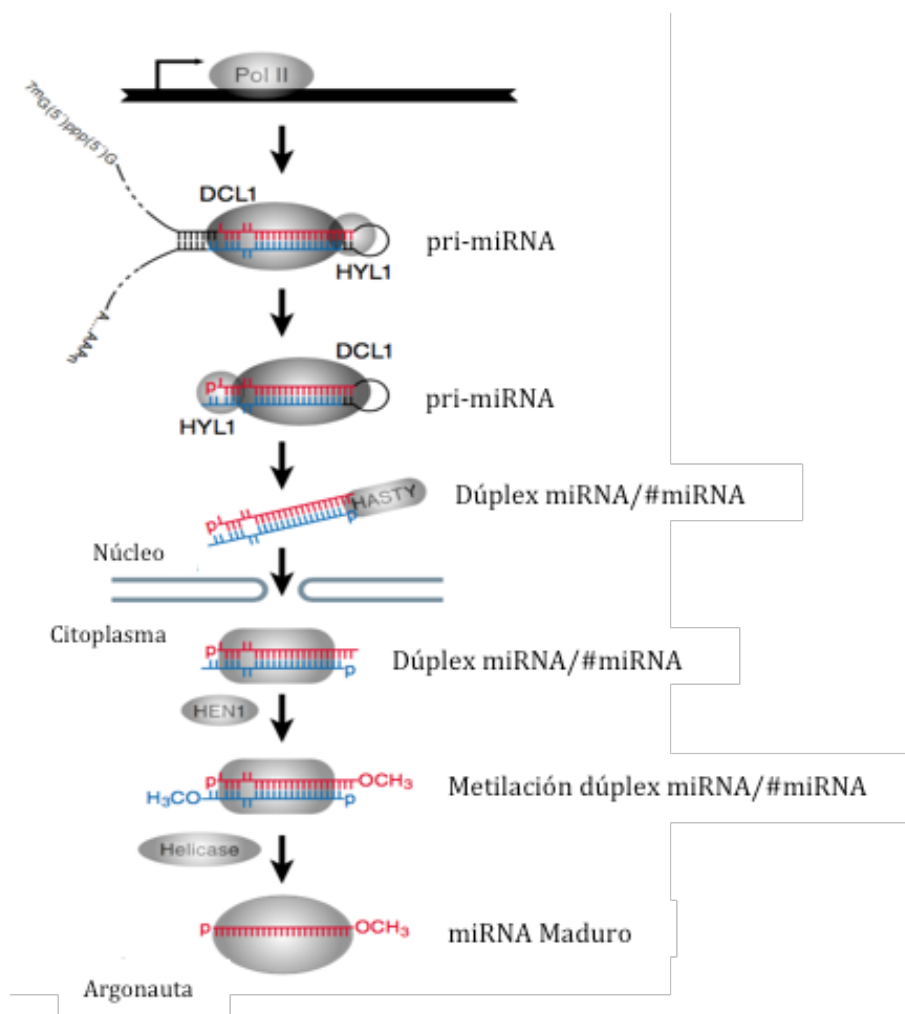


Figura 9.- Procesamiento de miRNA en plantas (Tingting Du y Phillip D. Zamore 2005).

### 1.1.8. Implicación de los miRNA en la respuesta a estrés

En respuesta a condiciones ambientales adversas es común que las plantas alteren de manera drástica sus niveles de miRNAs. Diversos miRNAs con expresión diferencial frente a estrés han sido identificados en *arabidopsis* (Sunkar y Zhu, 2004; Liu *et al.*, 2008), *Populus* (Lu *et al.*, 2008) y *Brachypodium* (Zhang *et al.*, 2009), arroz (Devia *et al.*, 2013), soja (Joshi *et al.*, 2010), maíz (Liu *et al.*, 2012), tomate (Moxon *et al.*, 2008), etc.

Uno de los trabajos pioneros en determinar la estrecha relación existente entre regulación de la respuesta a estrés y los miRNAs se realizó mediante la secuenciación de sRNAs extraídos a partir de plántulas de *arabidopsis* sometidas a diferentes situaciones de estrés abiótico (frío, deshidratación, sal y tratamiento con ABA) (Sunkar y Zhu, 2004). Este estudio permitió identificar diversos miRNAs con acumulación diferencial bajo condiciones de estrés abiótico. Como ejemplo podemos mencionar a miR393, cuyos niveles se incrementaron en condiciones de frío, sequía, salinidad y tratamiento con ABA. Por otra parte miR397b y miR402 mostraron drásticas reducciones de acumulación en respuesta a todos los tratamientos, mientras que miR319c fue inducido por frío, pero mostró acumulación similar al control frente a los demás tratamientos (Sunkar y Zhu, 2004).

Otra aproximación fue el análisis en *arabidopsis* de los niveles de miRNAs bajo condiciones de salinidad, sequía y baja temperatura (Liu, *et al.*, 2008). En este trabajo se detectaron 17 miRNAs inducidos por estrés, estos resultados se confirmaron mediante la detección diferencial de sus precursores y el análisis de sus secuencias promotoras (Liu *et al.*, 2008). Rhoades y Bartel en 2004 identificaron nuevos miRNAs relacionados a estrés en *arabidopsis*. Determinaron que la expresión de miR395 se incrementó tras el ayuno de sulfato, además predijeron la identidad de sus genes dianas (Rhoades y Bartel, 2004). En la figura 10 se resumen los principales miRNAs identificados como relacionados a estrés en diversas especies vegetales.

Diversos estudios coinciden en señalar que en general miRNA inducidos por estrés actúan como reguladores negativos de procesos asociados al desarrollo, mientras

que aquellos miRNAs cuya acumulación disminuye frente a una condición ambiental adversa suelen regular genes de respuesta a estrés (Mishra *et al.*, 2009).

Estos antecedentes ponen de manifiesto la estrecha relación existente entre los niveles de miRNA en la planta y los mecanismos de respuesta a estrés en general y frío en particular.



Figura 10.- miRNA con su dianas y su relación en distintas situaciones de estrés (Mishra *et al.*, 2009).

En lo que se refiere específicamente a la relación entre estrés inducido por frío y expresión diferencial de miRNAs, cabe mencionar algunos ejemplos. Se ha demostrado por ejemplo que miR393 y miR402 se sobre acumulan en plantas de arabis expuestas a bajas temperaturas, mientras que los niveles de miR398 disminuyen de manera significativa (Sunkar y Zhu, 2004). Estudios posteriores realizados en esta misma especie permitieron identificar diversos miRNAs (miR165/166, miR169, miR172, miR393, miR396, miR397, miR408) significativamente regulados por estrés por frío (Zhou *et al.*, 2008).

En *Brachypodium*, 25 miRNAs, mostraron una expresión alterada en respuesta al estrés por frío (Zhang *et al.*, 2009). De los 25 miRNAs alterados, la mayoría se regularon negativamente, y solo tres miRNAs conservados (miR169, miR172 y miR397) se regularon positivamente (Zhang *et al.*, 2009). En ricino, se encontró que 41 miRNAs estaban regulados negativamente y cuatro estaban regulados positivamente bajo estrés por frío (Zeng *et al.*, 2010).

En caña de azúcar, el miR319 se reguló positivamente tanto en raíces como en brotes, siendo en las raíces donde se registró una mayor acumulación (Thiebaut *et al.*, 2011). De hecho, la expresión inducida por frío de miR319 se confirmó mediante el uso de hibridación *in situ* en raíces de caña de azúcar (Thiebaut *et al.*, 2011). Gracias al uso de herramientas bioinformáticas se predijo que miR319 podría regular dos factores TCP (PCF5 y PCF6) y un gen MYB (gaMYB) en caña de azúcar (Thiebaut *et al.*, 2011). Estudios de cuantificación de la expresión demostraron que estos tres genes se regularon negativamente durante la exposición a frío, lo que sugiere que el miR319 inducido por frío es probablemente la causa de dicha disminución en la abundancia del transcrito (Thiebaut *et al.*, 2011).

Estudios realizados en dos cultivares de yuca uno resistente (SC124) y otro susceptible (C4) a frío, evidenciaron una acumulación diferencial de miRNAs en respuesta al estrés entre genotipos resistentes y susceptibles. 32 miRNAs fueron regulados negativamente y seis fueron regulados positivamente en el cultivar SC124. Mientras que, en el cultivar C4 cuatro miRNAs se expresaron con una menor acumulación y 31 con una mayor acumulación (Zeng *et al.* 2010). Por otra parte, siete miRNAs (miR156e, 160c, 164d, 168, 395a, 398a, 399a) mostraron un patrón de expresión similar en los dos cultivares, mientras que 26 miRNAs pertenecientes a 16 familias (miR156a, c, d, miR157a, c, b, miR159, miR160a, b, miR162, miR166a, b, c, d, e, miR167c, miR171a, b, miR395b, c, d, e, miR396c, miR397 y miR403a, b) mostraron el patrón de expresión opuesto en ambos cultivares (Zeng *et al.*, 2010).

Con todos estos antecedentes la presente tesis doctoral está diseñada en torno a dos abordajes diferentes para descifrar la respuesta de las plantas a frío y su relación con diferentes estreses abióticos, uno basado en la función de una aquaporina y otro en la identificación de miRNAs.



## 4 CAPITULO 1 *BVCOLD1* UNA NUEVA AQUAPORINA DE REMOLACHA AZUCARERA (*Beta vulgaris* L.) QUE TIENE UN PAPEL EN LA RESPUESTA A FRÍO Y EN LA HOMEOSTASIS DE BORO.

### 4.1 Introducción.

La remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) es la segunda fuente de azúcar más importante del mundo después de la caña de azúcar. Se cultiva en climas templados de Europa, América del Norte y Sur, Rusia, y Asia. La producción en todo el mundo se estima en 172 millones de toneladas por año constituyendo el 20% de la producción mundial de azúcar, siendo la caña de azúcar, la principal fuente de producción azucarera con el 80% del suministro mundial. (FAO 2009).

El cultivo de la remolacha azucarera no solo se centra en la industria azucarera, también sirve para la alimentación humana y del ganado bovino (Evans *et al.*, 2017), para la producción de bioetanol (Zabed *et al.*, 2014) y también se cultiva para utilizar sus hojas como hortalizas, específicamente la variedad cicla, que en España se conoce popularmente como acelga.

El estrés ambiental es el principal responsable de la pérdida de productividad de la remolacha azucarera. La temperatura óptima para la germinación es de 25 °C, aunque puede germinar en temperaturas que varían desde los 3 a los 30 °C. Se cultiva en áreas templadas y la época de siembra es a comienzos de la primavera, para mejorar la producción de raíces y escapar de la sequía estival en la madurez. En algunas áreas del sur de Europa se siembra en otoño para anticipar la cosecha y escapar de la sequía y de patógenos como la cercospora. Las zonas en las que normalmente se desarrolla el cultivo (templadas) son propensas a las heladas o bajas temperaturas, por tal motivo este cultivo puede estar sometido a estrés por baja temperatura, lo cual es una de las causas importantes en la disminución de la calidad y el rendimiento, ya que disminuye la acumulación de azúcares y el crecimiento de la planta (Moliterni *et al.*, 2015).

Esta susceptibilidad a las bajas temperaturas es especialmente perjudicial para la planta si las temperaturas caen por debajo de 5 °C en las primeras etapas de desarrollo, puesto que se produce una atrofia irreversible. Una temperatura de alrededor de 0 °C puede matar a la planta en la etapa de cotiledón. En etapas posteriores del desarrollo, cuando la planta tiene de tres a cuatro hojas verdaderas, puede soportar hasta -2 °C (Bechtold, 1993).

Se ha demostrado que el frío pueden alterar la absorción y distribución del B en la planta (Huang *et al.*, 2005). El B es uno de los micronutrientes más demandados en el cultivo de la remolacha. Se necesita constantemente a lo largo de la vida vegetal ya que juega un papel clave como elemento estructural de la pared celular. La deficiencia de este mineral causa una amplia gama de síntomas que incluyen el detenimiento del crecimiento de la raíz, la reducción en el desarrollo foliar y la esterilidad de sus semillas, aunque varía según la especie y la etapa de desarrollo (Dell *et al.*, 1997; Goldbach *et al.*, 2001).

A nivel molecular hay varios genes identificados que pueden conferir tolerancia al frío, como el factor de transcripción *GhDOF1* en algodón (Su *et al.*, 2017) o la proteína ribosómica P3 de arábido y la P3B en batata (Ji *et al.*, 2017). También hay descripciones de genes que pueden aumentar el crecimiento en condiciones deficientes de B, como *BnaC4.BOR1;1c* de *Brassica napus* (Zhang *et al.* 2017) y el gen de arábido *AtBOR1* al ser sobreexpresado en plantas de tomate (Törnroth *et al.*, 2006).

En la mayoría de los organismos, la respuesta temprana al estrés ambiental depende de factores de transcripción. El genoma de la remolacha azucarera tiene menos factores de transcripción que cualquier otro genoma conocido de plantas con flores (Dohm *et al.*, 2014). Se ha identificado un homólogo del factor de transcripción CBF3 de arábido como regulador positivo de la respuesta al estrés por frío (Molteni *et al.*, 2015), pero no se ha demostrado que ningún gen de *Beta vulgaris* confiera tolerancia al frío por sobreexpresión en ningún organismo. El único material de remolacha azucarera genéticamente modificado disponible a nivel comercial es una variedad resistente a herbicida glifosato, transformado con un gen bacteriano (Dewar *et al.*, 2003).

Identificar genes de remolacha azucarera, cuya función confiere resistencia en condiciones de frío puede mejorar nuestra comprensión de estos mecanismos básicos, al mismo tiempo puede proporcionar genes útiles para desarrollar estrategias biotecnológicas para generar nuevas variedades de remolacha azucarera más eficientes y resistentes, otra ventaja es que al ser genes identificados en *Beta vulgaris*, permitirá el uso de nuevas técnicas de mejora genética como CRISPR/Cas9 o incluso la mejora genética clásica asistida por marcadores moleculares, con el fin de desarrollar nuevas y mejores variedades.

Con este objetivo, hemos rastreado una biblioteca de cDNA de hojas de *Beta vulgaris* sometidas a estrés abiótico para identificar genes capaces de conferir tolerancia al estrés por frío. Para ello hemos empleado una estrategia similar a la empleada previamente por Kanhonou y colaboradores (2001) y por Mulet y colaboradores (2004) para identificar genes de *Beta vulgaris* capaces de conferir tolerancia al estrés por salinidad y por sequía respectivamente. En el presente trabajo utilizando el enfoque de sobreexpresión en levadura (Serrano *et al.*, 2003) hemos identificado una nueva aquaporina de remolacha azucarera (BvCOLD1), similar a las aquaporinas TIP1, pero que solo está presente en los genomas de la especie *Spinacea oleracea* (espinaca) y algunos miembros halotolerantes de la subfamilia *Chenopodioideae* de la familia *Amaranthaceae*.

*BvCOLD1*, es capaz de conferir tolerancia al estrés por frío y a otros tipos de estrés abiótico a plantas transgénicas de arábidopsis y potenciar el crecimiento bajo condiciones limitantes de boro, constituyendo así un gen diana interesante para la futura mejora biotecnológica de este cultivo industrial (Mulet *et al.*, 2004).



## 4.2 Objetivos

- Caracterizar la función y localización de BvCOLD1.
- Generar y caracterizar líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen de forma estable *BvCOLD1*.

## 4.3 Materiales y métodos.

### 4.3.1 Construcción de la biblioteca de cDNA y rastreo en levadura.

Las levaduras se cultivaron en medio mínimo sintético de glucosa (SD) o en medio rico (YPD). El medio SD contenía 2% de glucosa, 0.7% de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y 50 mM de ácido succínico, ajustado a pH 5 con Tris (Tris- (hidroximetil) -aminometano), más los aminoácidos requeridos: 100  $\mu$  g/ml leucina, 30  $\mu$  g/ml de adenina, 30  $\mu$  g/ml de triptófano y 30  $\mu$  g/ml de histidina. El medio YPD contenía un 1% de extracto de levadura (Difco), un 2% de peptona y un 2% de glucosa.

La biblioteca de levadura se construyó a partir de hojas de remolacha sometidas a estrés por salinidad y se incluyó en el plásmido pYPGE15, plásmido multicopia derivado del plásmido de 2 $\mu$ . El método de selección para *E. coli* es por resistencia a ampicilina y el gen *URA3* como método de selección en levadura (Brunelli y Pall, 1993). Con este plásmido se transformó la cepa W303 de levadura W303 (MAT a/ $\alpha$  *ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*; Wallis *et al.*, 1989).

Las transformaciones se hicieron por el método LiCl (Ito *et al.*, 1983). Se usaron células diploides en el cribado para evitar el aislamiento de mutaciones cromosómicas recesivas. La selección se realizó a 28 °C en placas SD que contenían todos los requisitos nutricionales excepto el uracilo. Los transformantes seleccionados por recuperar la prototrofia de uracilo en placas SD sin uracilo se juntaron y se volvieron a sembrar en placas SD frescas a una densidad de 2x10<sup>5</sup> células / placa (14 mm de diámetro). Las colonias capaces de crecer después de 8 días a 10 °C fueron elegidas para estudios posteriores.

Los supuestos clones positivos (capaces de conferir tolerancia a crecimiento en frío) se ensayaron para reconfirmar el fenotipo de tolerancia al frío. El DNA plasmídico se volvió a transformar para confirmar que el fenotipo dependía del plásmido aislado y no de una mutación cromosómica. Después de esta última confirmación, los

positivos se secuenciaron. Entre los positivos seleccionados se encontraba el clon JM188 que contenía el gen *BvCOLD1* por lo que denominamos el plásmido pYPGEBvCOLD1.

#### **4.3.2 Medida de la concentración de B intracelular.**

Las células se cultivaron en SD hasta una absorbancia a 600 nm de 0,6 - 0,7, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.900 g, se resuspendieron en medio SD que contenía 90 mM de ácido bórico. Se tomaron alícuotas cada 30 minutos, estas se centrifugaron durante 5 min a 1.900 g a 4 °C, el pelet se resuspendió en 1 ml de agua y se transfirió a un tubo Eppendorff de 1,5 ml, seguidamente se realizaron dos lavados con agua. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,5 ml de agua. Para extraer los iones las células se calentaron durante 15 minutos a 95 °C, analizando las alícuotas en un espectrofotómetro de emisión de plasma (Shimadzu).

#### **4.3.3 Construcciones para la sobreexpresión de *BvCOLD1* y la proteína de fusión GFP.**

La secuencia *BvCOLD1* se amplificó usando como cebadores:

- Directo:

5'-GTA CTGAGATGCCGATCAGCAGAATT-3'

- Reverso:

5'-TATGGATT CAGCAGAAAGTCTTTGGTA-3'.

El producto de la PCR se clonó en el sitio EcoRV de pBS-SK- (Stratagene, EE. UU.), para crear el plásmido JM866. La secuencia de *BvCOLD1* se confirmó para descartar la presencia de mutaciones.

La construcción JM866 se digirió con XhoI-EcoRI para obtener un fragmento que incluye el cDNA de *BvCOLD1*. Este fragmento se subclonó en el plásmido pXCS-HA-Strep (Witte CP *et al.*, 2004) esto da como resultado el plásmido JM869, una construcción para la sobreexpresión de *BvCOLD1* bajo el control del promotor 35S.

Para la fusión BvCOLD1-GFP, utilizamos como cebador el oligonucleótido 5'-CCCGGATTCAGCAGAAAGTCTTTGGTA, para amplificar *BvCOLD1* utilizando el plásmido JM866 como molde y el cebador directo mencionado anteriormente, luego se digirió con XhoI-BamHI y el fragmento resultante se clonó en el plásmido JM743 (que contiene la secuencia de la GFP), para crear una proteína de fusión BvCOLD1-GFP (plásmido JM868).

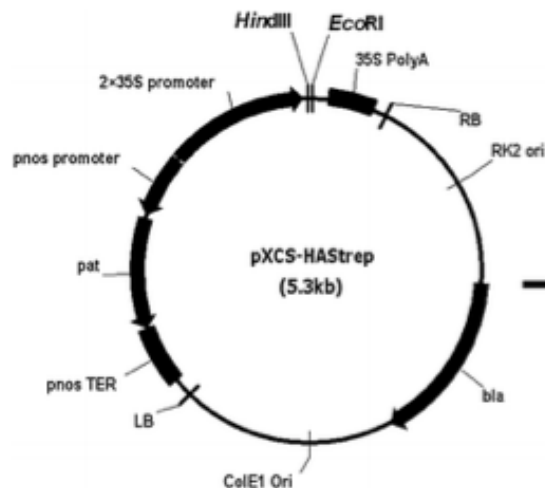


Figura 11.- Mapa del plásmido pXCS-HA-Strep (Witte CP 2004).

En el experimento de localización celular en levadura se utilizó el plásmido que contiene la fusión BvCOLD1-GFP, mediante la estrategia de recombinación homóloga de levadura. Amplificamos el gen sGFP del plásmido JM743 usando como cebadores.

- Directo: 5'-  
ACCAAGAGCCTGCATCAGACTACCAAAGACTTTCTGCTATGGTGAGCAAGG  
GCGAG
- Reverso 5'-  
CCACCAAAGGCCATCTTGAACCGGGCCCCCCTCGAGCTTGTACAGCTC  
GTCCAT

Amplificamos la secuencia de sGFP que incluye en ambos bordes una secuencia homóloga al plásmido JM869. Transformamos la levadura con el producto de PCR descrito y el plásmido JM869 digerido con XhoI. El plásmido se recuperó de las

colonias obtenidas y se secuenció para confirmar la integridad y la ausencia de mutaciones en la secuencia. El plásmido resultante fue llamado JM883.

#### **4.3.4 Construcciones de plantas transgénicas de arabidopsis y condiciones de crecimiento.**

Las plantas de arabidopsis de ecotipo Columbia (Col0), se cultivaron en condiciones de invernadero (16 h luz / 8 h oscuridad, a  $23 \pm 2$  °C de temperatura y  $70 \pm 5\%$  de humedad relativa) en macetas que contenían una mezcla de vermiculita y turba, regando las plantas dos veces a la semana con solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938).

El plásmido JM869 se introdujo en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) por electroporación. Las plantas silvestres de arabidopsis se transformaron por infiltración floral (Bechtold *et al.*, 1993). Las plantas transformadas se seleccionaron añadiendo BASTA 0,76 mM y la expresión del transgén se confirmó adicionalmente mediante (qRT) –PCR o *Northern*.

#### **4.3.5 Condiciones de crecimiento de *Beta vulgaris*.**

Las semillas se esterilizaron durante 3 minutos en etanol puro y se lavaron varias veces con agua estéril para eliminar cualquier rastro de alcohol, luego las semillas se colocaron en vermiculita estéril a 25 °C para germinar, a los diez días se trasplantaron a macetas que contenían turba de musgo con vermiculita.

Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero con 70-80% de humedad relativa, temperaturas diurnas de 25 °C, nocturnas de 15 °C y un fotoperiodo de 16 horas a una densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) de  $800 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Li - Cor, Lincoln, NE, EUA; modelo LI-188B). Se suministró riego diariamente para mantener el suelo a capacidad de campo durante todo el experimento.

#### 4.3.6 Extracción del RNA y análisis de transferencia *Northern*.

El RNA total de remolacha azucarera y arabidopsis se aisló por extracción con fenol-cloroformo, seguido de una precipitación con LiCl (Kay *et al.*, 1987), el tratamiento con DNasa al RNA total de la remolacha azucarera se realizó de acuerdo con las recomendaciones de Promega, las extracciones se almacenaron a -80 °C.

Para el *Northern blot* se utilizó una sonda específica de *BvCOLD1* obtenida por marcaje mediante PCR radioactivo de insertos de plásmido, el RNA total (15  $\mu$ g) de *Beta vulgaris* se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% que contenía formaldehído 2,2 M y se transfirió a membranas de nylon *Hybond-N* + (Amersham, Little Chalfont, RU) por capilaridad, el proceso se verificó mediante tinción con azul de metileno, la hibridación se realizó durante 3 horas a 42 °C con una solución de Denhardt 5x (Thermo Fisher Scientific), SSC 5x (0.75 M NaCl y 75 mM de citrato de trisodio ajustado a pH 7.0 con HCl) y 0,5% SDS (dodecil sulfato de sodio), y la sonda específica *BvCOLD1*. La sonda no incorporada se eliminó usando columnas *Mini Quick Spin* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La transferencia se realizó durante toda la noche a 65 °C, después se lavó dos veces durante 5 min. a temperatura ambiente con SSC 2x y 0.1% SDS, y dos veces durante 15 minutos a 65 °C con SSC y 0.1% SDS, las membranas fueron expuestas durante la noche a Kodak X-RAY-OMAT a 70 °C. Las señales en autorradiogramas se analizaron y cuantificaron usando el *software Quantity One* (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido).

Los niveles de acumulación de transcripción para cada sonda se normalizaron de acuerdo con la cantidad de RNA en la membrana, cada cuantificación del autorradiograma se repitió tres veces y el valor promedio se utilizó para la normalización, los análisis de transferencia *Northern* se repitieron dos veces con diferentes conjuntos de plantas.

#### **4.3.7 Expresión génica transitoria mediada por *Agrobacterium* en *N. benthamiana*.**

*Agrobacterium tumefaciens* transformado con el plásmido JM868 se cultivó hasta la saturación en medio LB (10 ml) a 28 °C durante 16 h. Pasado este tiempo se centrifugó y resuspendió en el mismo volumen de MgCl 10 mM, MES (morfolino etanosulfonato de sodio) 10 mM a pH 5,6 y acetosiringona 200 mM. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 h, sin agitación. Se usó una jeringa (sin aguja) para inyectar el cultivo de *Agrobacterium* en la hoja. Las plantas se cultivaron durante 3-4 días en invernadero antes de que se realizara la localización de GFP por microscopía.

#### **4.3.8 Microscopía confocal.**

La fluorescencia de GFP se observó mediante un microscopio confocal Leica TCS-SL y un sistema de imágenes confocales de barrido láser. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm.

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Cribado de una biblioteca de cDNA de hojas de *Beta vulgaris* y aislamiento de *BvCOLD1*.

Algunos de los mecanismos moleculares de la respuesta de la levadura al estrés abiótico son similares a los de las células vegetales (Serrano R. *et al.*, 1999). Una herramienta útil para identificar estos mecanismos es la expresión heteróloga de genes de plantas en levadura, la cual nos permite identificar los pasos limitantes en la respuesta al estrés (Serrano *et al.*, 2003; Mulet *et al.*, 2004). Con el fin de identificar genes de remolacha cuya función es limitante en condiciones de frío realizamos un escrutinio para buscar genes de *Beta vulgaris* capaces de conferir la capacidad de crecer a la levadura en condiciones de frío (10 °C). Uno de los plásmidos aislados contenía un cDNA de 889 nucleótidos con una pauta abierta de lectura a la que denominamos *BvCOLD1*. Como vemos en la figura 12, la sobreexpresión en levadura confirmó un crecimiento mejorado a 10 °C.

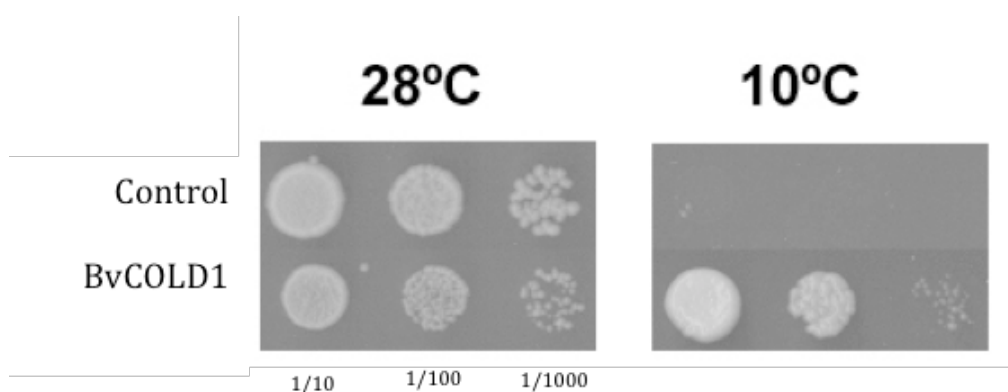


Figura 12.- Goteo de levaduras transformadas con el plásmido vacío (línea superior) y con el plásmido conteniendo el gen *BvCOLD1* (línea inferior), evaluando su tolerancia a frío.

Para confirmar que el gen se traducía eficazmente en levadura y determinar su localización, construimos una fusión con la proteína fluorescente verde (GFP). La localización fue irregular, con un patrón circular distintivo (figura 13). Esto podría indicar una localización en el retículo endoplásmico (RE) y la membrana nuclear. Para confirmar que la señal que estábamos observando era el retículo endoplásmico, se tiñeron los núcleos con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se



confirmó que la estructura que estábamos observando rodeaba los núcleos, por lo que puede atribuirse al RE y la envoltura nuclear.

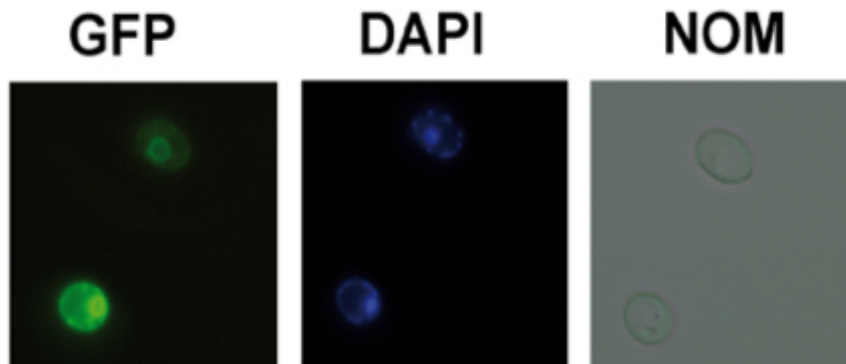


Figura 13.- Localización de la expresión del gen *BvCOLD1* fusionada a una proteína reportera GFP (izquierda), células teñidas con DAPI (centro) y células en campo claro con microscopía Nomarsky.

#### 4.4.2 Análisis de secuencia de *BvCOLD1*.

La pauta abierta de lectura identificada codifica una proteína de 254 aminoácidos. Un análisis *BLAST* de nucleótidos contra el genoma de *Beta vulgaris* confirmó la presencia de *BvCOLD1* en el genoma con una homología del 100% idéntico a la secuencia del gen hipotético BVRB\_7g179210 (Figura 14), anotada como probable aquaporina TIP 1-2, que se encuentra codificada en el cromosoma 7, entre las posiciones 532266 y 534970, en la cadena negativa. Además se determinó que no tiene genes parálogos en el genoma de *Beta vulgaris*.

PREDICTED: Beta vulgaris subsp. vulgaris probable aquaporin TIP1-2 (LOC104908845), mRNA  
 Sequence ID: [XM\\_010698008.2](#) Length: 1200 Number of Matches: 1

Range 1: 40 to 901 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1533 bits(830)	0.0	853/864(99%)	2/864(0%)	Plus/Plus

Figura 14.- Resultados del análisis BLAST entre *BvCOLD1* frente al genoma de *Beta vulgaris*.

La estructura del genoma mostró que el gen *BvCOLD1* tiene dos exones y un único intrón de 1,6 kb que va desde la posición 532850 hasta la posición 534517 (figura 15).

Realizando el mismo análisis contra la base de datos de espinaca (*Spinacea oleracea*), como podemos observar en la figura 16, se identificó un ortólogo de

*BvCOLD1* anotado como TIP1-1 aquaporina que comparte el 81% de la identidad y el 98% de las homologías positivas con un valor de predicción de  $2e^{-172}$ .

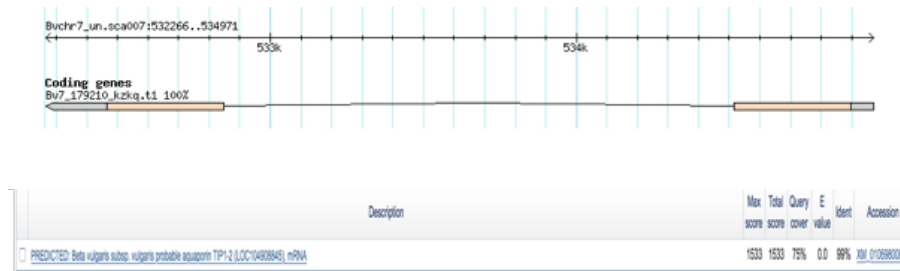


Figura 15.- Estructura genómica de *BvCOLD1*, el gen el ubicado en el cromosoma 7 y tiene un solo intrón

La comparación con una base de datos de plantas indicó que la homología más alta se obtuvo con las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), aunque en la levadura detectamos la localización en el RE, pero no en el tonoplasto.

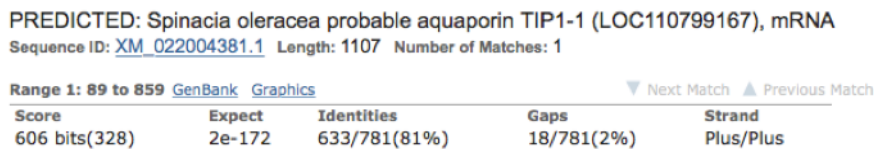


Figura 16.- Resultados del análisis BLASTp entre *BvCOLD1* frente a la base de datos de secuencias de proteínas *Spinacia oleracea*.

Realizamos un análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos predicha de *BvCOLD1* (Figura 17), la cual tiene 254 aminoácidos, el peso molecular calculado es 260,61 kD. Es una proteína ácida (punto isoeléctrico 5,18) y contiene 6 hipotéticos dominios transmembrana. Identificamos los dos motivos de formación de poros de NPA altamente conservados en la posición 85 y 198. Así mismo el filtro de selectividad aromático/arginina descrito para las proteínas TIP en arábidopsis constituido por una histidina en la hélice 2, isoleucina en la hélice 5, alanina (207) en el lazo E1 y valina (208) en el lazo E2, similar a lo descrito para las proteínas TIP (Soto *et al.*, 2008).

```

1  MPISRISVGT PDEARHPDTL RSGLAEFIST LIFVFAGQGS GMAFAKLTEG
51 AANTPAGLVA ASIAHAFALF VAVAVGANIS GGHVNPAVTF GAFVGGNITL
101 LNGIVYWIAQ LLGSVAACAL LKFATGGLET AAFACATDVS AWNALVMEIV
151 MTFGLVYTVY ATAIDPKKGN IGIAPLAIG LIVGANILAG GAFDGLASMP
201 AVSFGPAVMS WNWTHHWIYW VGPLIGAGIA GLIYEFIFIG HQEPASADYQ
251 RLSA

```

- Segmentos transmembrana
- Filtro selectivo Aromático/arginina
- Estructura de formación de poro NPA

Figura 17.- Análisis de la secuencia traducida de *BvCOLD1*, En verde: segmentos transmembrana predichos, rojo: aminoácidos que forman el filtro de selectividad Aromático/arginina, azul: aminoácidos que forman la secuencia NPA.

La aplicación de predicción de localización *WOLF pSORT* predijo que las 14 localizaciones más probables eran: 9 para membrana plasmática, 4 para vacuola y 1 para retículo endoplásmico. Además, investigamos la secuencia de *BvCOLD1* modelando la secuencia con la plataforma RAS MOL (Sayle *et al.*, 1995) utilizando la estructura publicada de SoPIP2 en forma abierta (Törnroth *et al.*, 2006) como plantilla. Obtuvimos un modelo en el que pudimos determinar un tamaño máximo de poro de 9,31 angstroms. También pudimos observar la estructura de compuerta (Figura 18; Maurel *et al.*, 2008).

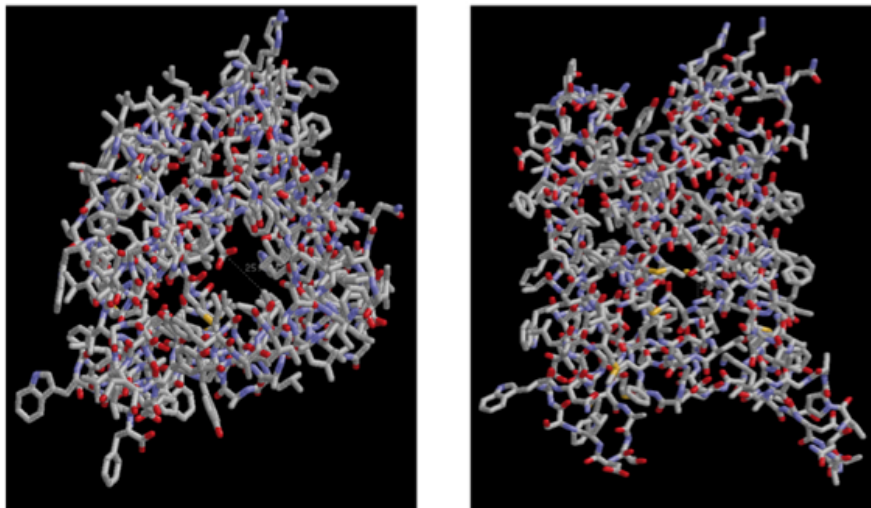


Figura 18.- Predicción 3D de la proteína *BvCOLD1* utilizando el software Rasmol. Izquierda: vista cenital con el poro abierto. Derecha: vista lateral.

#### 4.4.3 Análisis filogenético de BvCOLD1.

BvCOLD1 no tiene ortólogos en arabidopsis. Un análisis BLASTp contra la base de datos TAIR, mostró que la proteína BvCOLD1 se alinea con las aquaporinas, siendo la puntuación más alta para las proteínas intrínsecas de tonoplasto de clase 1 TIP1-3 (gamma-TIP3; At4g01470), que comparte un 74% de identidad y un valor estadístico de  $6e-129$ . El análisis demostró que la estructura del intrón, la formación de poros NPA y el filtro de selectividad Aromático/arginina se conservan para las proteínas TIP1 de arabidopsis. Sin embargo un análisis filogenético con la secuencia de aminoácidos predicha para BvCOLD1 reveló que las secuencias más cercanas se encuentran en plantas halotolerantes como *Suaeda glauca*, *Salicornia herbacea*, *Mesembryanthemum crystallinum* y en la planta de cultivo *Spinacea oleracea*, confirmamos esta similitud con varios árboles filogenéticos utilizando máxima parsimonia o máxima verosimilitud (Figura 19).

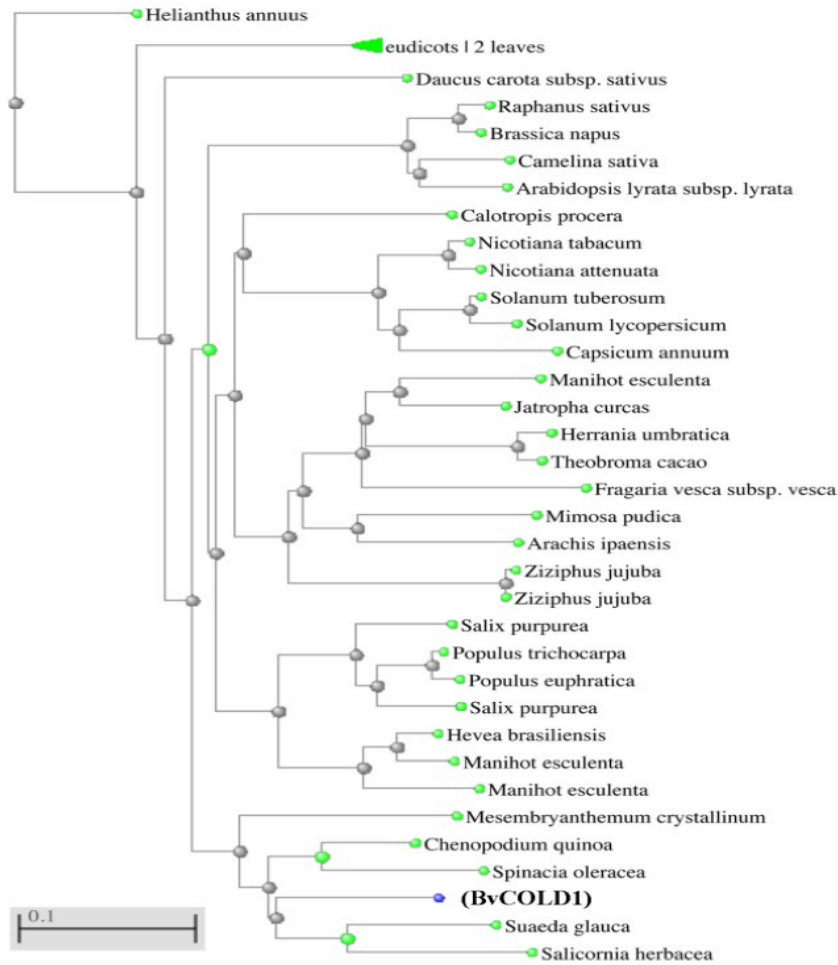


Figura 19.- Árbol filogenético de BVCOLD1. El árbol se construyó utilizando el método de evolución mínima (ME), que utiliza mediciones de distancia que corrigen múltiples ramificaciones en los mismos sitios, y elige una topología que muestra el valor mínimo de la suma de todas las ramas. El árbol se realizó con el programa *NCBI Tree Viewer* (TV). Se utilizaron secuencias con una homología de más del 75%.

Un análisis detallado confirmó que las tres secuencias más cercanas a BvCOLD1 comparten un motivo de once aminoácidos en el extremo carboxil terminal, con la secuencia PASADYQRLSA. Este motivo está conservado en *Mesembryanthemum crystallinum* y se encuentra con un solo cambio en *Suaeda glauca*, y con dos cambios en *Spinacea oleracea* (Figura 20).

```

Mesembryanthemum ·····-HE---PASADYQRLSA
Spinacia ······GQE---APAADYQRLSA
Salicornia ······STD---STSTDYQRLSA
BvCOLD1 ······HQE---PASADYQRLSA
Suaeda ······HQE---PASADYQRLFA
Solanum ······H-THEQIPSGDF-----
Hevea ······ENAHEPLSTSDF-----
Olea ······Q-SHQQLP TSAEY-----
Malus ······NSGHEQLPSTDY-----
Ricinus ······PSTHEQLPSADF-----

```

Figura 20.- Alineación múltiple de los aminoácidos del extremo c-terminal de BvCOLD1 con las secuencias de mayor similitud.

Repetimos el árbol filogenético sin este motivo y la aquaporina de *Mesembryanthemum crystallinum* no se localizó cerca de BvCOLD1, lo que indica que la presencia de este motivo conservado aumentaba la puntuación, la filogenia de BvCOLD1 mostró que esta proteína solo está presente en las *Chenopodiaceae*, una subfamilia de las *Amaranthaceae* que incluye géneros como *Beta*, *Salicornia* y *Suaeda* (Kadereit *et al.*, 2010).

#### 4.4.4 Expresión de *BvCOLD1* y localización en remolacha azucarera

Investigamos el patrón de expresión de *BvCOLD1* (Figura 21). El análisis *Northern* de RNA extraído de muestras de *Beta vulgaris* en condiciones de crecimiento normales indicó que se expresa en todos los órganos investigados en un nivel similar.

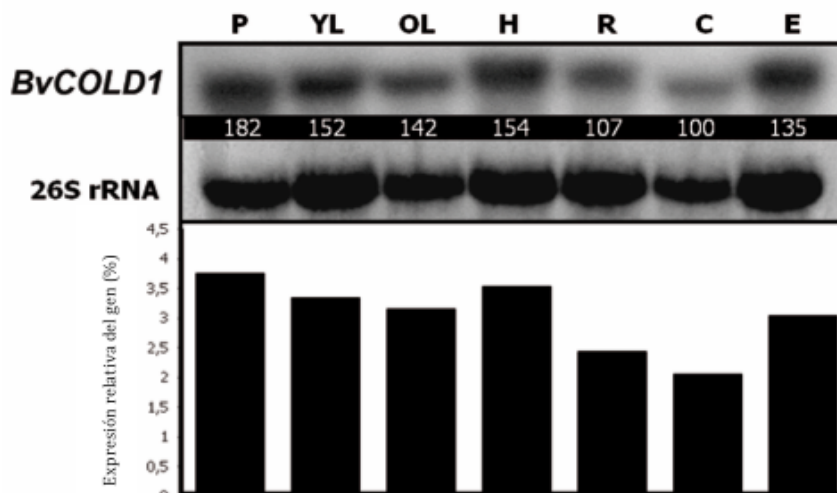


Figura 21.- Análisis de transferencia *Northern* de RNA de remolacha analizando el nivel endógeno de *BvCOLD1* en peciolo (P), hoja joven (YL), hoja vieja (OL), hipocotilo (H), raíz (R), cotiledón (C) y epicotilo (E) de *Beta vulgaris*.

Para determinar la localización subcelular construimos una versión de *BvCOLD1* bajo la expresión del promotor 35S y con una fusión de la proteína GFP en el extremo c-terminal. Se usaron células de *Agrobacterium* transformadas con este plásmido para infectar las hojas de *Nicotiana benthamiana*. 3 días después de la infección, pudimos observar una señal de GFP, localizándose en una estructura reticular con un aumento de la señal rodeando al núcleo, lo cual podría identificarse como retículo endoplásmico, confirmando así la localización observada en la levadura (Figura 22).

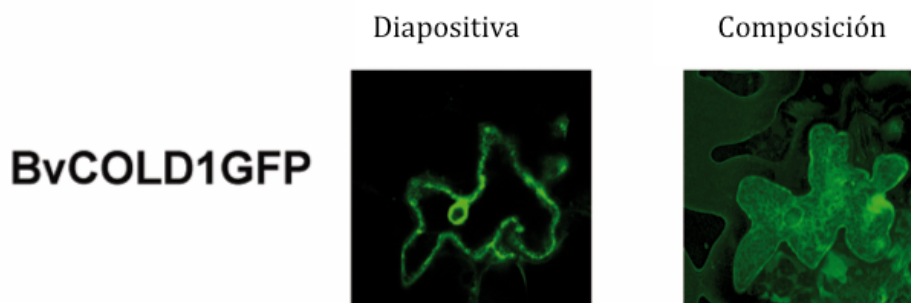


Figura 22.- Imágenes de microscopía confocal de células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana* que expresan transitoriamente *BvCOLD1GFP*. Imagen de un solo plano (Diapositiva) y composición de 30 planos diferentes a lo largo del eje Z (Composición).

Confirmamos este patrón en protoplastos derivados de hojas de *Nicotiana benthamiana* (figura 23).

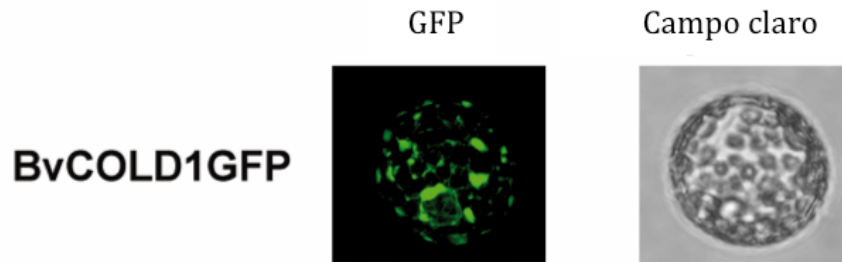


Figura 23.- Microscopía de protoplastos derivados de hojas de *Nicotiana benthamiana* que expresan transitoriamente BvCOLD1GFP con fluorescencia (GFP) y campo claro (campo claro).

#### 4.4.5 Caracterización funcional de *BVCOLD1* en levadura.

Identificamos *BvCOLD1* mediante una estrategia de expresión heteróloga de genes en *S. cerevisiae*. En experimentos anteriores quedó demostrado que la sobreexpresión de nuestro gen confiere tolerancia al frío en levaduras (Figura 12) y que una versión fusionada a GFP se traduce de manera eficiente y se puede observar mediante microscopía confocal en levadura (Figura 13).

Nos planteamos identificar los solutos capaces de ser transportados por *BvCOLD1* mediante expresión funcional en levadura. Para ello el primer paso fue investigar el transporte de glicerol expresándolo en un mutante *gpd1* de levadura (Larsson *et al.*, 1993). El glicerol es utilizado por las células de levadura como un osmoprotector para hacer frente al estrés osmótico. El mutante *gpd1* produce menos glicerol que una levadura de tipo silvestre. Si la aquaporina expresada transporta glicerol, la concentración disminuye en el citoplasma y la célula es más sensible al estrés osmótico u oxidativo. Comparamos la sensibilidad contra este estrés en las células transformadas con el plásmido pYPGE vacío (utilizado como control) y las células transformadas con *BvCOLD1*, como se muestra en la figura 24, confirmamos que las levaduras eran más sensibles en estas condiciones.



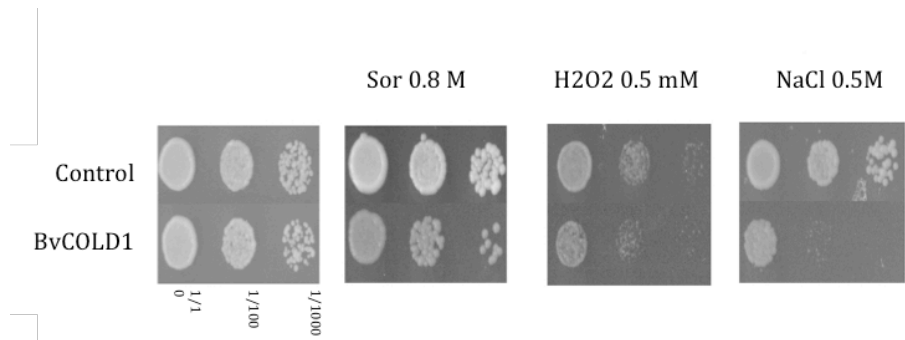


Figura 24.- Sobreexpresión de *BvCOLD1* en el fondo genético *gpd1*. Los cultivos de la cepa mutante *gpd1* transformada con el plásmido vacío (control), o con el plásmido que contiene *BvCOLD1* (*BvCOLD1*), se cultivaron en medio SD selectivo hasta la saturación. Las diluciones seriadas de cada cepa (1/10, 1/100 y 1/1000) se sembraron en un medio YPD que contenía la concentración indicada de sorbitol (Sorb), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o cloruro de sodio (NaCl). El crecimiento se registró después de 4 días.

Habiendo confirmado que la levadura es un buen sistema para caracterizar la capacidad de nuestra aquaporina para transportar solutos, tratamos de determinar si puede transportar B.

Se ha descrito que el B es transportado principalmente por aquaporinas, por lo que quisimos confirmar si *BvCOLD1* podría ser parte de la homeostasis del B. El B no tiene ningún papel conocido en la biología animal, pero es un oligoelemento esencial en la biología vegetal. Este mineral es necesario para el crecimiento del tubo polínico y también para la formación de la pared celular (Silva *et al.*, 2001). La extrusión de B en levadura es impulsada principalmente por el transportador BOR1 (Nozawa *et al.*, 2006), este transportador está conservado en plantas como AtBOR1 (Noguchi *et al.*, 1997). La presencia de este gen de levadura podría enmascarar un efecto hipotético de *BvCOLD1* en el transporte de B, por tal motivo sobreexpresamos nuestro gen en un mutante de levadura *bor1* que es deficiente en la extrusión de B, realizamos un goteo y descubrimos que la sobreexpresión de *BvCOLD1* induce en la sensibilidad de la levadura al B (Figura 25).

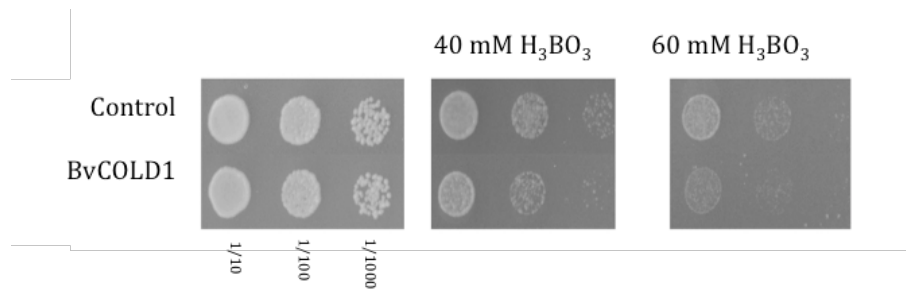


Figura 25.- Goteo de levadura en cepa mutante *bor1* transformada con el plásmido vacío (control), y con el plásmido que contiene *BvCOLD1* (BvCOLD1), se cultivaron en medio SD selectivo hasta la saturación. Las diluciones en serie de cada cepa (1/10, 1/100 y 1/1000) se sembraron en un medio YPD que contenía la concentración indicada de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ). El crecimiento se registró después de 4 días.

Para confirmar adicionalmente que la expresión de *BvCOLD1* en levadura altera la homeostasis del B, se comparó la cinética de absorción del B en una cepa de levadura *bor1* transformada con un plásmido vacío y otra transformada con *BvCOLD1*. Como se ve en la figura 26, las cepas que expresan la aquaporina, muestra una entrada de B más rápida que las cepas con el plásmido de control, aunque a tiempos más largos ambas cepas acumulan cantidades similares de B.

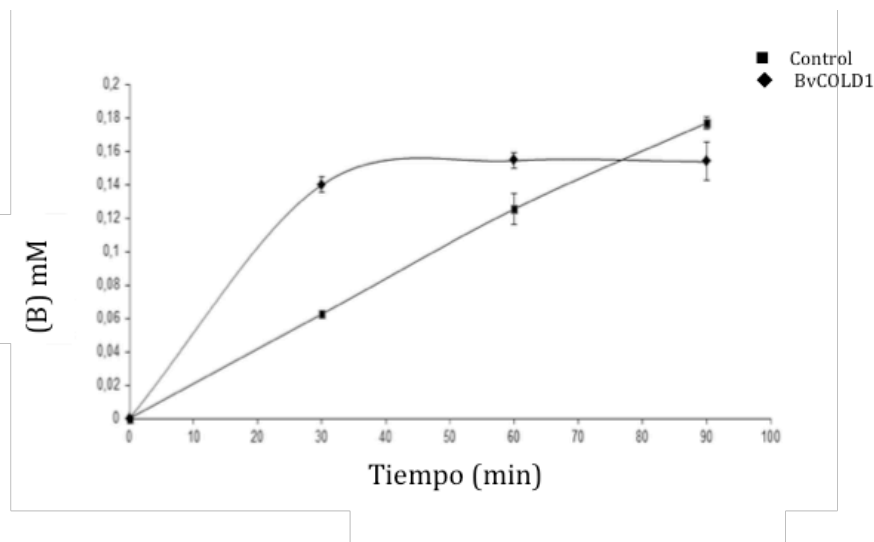


Figura 26.- Cinética de absorción del B en el mutante de levadura *bor1* transformada con *BvCOLD1*. Los cultivos de la cepa *bor1* transformada con un plásmido vacío (cuadrados) y con el plásmido que contiene *BvCOLD1* (diamantes) se cultivaron en YPD. A tiempo 0, se añadió 90 mM de  $H_3BO_3$  al medio a partir de un stock concentrado. Se extrajeron alícuotas cada 30 minutos y se determinó el contenido de B.

#### 4.4.6 La sobreexpresión de *BvCOLD1* mejora la tolerancia al estrés por frío y diferentes estreses abióticos en *Arabidopsis thaliana*.

Una vez demostrado experimentalmente que la proteína BvCOLD1 es estable en levaduras y en plantas como *Nicotiana benthamiana*, construimos plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con la sobreexpresión de esta proteína.

El siguiente paso que nos propusimos investigar es si la sobreexpresión de *BvCOLD1* podría conferir tolerancia al estrés, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, para este fin construimos un plásmido binario con la expresión de nuestro gen dirigida por el promotor 35S y el terminador NOS, el plásmido que utilizábamos, contenía un gen Bar para la selección que confiere resistencia al herbicida Basta, que tiene como principio activo el glufosinato, con el que generamos diferentes líneas transgénicas transformando la variedad Columbia 0. Se seleccionaron las tres que presentaron mayor expresión del transgén y la denominamos Línea 4, Línea 6 y Línea 7 (Figura 27). Como control se empleó una línea transgénica representativa, obtenida por transformación del mismo fondo genético de arabisopsis con un plásmido vacío.

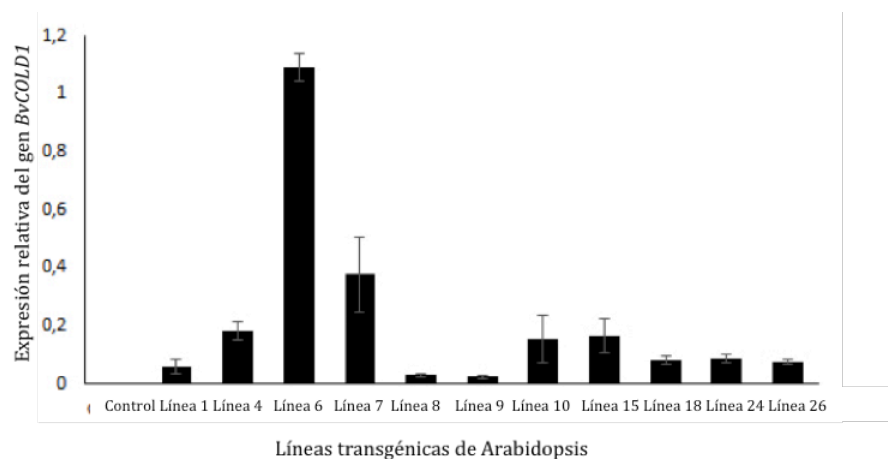


Figura 27.- Acumulación de mRNA de plantas de arabisopsis transformadas con el gen *BvCOLD1*, se normalizaron las muestras con el gen de actina.

BvCOLD1 se identificó por su capacidad para mejorar el crecimiento en condiciones de frío en levaduras (Figura 12). Queríamos determinar si este también era el caso en las plantas durante la germinación y crecimiento temprano (hasta el desarrollo completo de los cotiledones). Con este fin esterilizamos, estratificamos las semillas y

determinamos las que germinan y llegan al estadio de cotiledón después de 10 días. Las tres líneas muestran germinación mejorada en comparación con la línea transformada con el plásmido vacío (Figura 28).

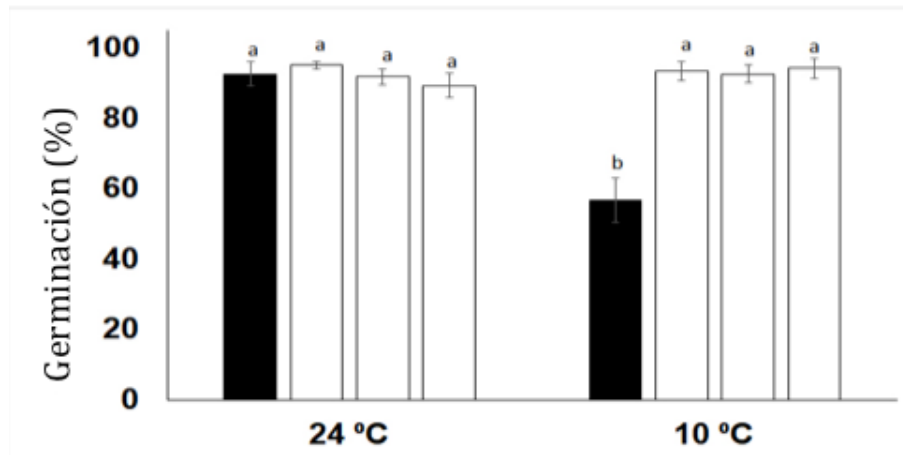


Figura 28.- Porcentaje de germinación y desarrollo temprano de plantas de arabis transformada con *BvCOLD1*. La sobreexpresión de *BvCOLD1* aumentó la tasa de germinación a 10 °C. Tasas de germinación expresadas como los porcentajes medios de plántulas con cotiledones verdes expandidos para línea de control (barras rellenas) y líneas transgénicas 4, 6 y 7 (de izquierda a derecha) que sobreexpresan *BvCOLD1* (barras vacías) después de 5 días (24 °C) o después 15 días (10 °C). Las barras de error representan el error estándar. Letras distintas indican que son estadísticamente diferentes según prueba de Tukey (n = 300 semillas en 6 experimentos independientes).

Las plantas se dejaron durante más tiempo a 10 °C (28 días), la mayoría de las plantas de las líneas transgénicas sobrevivieron, y continuaron el desarrollo, mientras que las plantas transformadas con el plásmido vacío estaban muriendo (Figura 29).

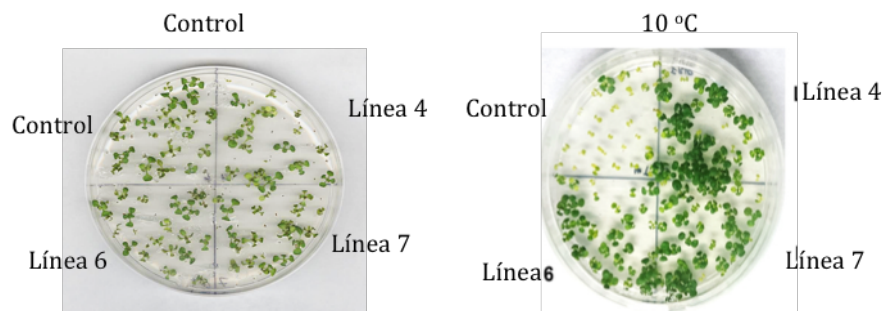


Figura 29.- Placa de germinación en frío. Las líneas que sobreexpresan *BvCOLD1* pueden desarrollarse en condiciones de frío. Después de registrar la germinación, las placas se dejaron crecer a 24 °C (izquierda) durante 10 días o a 10 °C (derecha) durante 28 días. Se muestra una placa representativa de cada tratamiento.

Hay varias descripciones en la literatura de que la sobreexpresión de las aquaporinas podría conferir resistencia pleiotrópica a estrés abiótico (Sreedharan et

*al.*, 2015; Su *et al.*, 2017). Probamos si las líneas transgénicas generadas exhibían tolerancia a otro tipo de estrés, encontrando que la sobreexpresión de *BvCOLD1* incrementaba la germinación y desarrollo temprano en presencia de cloruro de sodio, cloruro de litio y ácido sórbico (Figura 30).

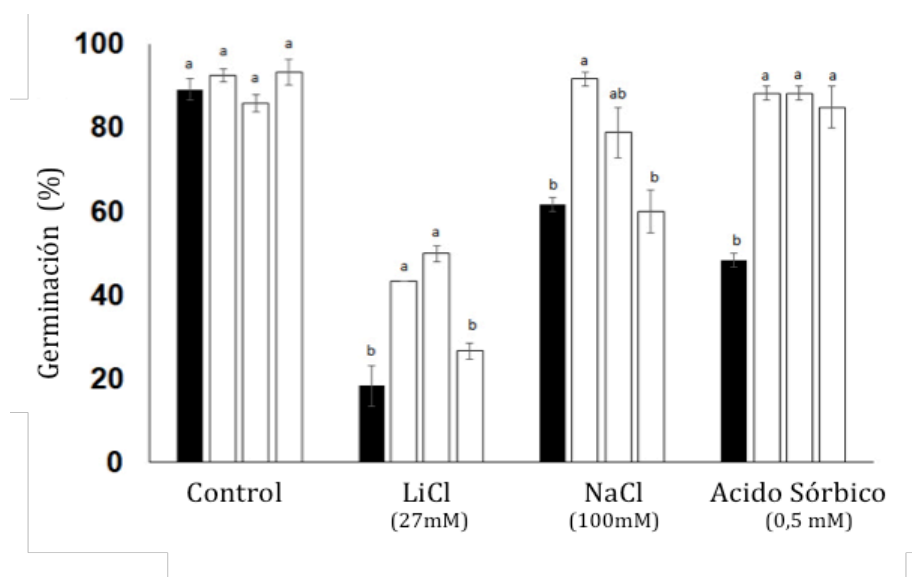


Figura 30.- Porcentaje de germinación y desarrollo temprano de arabis transformada con *BvCOLD1*. Tasas de germinación expresadas como porcentajes medios de plántulas con cotiledones verdes expandidos para línea control (barras rellenas) y líneas transgénicas 4, 6 y 7 (de izquierda a derecha) que sobreexpresan *BvCOLD1* (barras vacías) después de 5 días en medio sólido MS (control) o en medio MS sólido que contiene LiCl 27 mM (LiCl), NaCl 100 mM (NaCl) o ácido sórbico 0,5 mM (ácido sórbico).

Hemos demostrado previamente que en *Beta vulgaris* el gen *BvCOLD1* se expresa en todos los órganos investigados (figura 11), este hallazgo sugiere que su función no solo puede ser necesaria en la germinación, sino en etapas posteriores de desarrollo. Para investigar si la sobreexpresión ectópica de *BvCOLD1* podría generar tolerancia al estrés durante el desarrollo vegetativo, las plantas se germinaron en condiciones normales y se aplicó tratamiento de estrés en la etapa de roseta, antes de la aparición de flores. Pasados 30 días (60 días para el tratamiento de frío) se cortó la parte aérea y se determinó el peso fresco y el peso seco del material vegetal obtenido.

Pudimos observar que la expresión de *BvCOLD1* aumenta la biomasa en condiciones de sequía y estrés salino y que disminuye ligeramente la acumulación de biomasa bajo estrés por frío (figura 31 y 32).

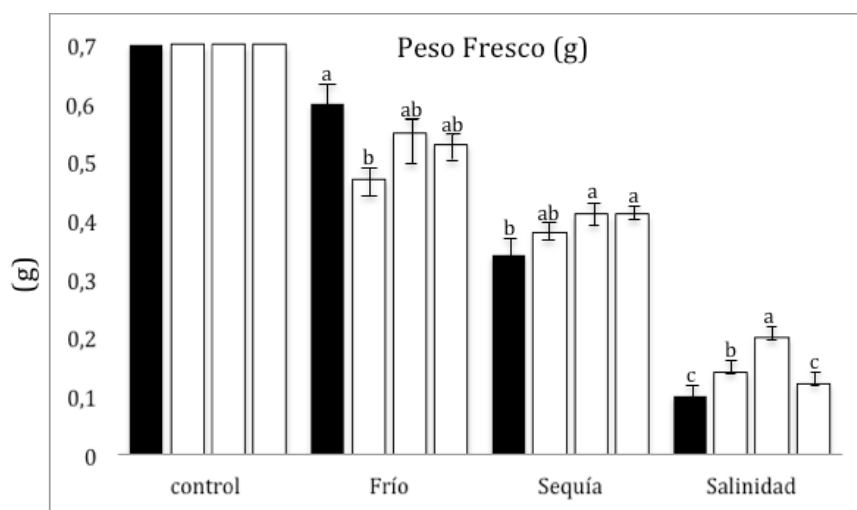


Figura 31.- Peso fresco de plantas de arabis transformadas con *BvCOLD1*. Se determinó el peso fresco de la parte aérea de la línea de control, control (barras rellenas) y líneas transgénicas 4, 6 y 7 (de izquierda a derecha) que sobreexpresan *BvCOLD1* para plantas cultivadas a 24 °C con riego normal control en plantas con riego normal y crecimiento a 10 °C (estrés por frío), con plantas cultivadas a 24 °C sometidas a estrés por sequía y en plantas cultivadas a 24 °C regadas con una solución de NaCl (estrés salino), se utilizó la prueba de significancia de Tukey (letras iguales que los valores son estadísticamente semejantes y letras distintas indican que los valores son estadísticamente distintos).

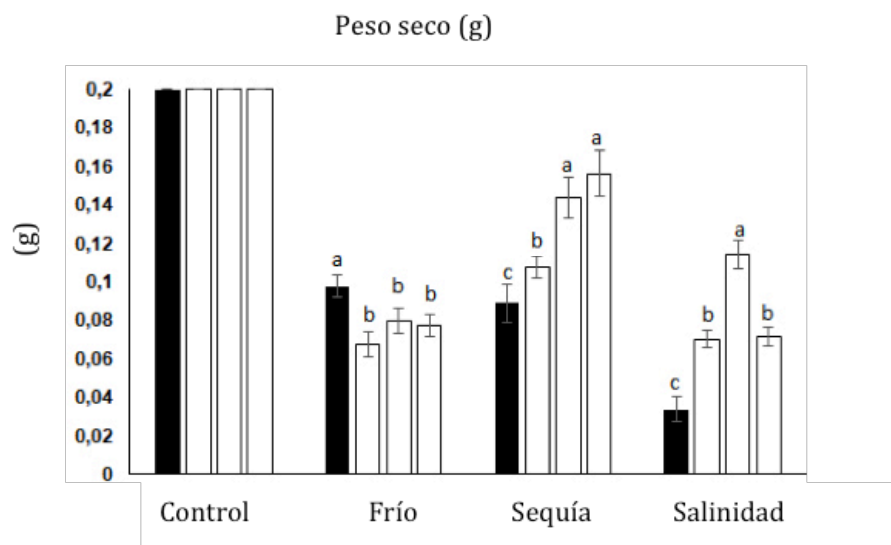


Figura 32.- Peso seco de planta de arabis transformadas con *BvCOLD1*. Se determinó el peso seco exponiendo las muestras a una temperatura de 60 °C durante 3 días. Barras llenas: control; barras vacías: líneas transgénicas 4, 6 y 7 (de izquierda a derecha) que sobreexpresan *BvCOLD1*. Plantas cultivadas a 24 °C riego normal (control) plantas con crecimiento a 10 °C (estrés por frío) plantas cultivadas a 24 °C sometidas a estrés por sequía (estrés por sequía) plantas cultivadas a 24 °C regadas con una solución de NaCl (estrés salino).

#### 4.4.7 Las plantas que sobreexpresan *BvCOLD1* son tolerantes a un medio con B limitante.

Hemos demostrado previamente que *BvCOLD1* puede transportar B cuando se expresa en levadura, por lo que quisimos confirmar si la expresión en un sistema vegetal como *Arabidopsis* podría alterar la homeostasis del B. La concentración normal de B en medio estándar como Murashige y Skoog (MS) es aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . Se germinaron plantas en medio que contenía diferentes concentraciones de B (0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ ) con el fin de determinar si la expresión de *BvCOLD1* aumentaba la capacidad de las líneas transgénicas para crecer bajo concentraciones limitantes de B. Las plantas transgénicas germinaron y demostraron un crecimiento temprano mejor que las plantas control incluso cuando no se añadió ácido bórico en absoluto, lo que indica que podría germinar con las trazas presentes en el medio.

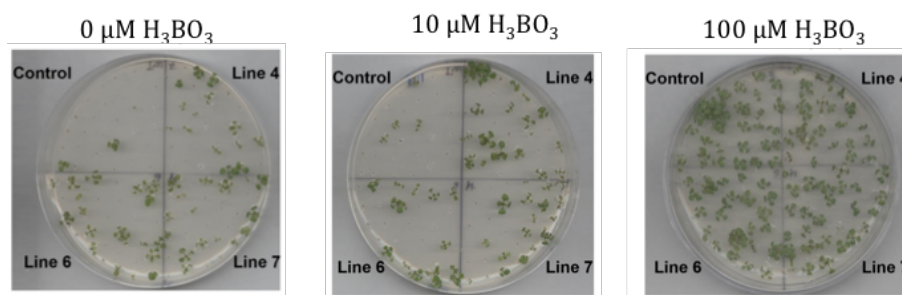


Figura 33.- Análisis de germinación de líneas transgénicas que sobreexpresan *BvCOLD1* en condiciones de B limitante. Las plantas se germinaron en medio MS sólido libre de B donde se añadió la cantidad indicada de B. Se muestra una placa representativa de cada tratamiento.

Experimentos previos han determinado que la tolerancia a frío determinada por la sobreexpresión de *BvCOLD1* es evidente en las etapas tempranas del desarrollo, pero en cambio en etapas posteriores induce una ligera sensibilidad. Quisimos comprobar cuál es la respuesta de las plantas transgénicas a un medio con B limitante en etapas posteriores del desarrollo. Uno de los síntomas de la falta de B es la aparición de problemas en el desarrollo de la raíz. Germinamos las plantas de control y transgénicas en un medio sólido de MS sin ningún aditivo, luego trasplantamos en placas con distintas concentraciones de B (figura 33) y las colocamos en posición vertical, después de 17 días se registró la longitud de la raíz. El desarrollo de las raíces de plantas transgénicas (figura 34), fue mejor que las

plantas de control en condiciones de bajo B ( $10 \mu\text{M}$ ). También podríamos un desarrollo diferencial en el tratamiento sin B, probablemente debido a trazas presentes en el medio en el cual se germinaron las plantas.

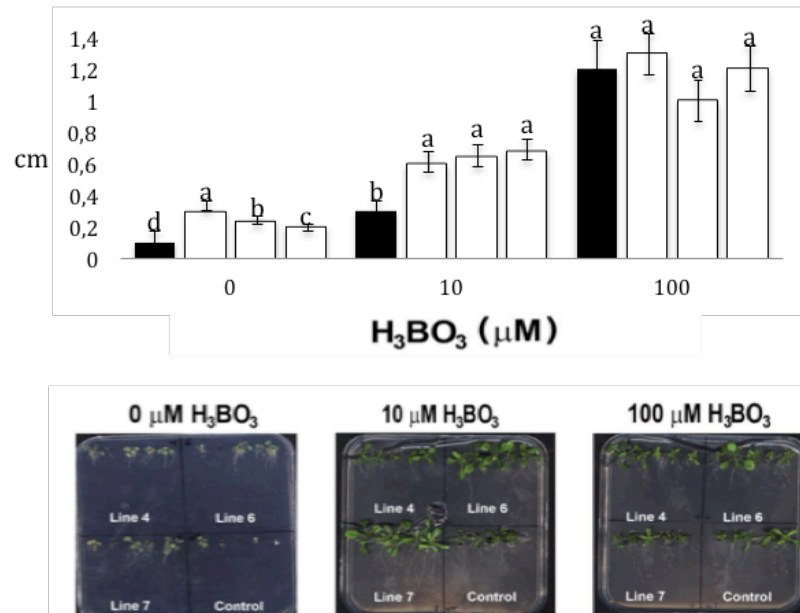


Figura 34.- Análisis de la elongación de la raíz bajo condiciones limitantes de B. Las plantas de la línea control (barras rellenas) y líneas transgénicas (barras vacías 4, 6 y 7; de izquierda a derecha) que sobreexpresan BvCOLD1 se germinaron en medio MS y luego se trasladaron a placas con la concentración indicada de B y fueron colocadas en posición vertical. La longitud de la raíz se registró después de 17 días. Las barras de error representan medias  $\pm$  error estándar. Los datos con letras diferentes indican que los valores difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), según lo determinado por la prueba de rango múltiple de Duncan ( $n = 30$  en seis experimentos independientes) (panel superior). Se muestra una placa representativa con cada concentración de B (panel inferior).

#### 4.4.8 El dominio c-terminal de BvCOLD1 es esencial para su función.

El análisis bioinformático de la secuencia de BvCOLD1 demostró que los once aminoácidos en el extremo carboxilo terminal se conservan en plantas de la familia de las *quenopodiaceae* como *Spinacea oleracea* y en la planta no filogenéticamente relacionada *Mesembriaterium crystallinum*. Para determinar si estos aminoácidos son necesarios para la funcionalidad BvCOLD1, construimos plantas transgénicas que sobreexpresan una versión truncada de BvCOLD1 en la que el codón que codifica la prolina en la posición 244 se sustituía por un codón de parada. Con tres líneas transgénicas diferentes que sobreexpresan esta versión truncada no pudimos reproducir ninguno de los fenotipos obtenidos anteriormente con las líneas de sobreexpresión de BvCO



*LD1* por lo que concluimos que este dominio es esencial para la funcionalidad de *BvCOLD1* (figura 35).

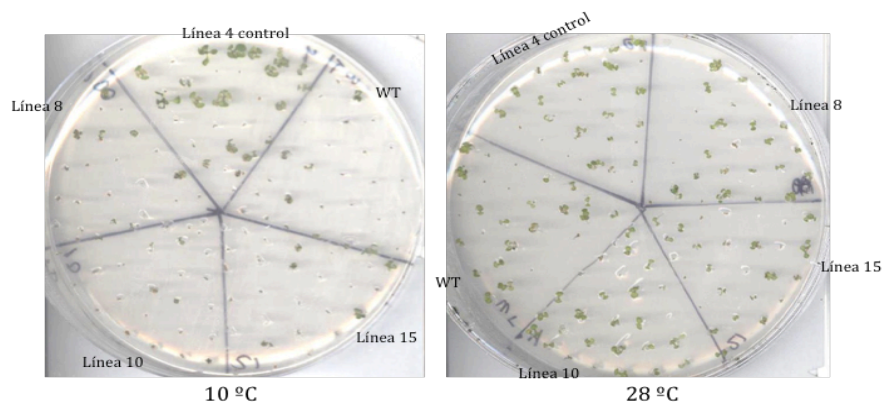


Figura 35.- Análisis de germinación de líneas transgénicas que sobreexpresan *BvCOLD1* truncado. Las plantas se germinaron en medio MS a 24 °C

## 4.5 Discusión de capítulo 1

En la literatura científica se han descrito diferentes genes capaces de conferir tolerancia a frío por sobreexpresión (Ji *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017), entre ellos también hay varias aquaporinas (Li *et al.*, 2009; Ahamed *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). *BvCOLD1* se expresa en todos los tejidos investigados de remolacha, lo que apunta a un papel fundamental en la fisiología de *Beta vulgaris*. Aunque su secuencia es más similar a las proteínas TIP, hemos confirmado esta localización en el RE tanto en levadura como en plantas.

Otra característica sorprendente de *BvCOLD1* es que no tiene ortólogo en la planta modelo arabis, mientras que el análisis de secuencia muestra una gran homología con aquaporinas de la familia de las *Chenopodioideae*, plantas adaptadas a ambientes hipersalinos como *Suaeda glauca*, *Salicornia herbacea* y también en una planta que no pertenece a esta familia *Mesembryanthemum crystallinum* L. Todas presentan una secuencia de aminoácidos conservada en el extremo c-terminal, por lo que nuestro gen podría ser una proteína clave para esta adaptación. Hemos confirmado que la secuencia carboxilo terminal conservada es esencial para la función *BvCOLD1*, ya que las plantas de arabis que sobreexpresan una versión truncada de esta proteína, perdieron todos los fenotipos observados en plantas transgénicas que sobreexpresan la versión completa.

Se sabe que las aquaporinas pueden transportar metaloides como el ácido bórico, el ácido silícico y el arsenito (Mukhopadhyay *et al.*, 2014). Hemos demostrado que *BvCOLD1* puede alterar la homeostasis del B en la levadura y en las plantas, esto respalda la idea de una función fundamental de este gen en la fisiología de *Beta vulgaris*. El B es uno de los principales factores limitantes en el cultivo de remolacha, y su deficiencia es responsable de la enfermedad de la podredumbre del corazón.

Otro punto importante es que *BVCOLD1* confiere tolerancia al estrés por frío durante la germinación y también aumenta el vigor temprano, ya que las plantas transgénicas pueden desarrollarse a 10 °C mejor que las plantas de control, pero si se aplica frío en etapas posteriores, las plantas transgénicas acumulan menos

biomasa que control, lo cual indican que la respuesta al estrés por frío puede no ser la función principal de BvCOLD1.

Finalmente, es importante destacar que hemos caracterizado un nuevo determinante para la tolerancia al estrés abiótico y la homeostasis del boro. Esto permite estrategias novedosas para el desarrollo biotecnológico. BvCOLD1 es un buen candidato para desarrollar cultivos resistentes al estrés abiótico mediante ingeniería genética, ya que la remolacha es un cultivo estratégico para el azúcar, el bioetanol y la alimentación humana y animal. Además de la generación de cultivos transgénicos, el uso de técnicas de mejora genética clásicas o de nuevas técnicas de mejora genética como el CRISPR/Cas9 para identificar o generar plantas de *Beta vulgaris* con mayor expresión de *BvCOLD1* puede ser una estrategia, para desarrollar nuevas variedades de remolacha azucarera con una mejor tolerancia al estrés abiótico o con menos requerimiento de boro, lo que puede ayudar a aumentar el rendimiento de la producción de azúcar o biomasa. Todos estos resultados han sido publicados en (Porcel *et al.*, 2018).

## 5 CAPITULO 2 IDENTIFICACIÓN DE MICRO RNAS RELACIONADOS CON LA RESPUESTA AL ESTRÉS INDUCIDO POR FRÍO EN MELÓN (*Cucumis melo*).

### 5.1 Introducción

El desarrollo, en los últimos años, de las tecnologías ómicas ha permitido la identificación y caracterización funcional de cientos de genes involucrados en los procesos de tolerancia o resistencia al estrés (Baxter *et al.*, 2014; Golldack *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). La alteración transcripcional de tales genes, frente a situaciones de estrés, ha revelado la existencia de complejas redes reguladoras que modulan las respuestas de las plantas a los diversos estímulos ambientales. Entender cómo funcionan estos mecanismos de regulación es por tanto fundamental, si se quieren comprender los mecanismos moleculares que permiten a las plantas responder y eventualmente adaptarse a los cambios ambientales (Carrera *et al.*, 2009).

Uno de los aspectos más intrigantes por resolver, es la caracterización de los procesos encargados de la regulación “fina” de la expresión génica frente a una situación ambiental desfavorable, así como de las redes reguladoras que coordinan la recuperación en una planta sometida a estrés (Zhang, 2015; Shriram, *et al.*, 2016).

Un gran número de trabajos, (realizados en diversas especies vegetales tales como *arabidopsis*, arroz, maíz, sorgo, girasol, etc.) han coincidido en describir, en los últimos años, la existencia de una estrecha relación entre la acumulación diferencial de miRNAs y los mecanismos de respuesta a estrés, generando una idea global de que los miRNAs pueden desempeñar un papel fundamental en la regulación de los mecanismos que regulan la recuperación del estado de homeostasis, en las plantas expuestas a situaciones ambientales adversas (Sunkar *et al.*, 2007; Kumar, 2014; Zhang, 2015; Reis *et al.*, 2015).

Funcionalmente, los miRNAs regulan la expresión génica a nivel postranscripcional induciendo la degradación o la represión de la traducción de sus dianas (Bartel, 2004; Borges y Martienssen, 2015). En las plantas, solo unas pocas familias de genes que codifican miRNAs están altamente conservadas. El caso más general es que un determinado miRNA sea específico de una especie o familia, lo que sugiere que la mayoría de los genes que codifican miRNAs surgieron en etapas relativamente recientes de la evolución (Axtell y Bartel, 2005; Cuperus *et al.*, 2011; Borges y Martienssen, 2015; Cui *et al.*, 2016). Actualmente, la idea general es que los miRNA, tanto los comunes como los específicos podrían contribuir a la regulación coordinada de la respuesta al estrés (Sunkar *et al.*, 2012; Zhang, 2015; Cui *et al.*, 2016; Shriram *et al.*, 2016).

Los miRNAs involucrados en la respuesta a estrés se han descrito en plantas expuestas tanto a estrés biótico (inducido por bacterias, hongos o virus) (Zhang, *et al.*, 2016; Chaloner, *et al.*, 2016; Niu, *et al.*, 2015), como a estrés abiótico, (sequía, salinidad, ayuno de nutrientes, frío, alta temperatura, etc.) (Zhu, 2016; Shriram *et al.*, 2016). Estos estudios han demostrado que los miRNAs responden a las alteraciones ambientales de una manera dependiente del estrés, tejido y genotipo (Zhang, 2015).

En este capítulo se describe el uso de dos estrategias complementarias,

i) secuenciación masiva de sRNAs y ii) cuantificación de niveles de transcritos por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) con el objetivo de presentar el primer análisis exhaustivo de los perfiles de expresión de miRNA/dianas en respuesta a condiciones de estrés inducido por bajas temperaturas en plantas de melón. La obtención de este tipo de información en una especie de interés agronómico (melón) aumenta las posibilidades de que el conocimiento generado pueda trasladarse de una manera más directa a futuros estudios dirigidos a mejorar la tolerancia de este tipo de cultivos a estrés (Zhang, 2015).

Elegimos el melón (*Cucumis melo*) para nuestra investigación porque es un especie económicamente importante que se cultiva extensamente en todo mundo, y en especial en España, generalmente mediante métodos convencionales (Wei *et al.*, 2013). Por otra parte el desarrollo en los últimos años de diversas herramientas moleculares como por ejemplo colecciones de EST (Clepet *et al.*, 2011), plataformas

de TILLING (Gonzales *et al.*, 2011) y la secuenciación de su genoma (García, 2012), favorece el empleo de esta especie como una herramienta valiosa para la investigación experimental en cultivos de importancia agrícola.

## **5.2 Objetivos**

- Secuenciación masiva de sRNA obtenidos de plantas de melón sometidas a bajas temperaturas.
- Identificación de miRNAs de melón con expresión diferencial frente a estrés.
- Validación de la relación funcional entre miRNA y su diana mediante identificación de residuos de RNA procesados (degradoma) y por cuantificación de los niveles de acumulación de transcritos por qRT-PCR.

### **5.3 Materiales y métodos.**

#### **5.3.1 Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos de estrés.**

Las semillas de melón de cultivar Piel de Sapo se germinaron en placas de Petri a 37 °C / 48 h de oscuridad, seguido de 24 h / 25 °C (16/8 horas de luz / oscuridad). Las plántulas de melón se sembraron en macetas y se mantuvieron durante 10 días bajo condiciones controladas (28 °C / 16 h de luz y 20 °C / 8 h de oscuridad) en cámara de crecimiento. A partir del día 11 se mantuvieron durante 11 días a 20 °C / 16 h de luz y 14 °C / 8 h de oscuridad. Como control se emplearon plantas mantenidas bajo las condiciones descritas inicialmente.

Se realizaron tres repeticiones para plantas expuestas a frío y 4 para las plantas control. Cada muestra analizada corresponde a un conjunto de tres plantas tratadas. Durante el experimento las plantas se regaron alternativamente (agua y solución de Hoagland) por inundación (1500 ml / 48 h). Transcurrido el tratamiento (11 días) se recogió la primera hoja debajo del extremo apical de cada planta. Cada muestra se conservó en nitrógeno líquido para su total congelación y luego se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento.

#### **5.3.2 Extracción de RNA y purificación de sRNA.**

El RNA total se extrajo usando el reactivo Trizol (SIGMA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la fracción de RNA de bajo peso molecular (<200 nt) se enriqueció a partir del RNA total utilizando miRNA (kit de aislamiento de miRNA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **5.3.3 Secuenciación de sRNA**

El proceso de generación de bibliotecas y secuenciación fue llevado a cabo por SISTEMAS GENOMICOS ([www.sistemasgenomicos.com](http://www.sistemasgenomicos.com)). Las bibliotecas de cDNA se obtuvieron siguiendo las recomendaciones de ILLUMINA, los adaptadores 3' y 5'



se ligaron secuencialmente al RNA antes de la transcripción inversa y la generación de cDNA, estos se enriquecieron mediante PCR para crear la biblioteca. La selección de tamaño se realizó usando gel de poliacrilamida al 6%. La cantidad de DNA en cada bibliotecas se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en un *LightCycler 480* (ROCHE).

Antes de la generación del *clúster* en *cbot* (ILLUMINA), se realizó una agrupación equimolar de las bibliotecas, el conjunto de las bibliotecas de cDNA se secuenció mediante secuenciación de extremos emparejados (100 x 1) en HiSeq 2000 (ILLUMINA). Los adaptadores y las lecturas de baja calidad se recortaron utilizando la herramienta *Cutadapt* (v. 1.10) en *Python* (Martin, 2011).

#### **5.3.4 Análisis bioinformático de la expresión de los miRNAs.**

Tres diferentes métodos estadísticos (*NOISeq* -Tarazona *et al.*, 2015-, *DESeq2* -Love *et al.*, 2014-, y *edgeR* -Robinson y Oshlack, 2010) se emplearon para evaluar la acumulación diferencial de los sRNA en plantas de melón sometidas a condiciones de estrés por frío. Los sRNAs identificados como expresados diferencialmente ( $\log_2 \text{fold change}$  ( $\log_2\text{FC}$ )  $\geq 1.0$  o  $\leq -1.0$  y un valor de  $P \leq 0.05$ ) por los tres métodos estadísticos se alinearon con la base de datos de miRNA, miRBase v21.0, utilizando *BLAST* v2.2.17 (Griffiths-Jones, 2010). Sólo los sRNAs idénticos a los miembros previamente descritos (<http://www.mirbase.org>) se analizaron en este trabajo.

#### **5.3.5 Ensayos qRT-PCR.**

La cuantificación de los miRNA seleccionados se realizó a partir de fracciones de RNA de bajo peso molecular (<200 nt) obtenidas como se describió anteriormente. La amplificación por *stem-loop qRT-PCR* se realizó según se describió previamente (Czimmerer *et al.*, 2013) utilizando un kit de síntesis de cDNA *RevertAid First Strand* (Thermo Scientific). Los ensayos de qRT-PCR para analizar la expresión de las dianas, se realizaron usando *PyroTaq EvaGreen mix Plus* (ROX) (Cultek Molecular Biotek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente a ello, los RNA

totales (1,5 µg) extraídos de plantas control y tratadas se sometieron a tratamiento con DNAasa (EN0525, Thermo Scientific) seguido de transcripción inversa utilizando el kit de síntesis de cDNA *RevertAid First Strand* (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Los cDNA se amplificaron por PCR usando cebadores específicos. Todos los análisis se realizaron por triplicado en un instrumento *qPCR Fast-Real Time* ABI 7500 (Applied Biosystems) utilizando un protocolo estándar. La eficacia de la amplificación por PCR se derivó de una curva estándar generada por cuatro puntos de diluciones seriales de cDNA. La expresión de cada RNA se cuantificó mediante el método comparativo  $\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## 5.4 Resultados.

### 5.4.1 Análisis de la población de RNAs.

En este capítulo se presentan los datos de secuenciación masiva de sRNAs obtenidos a partir de plantas de melón expuestas a bajas temperaturas durante 11 días y plantas crecidas a temperaturas óptimas de cultivo utilizadas como control. Las lecturas de sRNAs con tamaños mayores de 25 nt o menores de 20 nt no se incluyeron en nuestros análisis. Un segundo filtrado consistió en eliminar aquellos sRNAs (2,1% en control y 3,4% en frío) homólogos a secuencias de rRNAs, tRNAs, snoRNAs y snRNAs depositadas en el *Rfam-database*. Finalizados los procesos de filtrado se recuperaron 18,166,919 y 12,010,164 sRNAs provenientes de las bibliotecas de plantas control y expuestas a frío, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2.- Número de lecturas por tamaño y muestra

		FRÍO					
Nº de nt	C-1	C-2	C-3	TOTAL			
20	200685	310666	303231	814582			
21	445601	570451	518815	1534867			
22	384217	545813	520846	1450876			
23	362495	513658	461962	1338115			
24	1597660	2109488	1751355	5458503			
25	382761	465410	565050	1413221			
<b>TOTAL</b>	<b>3373419</b>	<b>4515486</b>	<b>4121259</b>				
		CONTROL					
Nº de nt	C-1	C-2	C-3	C-4	TOTAL		
20	311468	220750	206939	229368	1145164		
21	698902	487207	481315	623877	2754218		
22	612983	493945	543520	636589	2775263		
23	579372	580096	797716	610599	3264989		
24	1314586	1350816	1458551	1867231	7156705		
25	218588	215117	210958	241208	1070580		
<b>TOTAL</b>	<b>3735899</b>	<b>3347931</b>	<b>3698999</b>	<b>4208872</b>			

Las correlaciones entre los perfiles de expresión de sRNA (teniendo en cuenta cada tratamiento y sus réplicas biológicas) se estimaron mediante el análisis de componentes principales (PCA).

Los resultados obtenidos por PCA (Figura 36) mostraron que las réplicas biológicas de cada condición se agrupan juntas y se diferencian significativamente (valor de  $p = 6,15^{-5}$ ) de la otra. La proporción de la varianza para PC1 que explica la diferencia entre el control y el estrés fue 92,3%. El hecho que los datos de PCA sean altamente significativos confirma la reproducibilidad de nuestros ensayos.

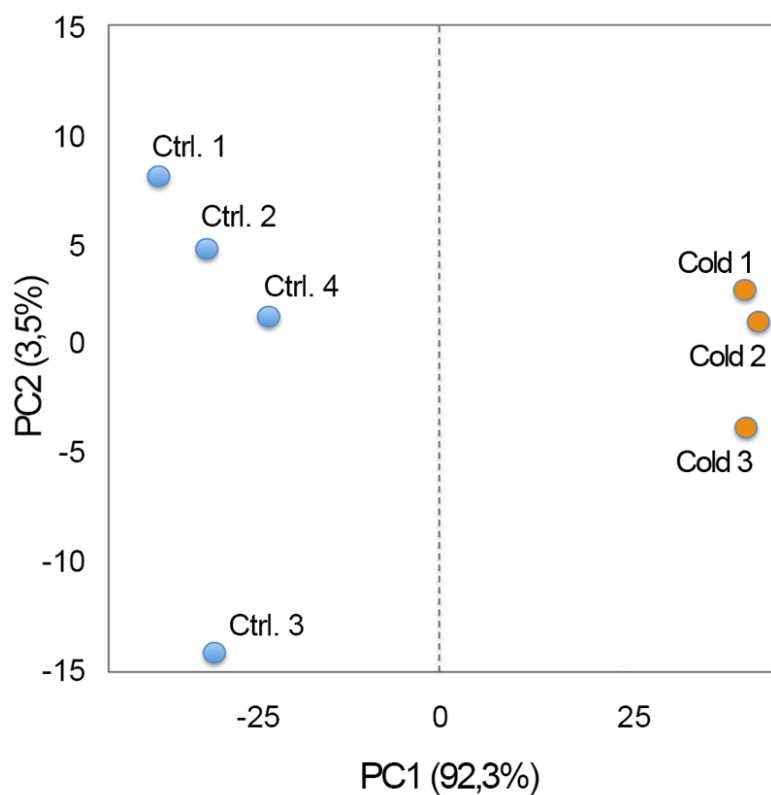


Figura 36.- Análisis de componentes principales de las bibliotecas las correlaciones entre los perfiles de expresión, se estimaron mediante el análisis de componentes principales (PCA). la misma condición se agrupan y se distinguen claramente para el control que acredita la reproducibilidad de nuestros ensayos.

Cuando las lecturas de sRNAs se agruparon de acuerdo a su tamaño observamos que las secuencias mayoritarias correspondieron a las de 24 nucleótidos, que representan el 46% de las lecturas secuenciadas en frío y el 41% en control (Figura 37). Seguidas por las lecturas de 21, 22 y 23 nucleótidos con una representación cercana al 15%. Las lecturas de 20 y 25 fueron las menos representadas tanto en muestras control como de frío.

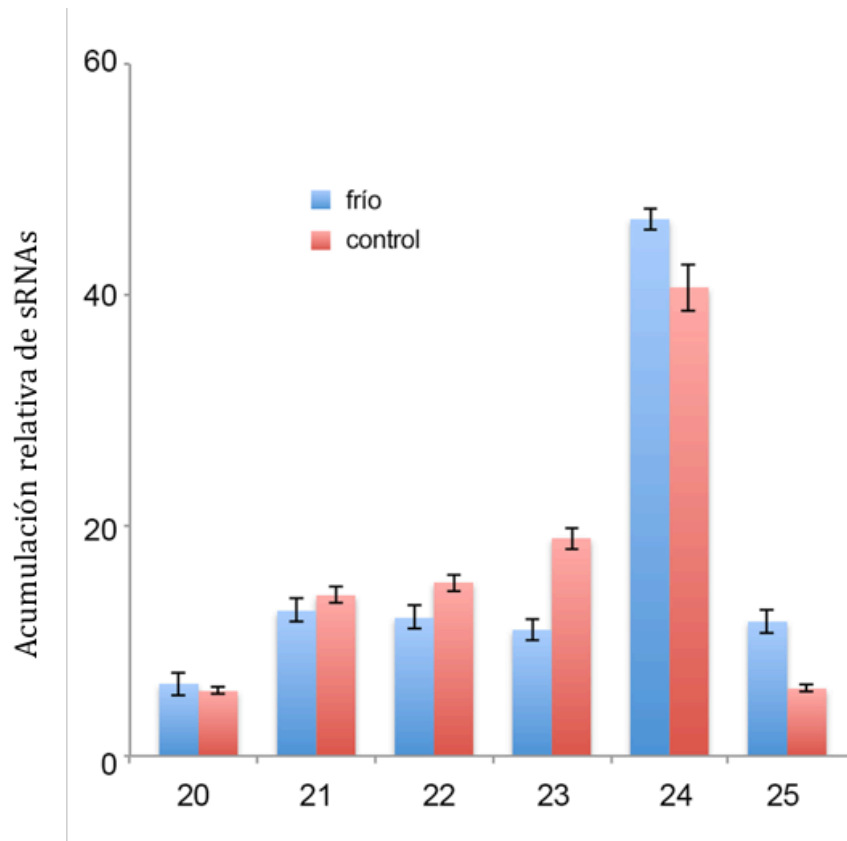


Figura 37.- Distribución de longitudes de lectura. Diagrama que muestra la acumulación en porcentaje y distribución de las lecturas totales de sRNAs de melón que oscilan entre 20 y 25 nt obtenidas de las bibliotecas secuenciadas, los valores representan la suma de todas las repeticiones.

Siguiendo las condiciones previamente descritas  $\text{LogFC} > 1$  o  $< -1$  y  $P$  valor  $> 0,05$  se identificaron 19.656 sRNAs únicos con expresión diferencial frente a condiciones de estrés por frío en melón (Figure 38). Estos resultados evidenciaron que, en coincidencia con lo observado en otras plantas analizadas, la biosíntesis de los sRNA de melón se encuentra afectada bajo condiciones de estrés por frío.

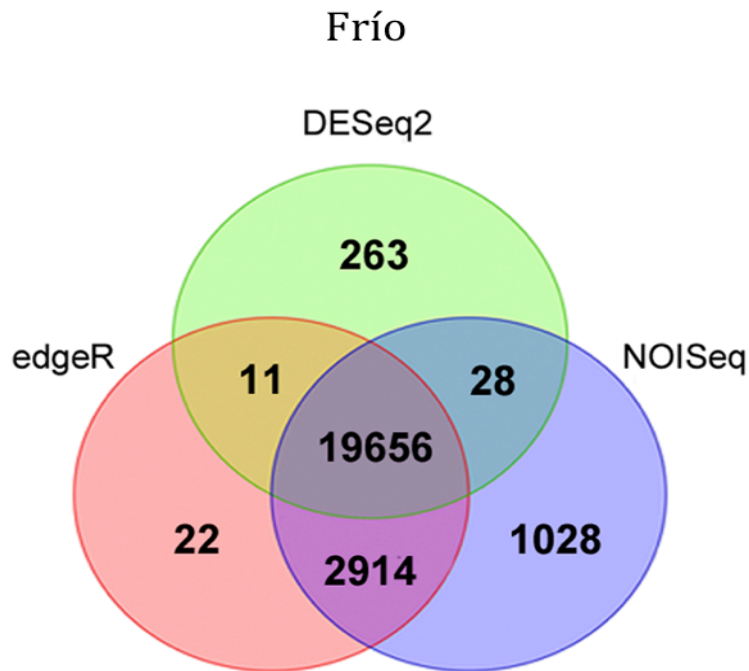


Figura 38.- Diagrama de Venn que compara el número de los sRNAs diferenciales estimados por DESeq2 (verde), edgeR (rojo) y NOISeq (azul) - expresados en melón en respuesta al frío. Solo los sRNAs predichos como diferenciales por los tres métodos de análisis se consideraron como verdaderos miRNAs sensibles al estrés

#### 5.4.2 Los miRNAs están generalmente regulados negativamente en respuesta a estrés por frío.

Para identificar los miRNAs alterados significativamente en respuesta a baja temperatura, los sRNA que exhibían acumulación diferencial (comparando estrés frente a condiciones de control) se alinearon contra la base de datos de miRNA (Kozomara y Griffiths, 2014). Solo se consideraron para este estudio sRNAs completamente homólogos en los que todos los nucleótidos de la secuencia están perfectamente alineados frente a la secuencia de miRNA maduro depositada en la base de datos, las alineaciones revelaron 104 secuencias únicas, que pertenecen a 20 familias diferentes de miRNA anotadas en el *miRbase*.

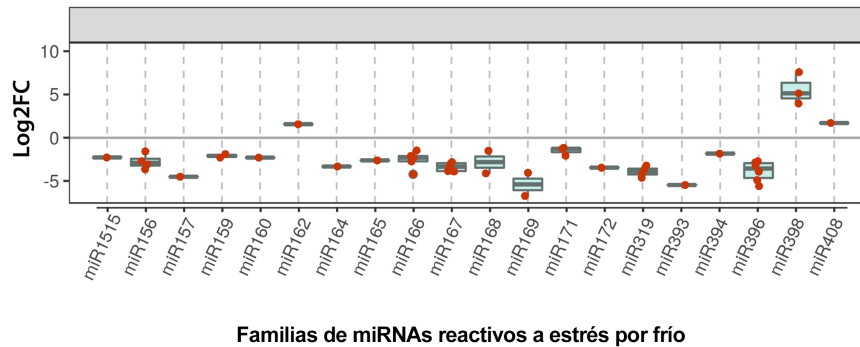


Figura 39.- Para determinar el sentido general de la expresión para cada familia de miRNA, utilizamos el valor mediano de la expresión (representado por la línea central) estimado por el análisis de todas las secuencias relacionadas de la familia (puntos rojos). los valores de expresión diferencial representados en la corresponden al log2FC obtenido por el análisis DESeq2.

Un estudio global sobre los niveles de expresión de cada uno de los miembros de una misma familia puso de manifiesto que en general las familias de miRNAs responden de una manera coordinada a la exposición a frío (Figura 39). Lo que pone de manifiesto que en melón y al menos para esta condición de estrés la respuesta mediada por miRNAs es común para todos los miembros de la misma familia.

Excepto las secuencias relacionadas con miR398, miR408 y miR162 que sobre- acumulan en plantas expuestas a frío, los 17 miRNAs restantes identificados con expresión diferencial fueron regulados negativamente en respuesta a baja temperatura.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos por secuenciación masiva, se determinó mediante pruebas de *stem loop* qRT-PCR los niveles de acumulación de 12 miRNAs representativos, estimados según análisis de datos de secuencia como regulados positivamente (miR397, miR398, miR408), negativamente (miR157, miR168, miR156, miR396, miR169, miR394) y no diferenciales (miR159, miR162, miR160) frente a condiciones de estrés por frío en melón.

Comparados los datos obtenidos por *stem loop* qRT-PCR (Figura 40) con los datos obtenidos por secuenciación de sRNAs fue posible determinar la existencia de una significativa correlación positiva entre los datos obtenidos por ambas aproximaciones. Lo que otorga mayor solidez a los datos de acumulación de miRNAs estimados mediante los análisis de expresión diferencial.

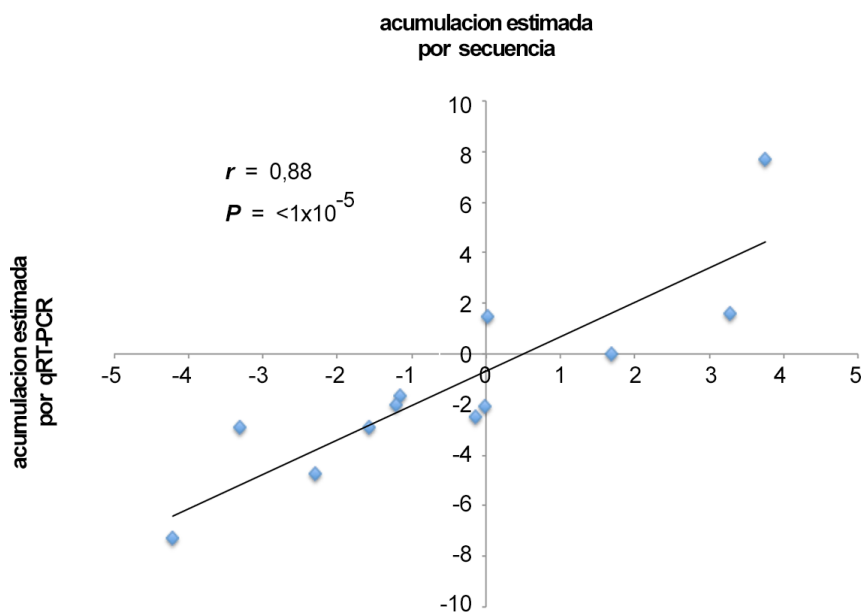


Figura 40.- Diagrama de dispersión que muestra la correlación estimada por el coeficiente de correlación de Pearson, entre los datos de acumulación obtenidos por secuenciación y qRT-PCR para 16 miRNA representativos.

### 5.4.3 Los miRNA y su función biológica mediada por la regulación de sus genes dianas.

Una vez determinada la existencia en melón de miRNAs con acumulación alterada en respuesta a tratamiento por frío, el objetivo siguiente fue tratar de identificar sus posibles transcritos diana y determinar si esta expresión diferencial estaba asociada con algún tipo de actividad reguladora de la expresión génica en la planta.

Como primer paso se procedió a predecir (empleando la herramienta bioinformática *psRNAtarget*) aquellos transcritos de melón que pudieran ser reconocidos por cada complejo miRNA/AGO1. Mediante esta aproximación se identificaron 18 posibles dianas para los 20 miRNAs (los pares miR156/157 y miR165/166 comparten diana) reactivos a frío identificados en melón (Tabla 3).



Tabla 3.- Descripción e información detallada de las dianas predichas para los miRNAs identificados diferencialmente en plantas de melón. Los términos de GO se estimaron en base a la información para transcritos homólogos en arábido.

miRNA	Diana Predicha	Numero de accesoión	ID	GO	Función específica	Función general
miR1515	Glioxilato / succinico	MU55093	GLYR2	GO:0055114	catalizador redox.	Procesos de oxidación-reducción.
	Semialdehid o reductasa-2					
miR156, miR157	similar a la proteína promotora de Squamosa	METC038709	SPL	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
				GO:0010358	Conformación de hojas	
				GO:0045893	Regulación positiva de la transcripción,	
				GO:0048510	Regulación de la traducción de vegetativo a reproductivo.	
miR159	BES1 / BZR1 proteína homóloga 4	METC032818	BEH4	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional.
				GO:0006355	Regulación de la transcripción	
				GO:0009742	Vía de señalización mediada por brasinoesteroides	
miR160	Factor de respuesta auxina 17	METC021734	ARF17	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
				GO:0009555	Desarrollo del polen	
				GO:0009653	Estructura anatómica de la morfogénesis.	
				GO:0009725	Respuesta a la hormona	
				GO:0009734	Vía de señalización activada por auxina	
				GO:0048830	Desarrollo de la raíz adventicia	
miR162	Chorophila 2	MU44640	CLH2	GO:0015996	Proceso catabólico de la clorofila	Metabolismo de la fotosíntesis
miR164	Proteína que contiene el dominio NAC 100-like	METC037964	NAC100	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
miR165, miR166	Proteína Cremallera Homeobox-leucina	XM_008441332.2	ATHB14	GO:0006351	Transcripción,	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Regulación de la transcripción	
				GO:0009944	Especificación de polaridad de la simetría bilateral.	

				GO:0009955	Especificación de patrón adaxial / abaxial	
				GO:0010014	Iniciación del meristemo	
				GO:0030154	Diferenciación celular	
miR167	Factor de respuesta auxina 6	XM_008441364.2	ARF6	GO:0009908	Desarrollo de flores	Regulación transcripcional.
				GO:0006351	Transcripción	
				GO:0009725	Respuesta a la hormona	
				GO:0009734	Vía de señalización activada por auxina	
miR168	Argonauta 1	XM_008440788.2	ago-01	GO:0009616	Silenciamiento génico inducido por virus	Silenciamiento de RNA
				GO:0016441	Silenciamiento génico postranscripcional	
				GO:0035195	Silenciamiento de genes por miRNA	
				GO:0060145	Silenciamiento génico viral en silenciamiento génico inducido por virus	
miR169	Factor de transcripción nuclear Y subunidad A-1-like	METC025602	NFYA1	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional.
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
				GO:0009793	Desarrollo embrionario que termina en latencia de semillas	
				GO:0010262	Embriogénesis somática	
				GO:0048316	Desarrollo de semillas	
				GO:0048510	Regulación de la traducción..	
				GO:0055045	Microgametogénesis	
miR171	Proteína 6 tipo espantapájaros	METC004377	SCL6	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional.
				GO:0006355	Regulación de la transcripción	
				GO:0007623	Ritmo circadiano	
				GO:0030154	Diferenciación celular	
				GO:0048768	Crecimiento de la punta de la célula del pelo de la raíz	
				GO:0051301	División celular	
miR172	Factor de transcripción sensible al etileno tipo	METC002019	AP2	GO:0006351	Transcripción,	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
				GO:0007275	Desarrollo del	

	AP2				organismo multicelular	
				GO:0009873	Vía de señalización activada por etileno.	
miR319	factor de transcripción TCP4	METC043926	TCP4	GO:0006351	Transcripción	Regulación transcripcional
				GO:0006355	Transcripción	
				GO:0007275	Desarrollo del organismo	
				GO:0009793	Desarrollo embrionario que termina en latencia de semillas	
miR393	Señalización por auxinas del tipo F-BOX 2-like	metc027743	AFB2	GO:0006952	Respuesta de defensa	Desarrollo vegetativo.
				GO:0007275	Desarrollo del organismo multicelular	
				GO:0009734	Vía de señalización activada por auxina	
miR394	Dominio de tipo EG45 que contiene proteína	MU57384	EG45	GO:0009627	Resistencia sistémica adquirida	Respuesta al estrés
				GO:0010230	Respiración alternativa	
miR396	Factor de regulación del crecimiento	METC031668	GRF	GO:0006351	Transcripción,	Regulación de la transcripción en respuesta a estrés.
				GO:0006355	Regulación de la transcripción, .	
				GO:0032502	Proceso de desarrollo	
				GO:0048366	Desarrollo de la hoja	
miR398	Superóxido dismutasa	METC018907	SOD	GO:0055114	Proceso de reducción de la oxidación.	Respuesta al estrés oxidativo.
	(Cu-Zn)			GO:0019430	Eliminación de radicales superóxido	
				GO:0006979	Respuesta al estrés oxidativo	
				GO:0034599	Respuesta celular al estrés oxidativo.	
miR408	Similar a la proteína básica azul	METC003548	BABL	GO:0055114	Procesos de reducción de oxidación	Procesos de oxidación-reducción.
				GO:0022900	Cadena de transporte de electrones	
				GO:0048653	Desarrollo de anteras	

En coincidencia con lo observado frecuentemente en el resto de las plantas analizadas (Li y Zhang, 2016) las dianas predichas fueron principalmente mRNAs que codifican para proteínas de melón homologas a factores de transcripción (FTs)

altamente conservados en otras especies (SPL, NAC, TCP, AP2, F-BOX, NFY, Scarecrow, ATHB14, etc.) y que están relacionados con regulación del desarrollo y la respuesta a estrés (regulados por miR156, miR157, miR159, miR160, miR164, miR165, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR319, miR396). Esta información es consistente con estudios previos que han mostrado que FTs cuya expresión está regulada por miRNAs tales como NAC (Jiang *et al.*, 2014), SPL (Stief *et al.*, 2014), o TCP (Danisman, 2016) cumplen una función fundamental en la respuesta a estrés en diversas especies vegetales. Otras dianas potenciales se pudieron asociar funcionalmente con procesos de oxidación-reducción (miR398, miR408, miR1515, y miR6478), respuesta a estrés (miR393, miR394, y miR397), silenciamiento de RNA (miR168 y miR390), procesos relacionados con la fotosíntesis (miR162) y metabolismo de metales (miR395). Como cabría esperar la gran mayoría de las dianas predichas fueron homologas a los transcritos regulados por la miRNAs de la misma familia descritos en otras especies vegetales.

Para validar la funcionalidad de las potenciales interacciones miRNA/diana, se analizaron por qRT-PCR los niveles de acumulación de las dianas predichas para ser reguladas por miRNAs con un  $\text{LogFC} \leq 1.5$  o  $\geq -1.5$  (16 de las 18 dianas) en respuesta a frío. De acuerdo a lo esperado, se obtuvo una correlación negativa significativa cuando se compararon los niveles de transcrito estimados por qRT-PCR con los de los miRNAs estimados por datos de secuenciación masiva de sRNAs (Figura 41). Estos resultados son consistentes con la idea de que estos miRNAs reactivos frente a condiciones de frío puedan estar implicados en la regulación de la expresión de sus dianas potenciales.

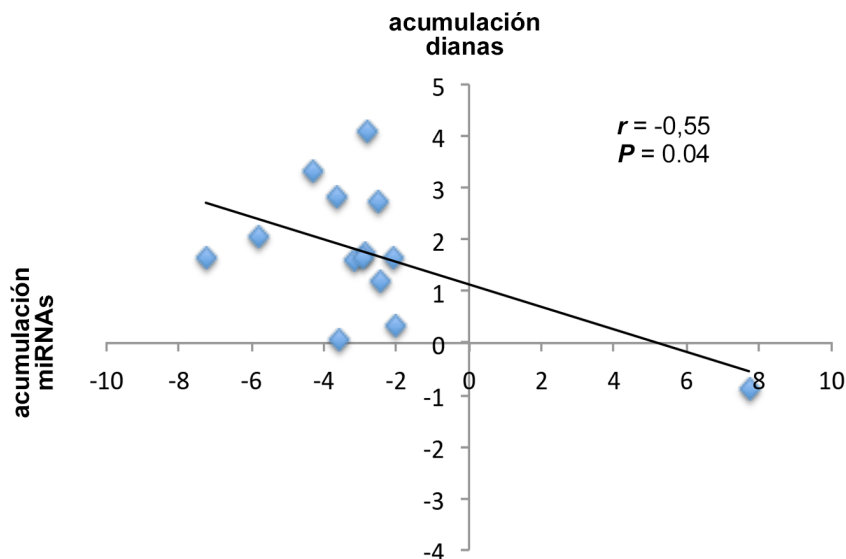


Figura 41.- Diagrama de dispersión que muestra la correlación estimada por el coeficiente de correlación de Pearson, entre los datos de acumulación obtenidos por secuenciación y qRT-PCR para 16 miRNA representativos.

Con el objetivo de aportar evidencias adicionales al potencial papel regulador de estos miRNAs relacionados con la respuesta a frío, se analizó mediante la técnica de 5' – *RLM-RACE*, la existencia de productos indicativos del procesamiento de transcritos diana mediante la actividad del complejo miRNA/AGO1 (Llave *et al.*, 2002), para 4 miRNAs representativos. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación experimental (Figura 42) mostraron que las secuencias correspondientes a las posiciones de corte predichas para cada interacción miRNA/diana (entre los nucleótidos 10 y 12 desde el extremo 5') fueron las mayoritarias en todos los casos estudiados.

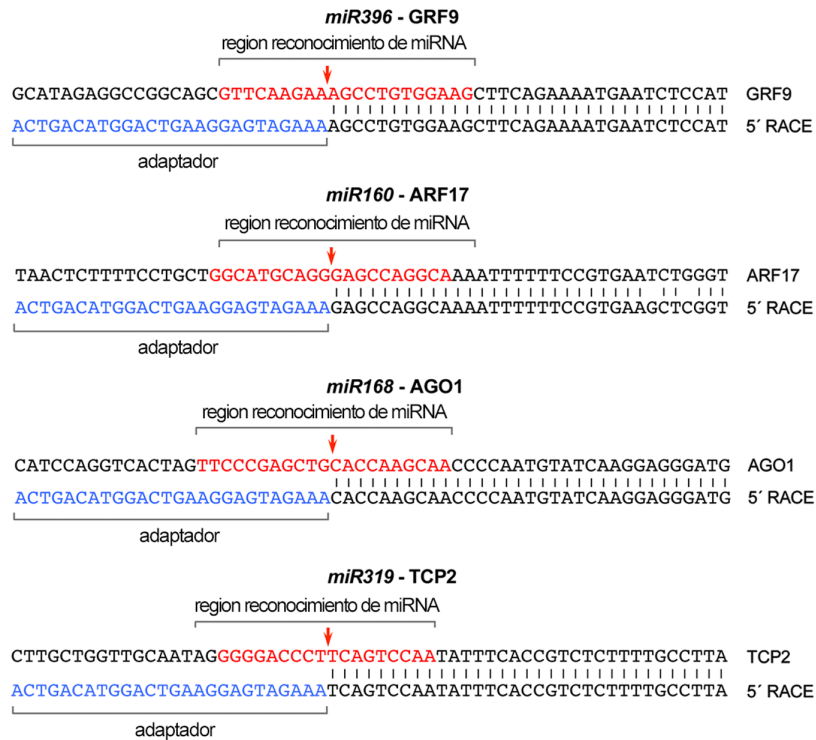


Figura 42.- Análisis por 5' RACE de dianas predichas de miRNA representativos. En rojo es la región de reconocimiento del miRNA, en azul el adaptador para el 5' RACE.

## 5.5 Discusión del capítulo 2.

En este capítulo hemos realizado un exhaustivo análisis de las alteraciones en los niveles de expresión de la población de miRNAs en plantas de melón en respuesta a una situación de estrés por bajas temperaturas. Los resultados obtenidos permitieron identificar 20 familias de miRNAs de melón que presentan un patrón significativo de acumulación diferencial en respuesta a frío. Lo que pone de manifiesto que en melón, al igual que en el resto de las especies analizadas, existe un grupo de miRNAs cuya expresión se encuentra íntimamente relacionada con los procesos de interacción de la planta con el ambiente.

Los miRNAs relacionados con la respuesta a estrés en melón coinciden en su mayoría con los descritos en otras especies vegetales expuestas a condiciones ambientales adversas tales como arroz (Xia *et al.*, 2012; Mittal *et al.*, 2015), soja (Sun *et al.* 2016; Li *et al.*, 2011), trigo (Pandey *et al.*, 2014; Akdogan *et al.*, 2015), algodón (Xie *et al.*, 2015), arabidopsis (Barciszewska-Pacak *et al.*, 2015), maíz (Zhang *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2009) y cebada (Kantar *et al.*, 2011). Esta observación es consistente con nociones previas que sugieren que la regulación de la respuesta a estrés, regulada por miRNAs, es un mecanismo altamente conservado en plantas (Sunkar *et al.*, 2012; Zhang, 2015; Cui, *et al.*, 2016; Shriram, *et al.*, 2016).

Un análisis detallado de los niveles de expresión de cada familia de miRNAs permitió determinar que todos los miembros de cada familia actúan de manera coordinada frente a frío y que la represión de la expresión de miRNAs es la respuesta más común en plantas de melón expuestas a esta condición ambiental adversa.

Teniendo en cuenta la función de las dianas de los miRNA identificados, los factores de transcripción aparecen como el principal grupo regulado por los miRNAs reactivos a estrés. Es sabido que los factores de transcripción desempeñan un papel fundamental en respuesta al estrés en diversas especies de plantas (Shao *et al.*, 2015; Samad *et al.*, 2017). Esto sugiere que el melón, al igual que otras especies estudiadas previamente, utiliza a los miRNAs como moduladores de la respuesta

transcripcional frente a una situación de estrés. De esta manera, un cambio en la expresión de miRNA puede tener un gran impacto en la célula a través de la acción de factores de transcripción, que funcionan como amplificadores de la respuesta (Samad *et al.*, 2017). Esto se debe a que los factores de transcripción tienen más capacidad para controlar múltiples dianas que los RNA reguladores, de hecho hay muchos ejemplos en los que un único factor de transcripción es suficiente para regular una vía metabólica completa (Hao *et al.*, 2011; Pireyre y Burow, 2015).

El control de los factores de transcripción parece indispensable para que pequeños cambios en la expresión de miRNA puedan conducir a cambios significativos en la expresión del gen diana. Las plantas utilizan este mecanismo regulador, altamente conservado dentro del reino vegetal, como una estrategia general para responder rápidamente en situaciones ambientales adversas (Zhang, 2015, Samad *et al.*, 2017).

Si se analiza de manera pormenorizada la acción de los miRNAs sobre sus dianas, podríamos sugerir que funcionalmente los miRNAs regulan a sus transcritos diana siguiendo la ley de la demanda de la regulación génica (Savageau, 1998). En este modelo, el modo negativo de regulación (represión) está asociado al control de la expresión de aquellos genes cuya función está en baja demanda en una situación ambiental estable (por ejemplo respuesta a situaciones de estrés). Mientras, el modo positivo de regulación (activación) está implicado en el control de la expresión de aquellos genes con alta demanda (por ejemplo implicados en desarrollo). Bajo este modelo cabría esperar que aquellos miRNAs que actúan como reguladores de la respuesta a estrés (una situación de baja demanda) sean en general reguladores negativos que se expresen en condiciones normales y sean reprimidos en situaciones de estrés. Este modelo de regulación explicaría porque 17 de los 20 miRNAs diferencialmente expresados en plantas de melón muestran represión de su acumulación en respuesta a frío.



## **6 CAPITULO 3.- EL PROCESAMIENTO ALTERNATIVO DE SU PRECURSOR REGULA LA ACUMULACION DE miR319 EN PLANTAS DE MELÓN EXPUESTAS AL FRÍO.**

### **6.1 Introducción.**

En el capítulo anterior hemos identificado los diferentes miRNA de melón que se regulan diferencialmente en respuesta al tratamiento por bajas temperaturas. Para seguir investigando el mecanismo de regulación dependiente de miRNA en condiciones de frío investigamos el procesamiento diferencial de miR319, que según los resultados obtenidos parece ser un mecanismo clave en la modulación de la respuesta a bajas temperaturas.

Teniendo en cuenta que los miRNAs son componentes clave de la red reguladora de la expresión génica, su acumulación en la planta está controlada predominantemente a través de una regulación precisa de los niveles de acumulación y procesamiento de sus precursores (Zhang *et al.*, 2015).

Mientras que los niveles de pri-miRNA dependen de su estabilidad, el procesamiento puede verse afectado por la estructura y longitud del plegamiento del precursor (Bologna *et al.*, 2013) o por la acción de las proteínas que forman el complejo que lo procesan (Ren *et al.*, 2012). Esta modulación fina de la biogénesis de miRNA es crucial para el desarrollo de la planta y la adaptación a los cambios ambientales (Zhang *et al.*, 2015).

Los precursores de los diferentes miRNA de plantas tienen diversas estructuras y longitudes que van desde 50 hasta los 500 nt (Cuperus *et al.*, 2011). Esta heterogeneidad suele reflejar diferencias significativas en su procesamiento (Bologna *et al.*, 2013). Por lo general un precursor origina un dúplex de miRNA único, sin embargo, algunos de estos, particularmente largos pueden dar lugar a RNA pequeños (sRNA) alternativos además de los miRNA esperados (Zhang *et al.*,

2010). Los precursores de miR159 y miR319 se encuentran entre aquellos con estructura y procesamiento de horquilla no canónico.

Diversos estudios han demostrado que durante el procesamiento de miembros de las familias miR159 y miR319, DCL1 corta sus precursores en cuatro puntos diferentes, para liberar varios dúplex de miRNA adicionales que pueden detectarse ocasionalmente *in vivo* (Axtell *et al.*, 2007; Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Sobkowiak *et al.*, 2012). Análisis pormenorizados, mediante técnicas de selección parcial de precursores, revelaron que en *arabidopsis* miR319 no podría ser generado eficientemente si este procesamiento múltiple se ve afectado (Bologna *et al.*, 2009). La conservación evolutiva de dicho patrón de biogénesis es inexplicable de acuerdo con nuestro conocimiento actual de miR319, en consecuencia, la significación biológica de este procesamiento fuera de lo común es desconocida (Li *et al.*, 2011).

Los miRNA miR159 y miR319 son riboreguladores altamente conservados que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la planta (Li *et al.*, 2011). Aunque ambos muestran gran similitud de secuencia, tienen un patrón de expresión diferencial y regulan mRNA distintos. La familia miR159 regula la expresión de factores de transcripción tipo MYB (Achard *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2007). Mientras que los miembros miR319 modulan la expresión de diversos miembros de la familia de factores de transcripción TCP, que regulan la proliferación de células vegetales (Palatnik *et al.*, 2003 y 2007; Jones-Rhoades y Bartel, 2004).

En diversas especies vegetales tales como arroz (Wang *et al.*, 2014), caña de azúcar (Thiebaut *et al.*, 2012) *arabidopsis* (Sunkar y Zhu, 2004) y tomate (Chen *et al.*, 2015), se ha reportado la existencia de una estrecha interacción entre la acumulación de miR319 y la respuesta al estrés inducido por el frío, lo que sugiere para este miRNA un rol fundamental en la modulación de los procesos implicados en la adaptación de las plantas a bajas temperaturas.

## **6.2 Objetivos**

- Identificar secuencias diferenciales del miR319 en bibliotecas de *Cucumis melo* expuesta a situaciones de estrés.
- Cuantificar la acumulación de las secuencias diferenciales.
- Determinar el o los distintos precursores del miR319.
- Identificar el procesamiento del precursor de miR319.

### **6.3 Materiales y métodos.**

#### **6.3.1 Análisis bioinformático de la expresión de miR319.**

El método de prueba estadística *edgeR-Bioconductor* v3.14 (Robinson y Oshlack, 2010; <https://bioconductor.org>) se utilizó para evaluar la expresión diferencial de secuencias derivadas de distintos precursores de la familia miR319 en plantas de melón sometidas a condiciones de baja temperatura. Los sRNAs con valores de expresión diferencial (*log2 fold change* ( $\log_2FC$ )  $\geq 2.0$  o  $\leq -2.0$  y un valor de FDR (*false discovery rate*)  $\leq 0.05$ ) se alinearon con la base de datos de miRNA, miRBase v21.0, utilizando *BLASTall* v2.2.17 (Griffiths-Jones, 2010). Sólo los sRNAs totalmente homólogos a los miembros previamente descritos de la familia *cme-miR319* (<http://www.mirbase.org>) se analizaron en este trabajo.

#### **6.3.2 Alineación de sRNAs**

Los sRNAs obtenidos de plantas expuestas a frío y sus controles se alinearon contra las cuatro secuencias de precursores de miR319 descritos en melón usando el programa *Bowtie* -v1.1.2- (Langmead *et al.*, 2009) con una homología del 100%. Los sRNAs alineados contra pri-miR319 se normalizaron a nivel de lecturas por millón (RPM).

#### **6.3.3 Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).**

La reacción de PCR de 20  $\mu$ l contenía 1X mezcla *Pyro Taq EvaGreen* qPCR (Cultek), 0,6  $\mu$ l de cada cebador y cantidades variables de productos de RT dependiendo de la abundancia del objetivo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado en el instrumento *qPCR ABI 7500 Fast-Real Time* (Applied Biosystems) usando un protocolo estándar, que incluía la etapa de disociación (intervalo de 60 a 95 °C) para monitorizar la curva de fusión de los productos de amplificación. La eficacia de la amplificación por PCR se obtuvo a partir de una curva patrón generada a partir de cuatro diluciones seriadas (1:10 cada vez) de cDNA mezclando todas las muestras.

Las expresiones relativas de miRNA se determinaron utilizando el método comparativo  $\Delta$ CT (Livak y Schmittgen, 2001) y se normalizaron a la media geométrica de expresión de Profilina (NM\_001297545.1) y *ADP-ribosylation factor-like* (XM\_008463181.2), como controles de referencia. La significación estadística de las diferencias observadas se evaluó mediante el test de Student con dos variables.

#### **6.3.4 5'-RLM-RACE**

La identificación de los transcritos degradados se realizó mediante 5'-RLM-RACE (Llave *et al.*, 2002) de acuerdo con la guía del kit *GeneRacer* (Invitrogen, Carlsbad, CA) con modificaciones menores. Brevemente, se ligó directamente un adaptador de RNA fosforilado en 5' al extremo 3' de los productos de escisión que permitía una reacción de en ligación en una reacción que contenía 100 ng de poliA (RNA purificado usando un kit Midi de mRNA de *Oligotex* (Qiagen) del RNA total.

Los RNA ligados se transcribieron de forma inversa con el cebador oligo dT *GeneRacer* (como se describió anteriormente). Estos cDNA se amplificaron en una PCR universal con cebadores *GeneRacer* 5' y 3'. Este producto sirvió como plantilla para la amplificación específica de los transcritos mediante dos PCR consecutivas con el cebador 5'-*GeneRacer* y dos cebadores anidados específicos de RNA (Tabla S3). Los productos de PCR se clonaron y secuenciaron, permitiendo la determinación de sitios de corte del RNA.

## 6.4 Resultados.

### 6.4.1 La expresión de todos los miembros de la familia miR319 se alteran significativamente en respuesta a frío.

En este capítulo se describe el análisis de los niveles de expresión de sRNAs recuperados de plantas de melón expuestas a condiciones de baja temperatura durante 11 días.

Las lecturas con expresión diferencial significativa se identificaron en base a dos criterios: un cambio superior a dos veces del log<sub>2</sub>FC (> 2.0 o <-2.0 ) y un valor de FDR (*false discovery rate*) ≤0.05. Solo las lecturas completamente homólogas a los miembros previamente descritos de la familia cme-miR319 de melón depositada en *miRBase* se incluyeron en posteriores análisis.

Se obtuvieron 13 secuencias de sRNAs (con tamaño entre 20 y 22 nt) homólogas a miembros de las 4 familias (miR319a, b, c y d) (Tabla 4).

Tabla 4.- Secuencias diferenciales del miR319 en las bibliotecas de melón

Identificador	Secuencia sRNA	Nº nucleótidos	Pri-mir319	ARM	Posición
Sncmel000030049	CTTGACTGAAGGGAGCTCCC	21	A	3'	160-180
			B	3'	162-182
Sncmel000030049	CTTGACTGAAGGGAGCTCCCT	22	A	3'	160-182
			B	3'	162-183
Sncmel000030049	TTGGACTGAAGGGAGCTCCT	20	C	3'	210-229
Sncmel000030049	CTTGACTGAAGGGAGCTCCT	21	C	3'	209-229
Sncmel000030049	TTGGACTGAAGGGAGCTCCTC	22	D	3'	177-198

Todas las secuencias (excepto una perteneciente a miR319d) mostraron una disminución significativa en sus niveles de acumulación en plantas de melón expuestas a bajas temperaturas. Una secuencia de 21 nt de longitud correspondiente a una forma madura del miR319c fue el sRNA que mostró una mayor disminución en sus niveles de acumulación (LFC -6,72) en respuesta a frío (Figura 43).

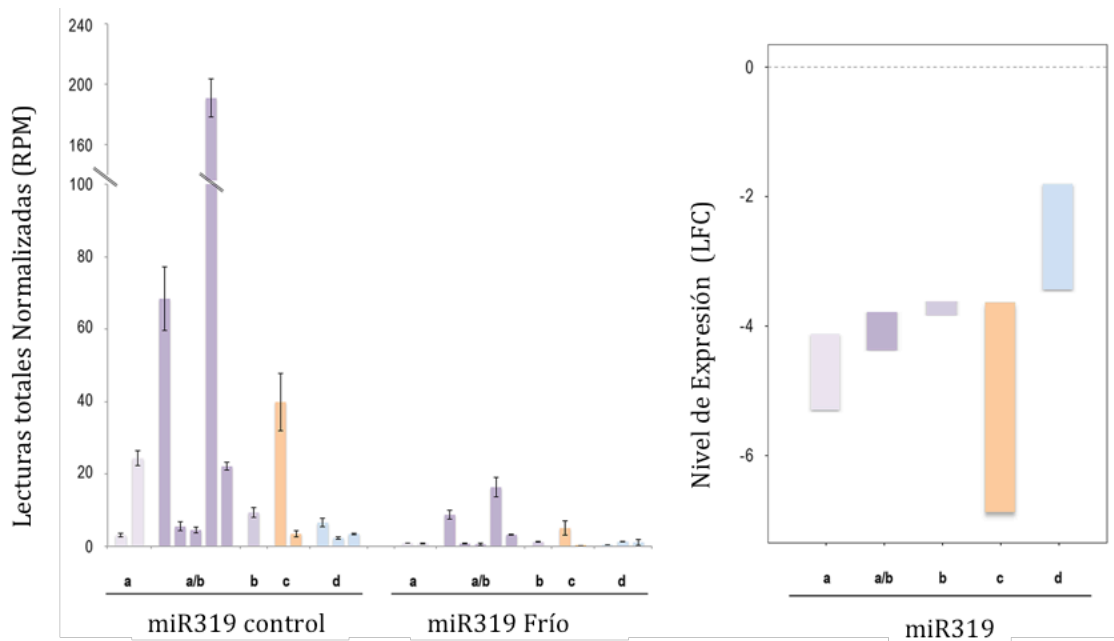


Figura 43.- Representación gráfica de los niveles de expresión de los miembros de la familia miR319 en plantas de melón, en la gráfica izquierda, las barras de error muestran el intervalo de confianza de la diferencia entre medias, en la gráfica derecha la acumulación relativa expresada en *Log fold change* (LFC), estimado por el método de prueba estadística *edge-R*.

#### 1.4.2 Los bajos niveles de miR319c detectados en plantas de melón expuestas a frío están asociados a altos niveles de acumulación de su precursor.

Por regla general se asume que los niveles de acumulación de un determinado miRNA en la planta suelen estar asociados con los niveles de su precursor. Con el objetivo de determinar si la disminución en la acumulación de miR319c asociada a baja temperatura puede ser consecuencia de una menor acumulación de pri-miR319c, se analizaron por qRT-PCR los niveles de precursor de miR319c en plantas expuestas al frío y plantas en condiciones control. En la figura 43 se observa un aumento significativo en la acumulación de pri-miR319c en plantas de melón bajo esta condición de estrés abiótico, evidenciando que la significativa reducción en la acumulación de miR319c observada en plantas expuestas al frío no está relacionada con una disminución en la transcripción o estabilidad de su precursor.

En contra de lo esperado, nuestros resultados demostraron que la acumulación de miR319c en plantas expuestas a frío (significativamente reducida) sigue un sentido inverso a la de su precursor (significativamente aumentada). Esto sugiere que quizá

la disminución en los niveles de acumulación observados para el miR319c podría ser consecuencia de alteraciones sustanciales en el procesamiento de los precursores del miR319c.

#### **6.4.2 Un miRNA alternativo es procesado diferencialmente a partir del precursor pri-miR319c en plantas de melón expuestas a frío.**

Una vez establecido que la regulación negativa de miR319c en plantas expuestas a bajas temperaturas es independiente de los niveles de acumulación de pri-miR319c, se intentó determinar si este fenómeno podría estar relacionado con alteraciones en el procesamiento secuencial de su precursor (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009, 2012 y 2013). Para ello los sRNAs recuperados tanto de las muestras control como de las plantas expuestas a estrés se alinearon (permitiendo solo coincidencia exacta) con las secuencia de los cuatro precursores de melón depositados en miR-Base.

El patrón de distribución de sRNAs esperado de acuerdo al modelo secuencial de procesamiento de los precursores de la familia miR319c se muestra en la Figura 44. Este modelo de procesamiento predice la presencia de un pico predominante de sRNAs correspondiente a la secuencia madura de miR319, acompañado ocasionalmente de picos adicionales constituidos por pocas secuencias correspondientes a la hebra complementaria del duplo miR319/miR319\*, que al no ser incorporada en el complejo RISC es inestable y poco frecuentemente recuperada en procesos de secuenciación.



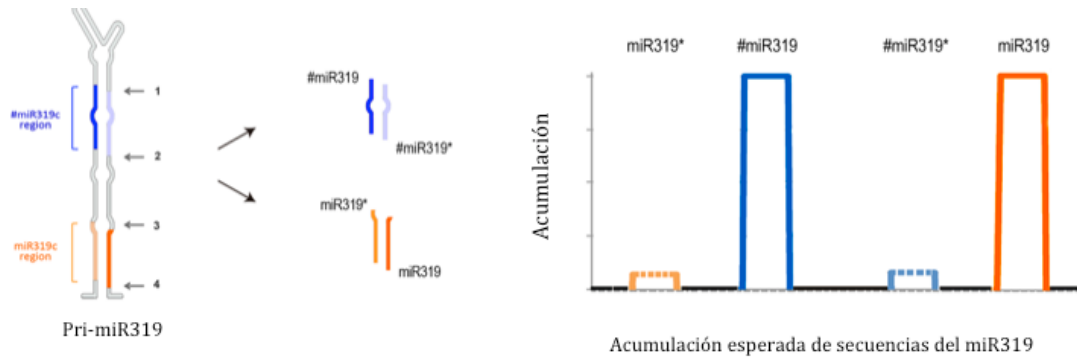


Figura 44.- Estructura canónica de un precursor pri-miR319. Representación gráfica predicha derivada del procesamiento convencional del precursor miR319. Según el procesamiento propuesto de bucle a base (Bologna *et al.*, 2009), solo se esperan gráficas que representen secuencias derivadas del dúplex estable miR319 / miR319\*.

Quando los sRNA recuperados tanto de las plantas expuestas al frío como de control se alinearon frente a las secuencias precursoras de los miembros de la familia miR319 en melón observamos que mientras que los precursores de miR319b y miR319d mostraban el patrón convencional de distribución, un pico extra al esperado se observó en los alineamiento frente a los precursores de miR319c y miR319a (Figura 45). Este pico extra fue particularmente prominente en el alineamiento frente al precursor miR319c, de las muestras de sRNAs derivadas de plantas de melón expuestas a frío, llegando incluso a niveles similares a los observados para la secuencia madura del miR319c en plantas control (Figura 45).

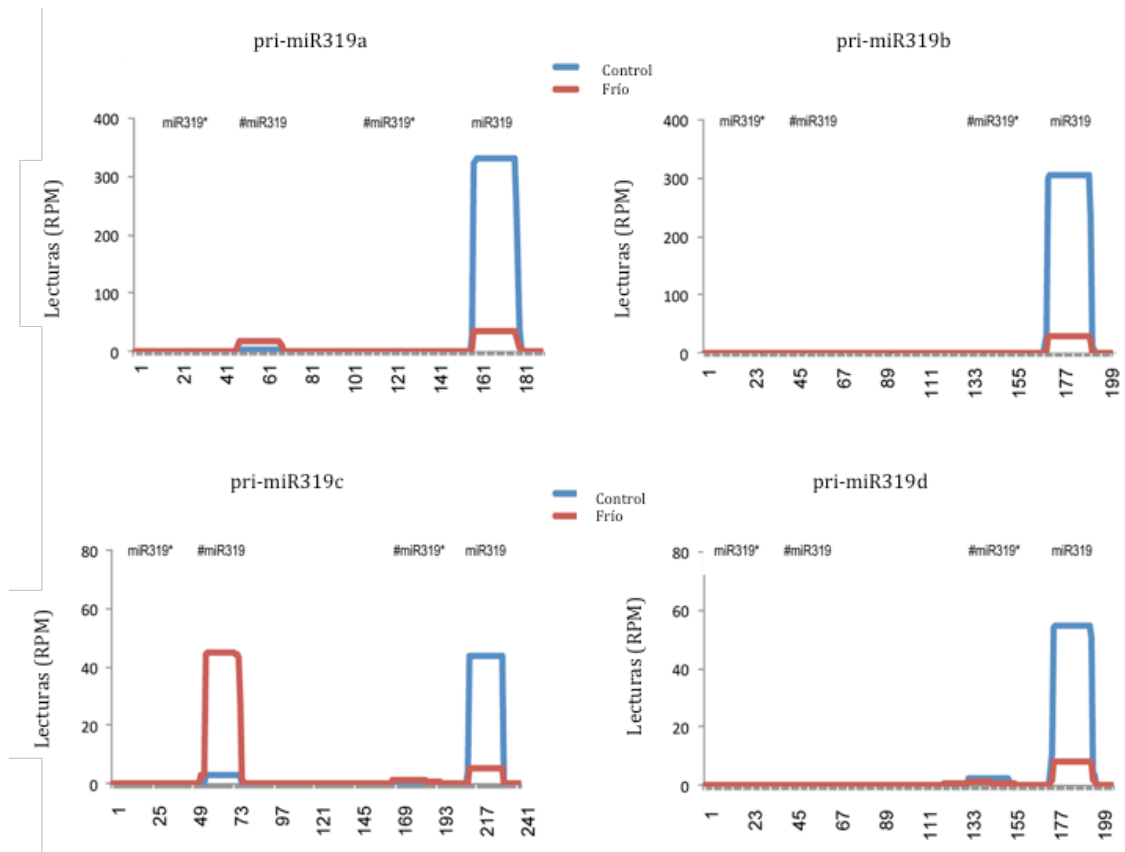


Figura 45.- Estructura de los precursores del pri-miRNA319 provenientes de las bibliotecas de *Cucumis melo* sometidas a condiciones de frío. Los sRNAs (de 20 nt a 25 nt) recuperados de las plantas de melón expuestas al frío (línea roja) y control (línea azul) se trazaron (permitiendo solo la coincidencia exacta) en las cuatro secuencias de pri-miR319 descritas en melón. Los valores en el eje Y representan el número total de lecturas en cada biblioteca (normalizado en lecturas por millón). Las posiciones de nucleótidos de las diversas secuencias de pri-miR319 analizadas están representadas en el eje X.

Los sRNAs correspondientes a este pico extra en el pri-miR319c fueron 2 secuencias de 20 y 21 nts, localizadas sobre el brazo 5' de la horquilla (Tabla 5) en oposición a las formas maduras del miR319c que se originan a partir del brazo 3'.

Tabla 5.- Secuencias del #miR319c

Identificador	Secuencia sRNA	Nº De Nucleótidos	pri-miR319	Dirección Precursor	Posición en el Precursor
SNCMeI000063020	AACTGCCGACTCATTCACTC	20	c	5'	57-76
SNCMeI000035967	AACTGCCGACTCATTCACTCA	21	c	5'	57-77

Un estudio detallado de estas secuencias relacionadas con el pico extra permitió determinar que correspondían a el miRNA alternativo (#miR319c) liberado como consecuencia del procesamiento no convencional de este precursor (Figura 45). Este #miR319 es homólogo al descrito previamente en plantas de arabis como

consecuencia del procesamiento múltiple de pri-miR319, sin embargo en esta especie este #miRNA/miRNA\* alternativo duplo es altamente inestable y sus sRNAs se recuperaron en muy bajo número a partir de las plantas analizadas (Bologna *et al.*, 2009).

#### 6.4.3 La acumulación diferencial de #miR319c esta inversamente relacionada con los niveles de expresión de miR319c maduro.

Cuando se analizó a partir de los datos de secuenciación la acumulación de secuencias relacionadas con el pico extra detectado en el precursor miR319c, se observó que ambas secuencias mostraron un significativo aumento de sus niveles de acumulación en plantas de melón expuesta a frío (Figura 46). Estos resultados indican la existencia de una correlación inversa entre el número de lecturas de miR319c y #miR319c recuperadas a partir de plantas de melón en cualquiera de las 2 condiciones analizadas. Ya que tanto en muestras de control como en las muestras expuestas al frío, una alta expresión de uno de los miRNAs consideradas (miR319c o #miR319c) implica necesariamente una reducción significativa en la acumulación del otro.

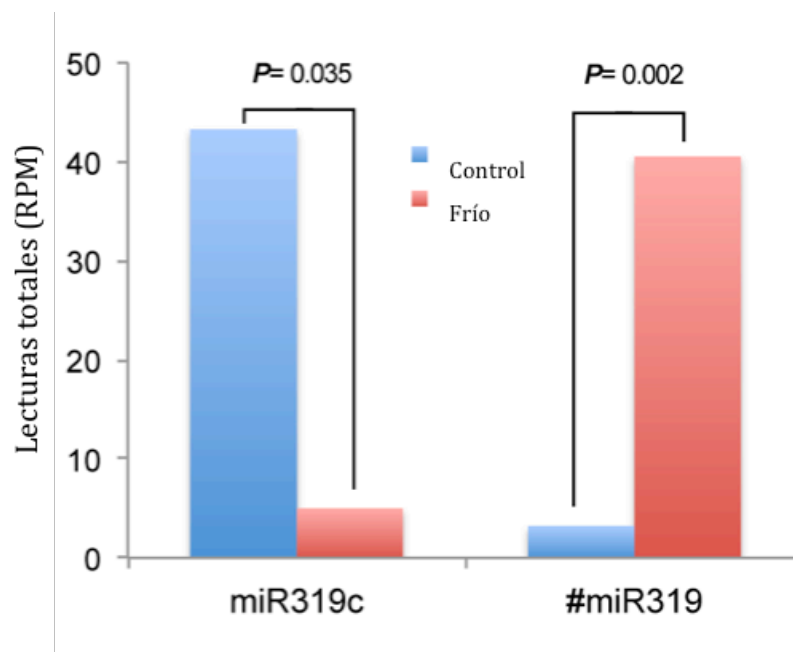


Figura 46.- Acumulación de secuencias del 319c canónico y el alternativo. Histograma que representa la suma de las medias de las secuencias relacionadas con miR319c (longitud 20 y 21nt) y # miR319c (longitud 20 y 21nt) recuperadas de plantas expuestas al frío (barras rojas) y control (barras azules). Los valores de P se estimaron mediante el análisis de t-Test emparejado.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la disminución significativa de miR319c observada en plantas de melón expuestas a baja temperatura podría ser consecuencia de alteraciones en el procesamiento de sus precursores, favoreciendo la acumulación de la forma alternativa miR 319c en lugar de la forma canónica.

Cabe señalar que si bien un pico extra (casi imperceptible) fue también detectado cuando los sRNAs provenientes de plantas control y expuestas a frío se alinearon contra el precursor de miR319a (Figura 47), la acumulación diferencial de las secuencias relacionadas (pertenecientes a #miR319a) en plantas expuestas a estrés no fue significativa (Figura 47).

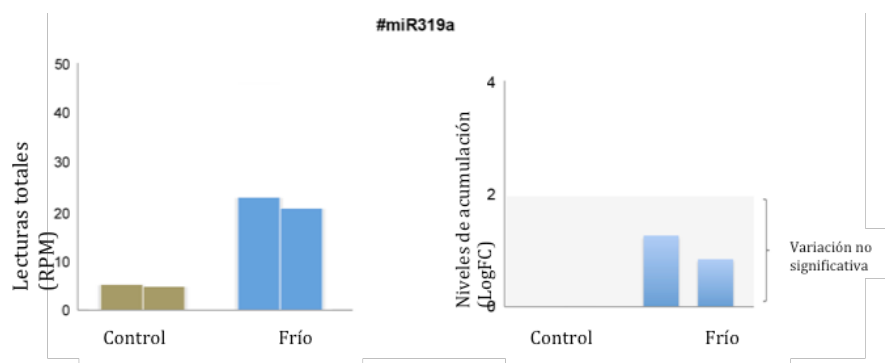


Figura 47.- Acumulación del mir319 alternativo en el pri-mir319a Representación gráfica de niveles de secuencias #miR319a en plantas de melón expuestas al tratamiento en frío y control, la acumulación de miRNAs en las muestras analizadas en forma de lecturas totalizadas normalizadas (izquierda) y acumulación de cambios LogFC (derecha) estimadas mediante análisis *edge-R*.

Por otra parte un análisis similar realizado frente a las secuencias de los precursores del resto de miRNAs de melón con expresión diferencial en respuesta a frío evidenció que no existen indicios de procesamientos diferenciales asociados con la respuesta a estrés (Figura 48).

Estos resultados sugieren que la alteración en el procesamiento del precursor asociada a la exposición a baja temperatura, es un fenómeno restringido exclusivamente al precursor de miR319c.

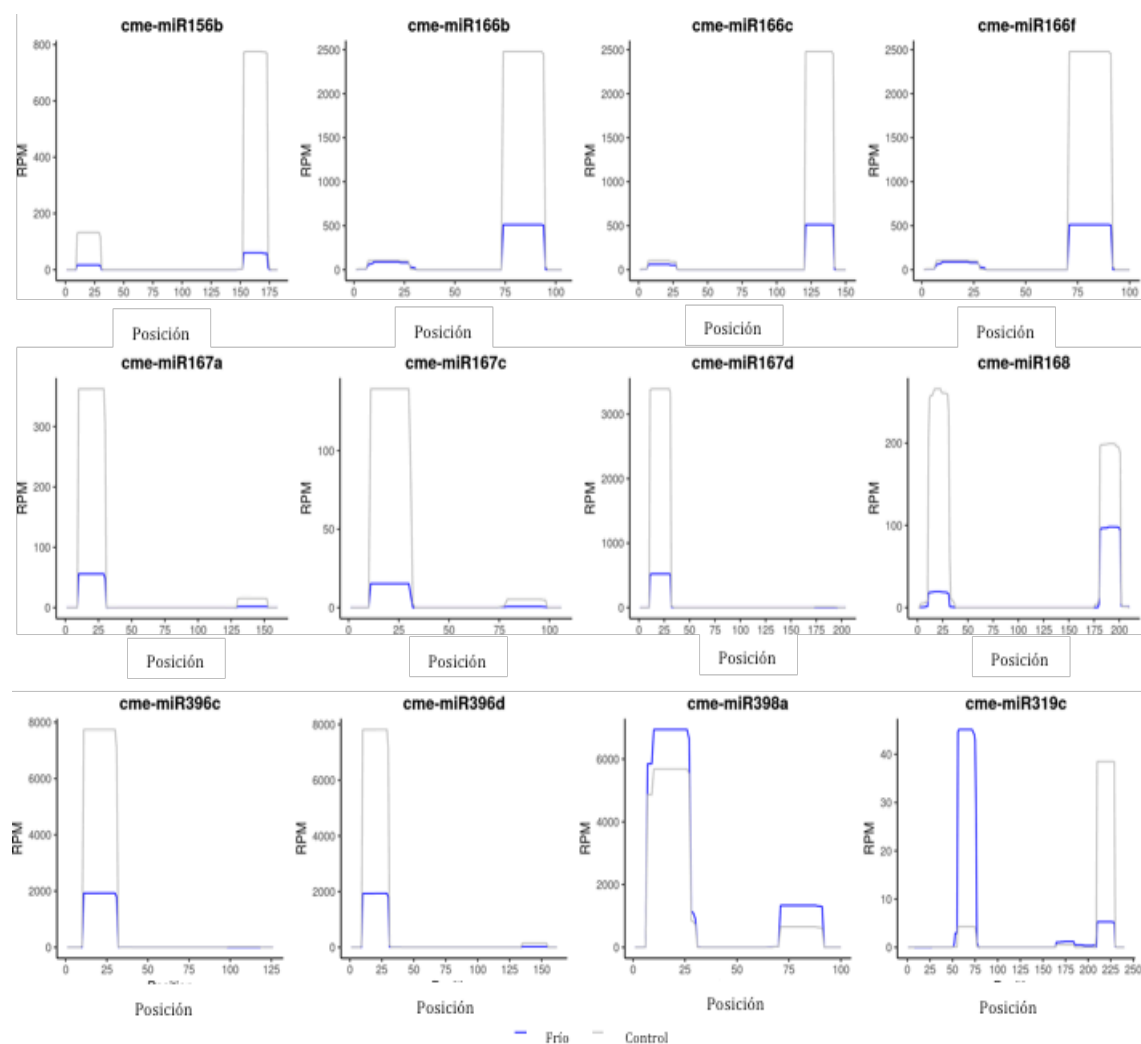


Figura 48.- Análisis de precursores y su acumulación de secuencias de miRNA, los sRNA (de 20 nt a 25 nt) recuperados de melón expuestos a frío (línea azul) y de control (línea gris) se trazaron (permitiendo solo coincidencia exacta) en las secuencias de precursores de miRNAs de melón. Las posiciones de nucleótidos de las diversas secuencias de pri-miRNA analizadas están representadas en el eje X.

#### 6.4.4 El miRNA alternativo (#miR319c) no posee actividad biológica convencional demostrable.

Una vez determinada la expresión diferencial de este miRNA en respuesta a la exposición a frío intentamos determinar si el #miR319c identificado en plantas de melón posee actividad biológica convencional. Para ello se empleó el programa *PS-RNA target* (Dai y Xiao, 2011) para predecir RNAs de melón que pudieran ser dianas potenciales de #miR319c. Se seleccionaron para validaciones posteriores solo aquellos transcritos con un nivel de expectativa de reconocimiento  $\leq 3.5$  (Tabla 6).

Tabla 6.- Dianas del #miR319 predichas por psRNATarget

Secuencia	Diana	Expectativa
AACTGCCGACTCATTCACTCA	METC017726	2
	METC003436	3,5
	METC008902	3,5

El análisis de la actividad biológica potencial del #miR319c se realizó mediante 2 estrategias complementarias, i) cuantificación de los niveles de transcrito por *qRT-PCR* y ii) identificación de residuos de procesamiento de transcritos dianas por *5'RLM-RACE*. Los resultados obtenidos por estas 2 aproximaciones experimentales no permiten afirmar que al menos bajo las condiciones analizadas el #miR319c de melón tenga algún tipo de actividad biológica convencional sobre sus potenciales dianas. Según los datos obtenidos, los niveles de acumulación de los transcritos dianas no disminuyeron significativamente en plantas expuestas a bajas temperaturas (Figura 50), como cabría esperar en el caso de que la acumulación de estos transcritos estuviera siendo regulada negativamente por #miR319c (con altos niveles de acumulación en plantas expuestas a frío). Por otra parte no se encontraron en las plantas de melón analizadas por *5'RLM-RACE* residuos de transcrito derivados de transcritos diana que hubieran sido procesados por el complejo #miR319c/AGO (Figura 49).

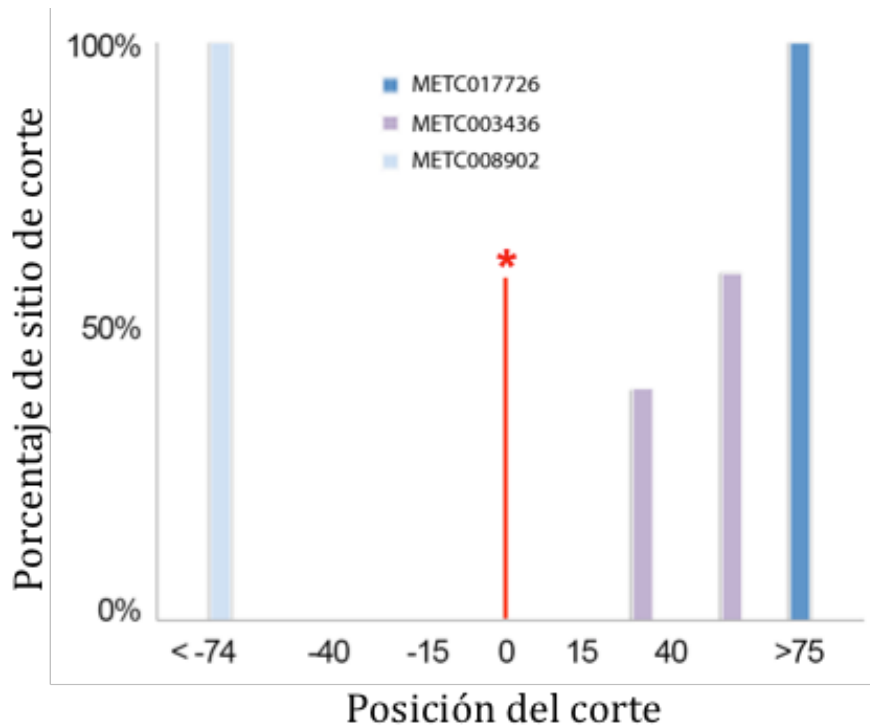


Figura 49.- Representación de transcritos degradados, detectados por 5'RLM-RACE. el eje x indica la posición del nucleótido en la región seleccionada de las transcripto analizado, el asterisco rojo indica la posición esperada para el corte mediado por #miR319c, el eje Y muestra la frecuencia relativa de clones secuenciados que muestran corte en esta posición. como se observa, no se obtuvo el corte canónico del #miR319c para los tres objetivos potenciales analizados.

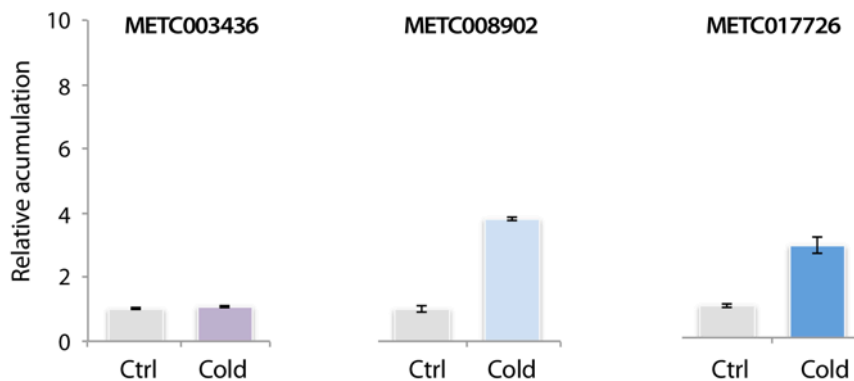


Figura 50.- Acumulación de las dianas predichas, para evaluar adicionalmente la función biológica de #mir319c, la acumulación de dianas predicha se estimó mediante qRT-PCR tanto en plantas tratadas en frío (con un aumento de #miR319c) como en el control.

#### 6.4.5 La escisión parcial y el procesamiento alterado de su precursor modulan la acumulación de miR319c en plantas de melón expuestas a frío.

Para explorar si el procesamiento del precursor está asociado al desequilibrio observado entre la acumulación de la forma alternativa

(#miR319c) y de la forma canónica (miR319c), procedimos a analizar los residuos de procesamiento en precursores de miR319c (pri-miR319c) en plantas de melón expuestas a frío y en plantas control.

Para este propósito empleamos una modificación de la técnica 5'RACE especialmente desarrollada para el estudio de intermediarios de procesamiento de pri-miRNAs (Bologna *et al.*, 2009).

Debido a la posición relativa de los oligonucleotidos utilizados como cebadores, este método permite la detección, en el brazo 3' de la horquilla, de los cuatro puntos de procesamiento secuencial -desde el bucle terminal a la base- que tiene lugar en el pri-miR319c (Figura 51).

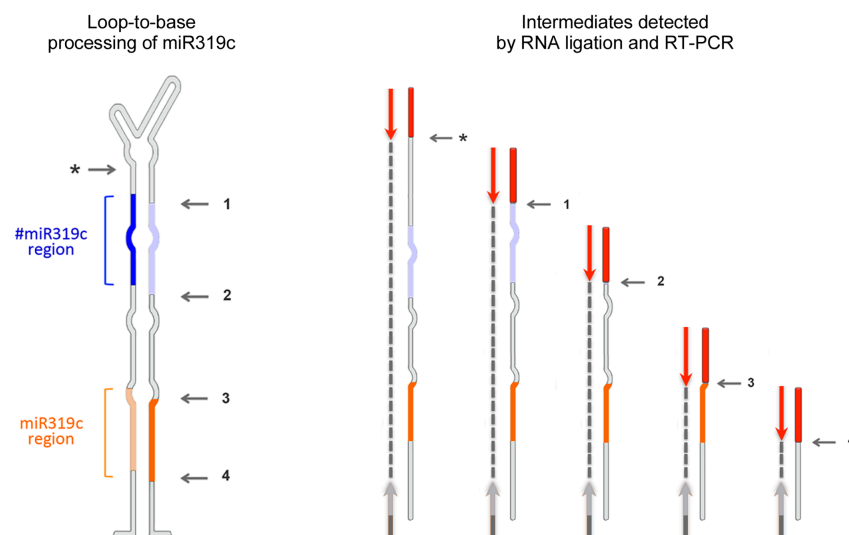


Figura 51.- Procesamiento del precursor del miR319, Esquema que ilustra el método utilizado para identificar los precursores intermediarios procesados y los fragmentos esperados. (\*) Indica el corte parcial en el 5'. (1 a 4) Representa las cuatro reacciones de escisión esperadas para el procesamiento canónico de bucle a base del precursor miR319c. Las barras rojas representan el adaptador de RNA ligado al extremo 5' del precursor procesado. Las flechas (grises y rojas) indican la posición de los cebadores empleados en la última amplificación de PCR.

Como es posible observar en la Figura 52, los datos de secuencia evidenciaron que los sitios de corte detectados por 5' RACE a partir de los precursores intermediarios en el brazo 3' eran consistentes con lo esperado para el procesamiento secuencial canónico de bucle a base.



En el análisis de procesamiento de pri-miR319c amplificado a partir de plantas control se observó que aproximadamente el 68% de las lecturas analizadas coincidían con el sitio exacto de los cortes 3 (4,3%) y 4 (63,8%) responsables de la liberación del miR319c madura. Mientras que una fracción menor (6,4%) de las secuencias detectadas correspondieron a fragmentos originados por el corte 1, responsable de la biogénesis de #miR319c (Figura 52 panel superior).

Sin embargo y en contra de lo esperado, una proporción considerable (19,1% y 4,3% respectivamente) de las lecturas recuperadas indican la existencia de un sitio de corte no canónico en 2 posiciones adyacentes del brazo 5' del pri-miR319c (señalado con una flechas rojas en la Figura 52 panel superior).

De acuerdo con el diseño experimental del ensayo 5'RACE, los cortes detectados en los 5' del pri-miRNA implican la existencia de intermediarios parcialmente escindidos con cortes en solo una de las hebras de la horquilla (Bologna *et al.*, 2013).

Es importante remarcar que este corte parcial en el brazo 5' de la horquilla es exclusivo de los precursores provenientes de plantas control y no se detectó en ningún caso, cuando se evaluaron los intermediarios procesados procedentes de plantas expuestas al frío (Figura 52 panel inferior).

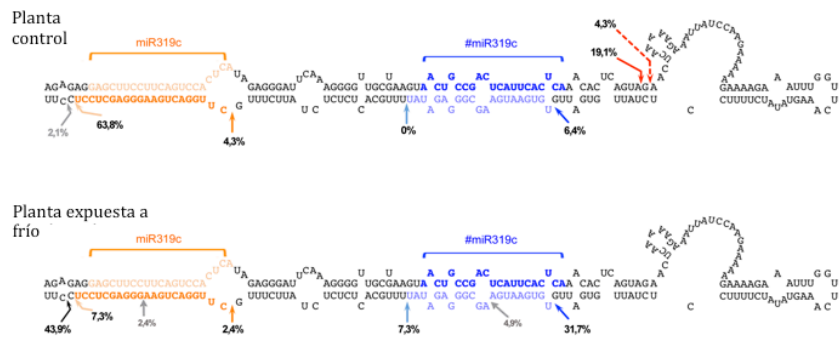


Figura 52.- Detección de fragmentos del precursor del 319c. Los Esquemas muestran la estructura secundaria predicha (estimada a partir de la secuencia METC022194) y la abundancia (en porcentaje) de los sitios de corte detectados en el precursor procesado de las plantas de control (panel superior) y expuesta al frío (panel inferior). Las flechas rojas (lisas y entrecortadas) muestran puntos de procesamiento parciales a 5'. Las flechas azules y magenta indican el punto de procesamiento 1 y 2. Los puntos de procesamiento relacionados con los cortes 3 y 4 están marcados con flechas naranjas. Con las flechas negras se indica la posición de corte inesperado implicado en el procesamiento de miR319c inestable. Las flechas grises muestran el sitio de corte menos abundante e inespecífico.

Según nuestros datos los precursores originarios de plantas desarrolladas bajo condiciones de baja temperatura mostraron una alta proporción (39%) de residuos de procesamiento originados por cortes en las posiciones 1 (31,7%) y 2 (7,3%), responsables de la liberación del #miR319c. Por el contrario, solo un 9,7% de los fragmentos secuenciados corresponden a los intermediarios producidos por los cortes en las posiciones 3 (2,4%) y 4 (7,3%), implicados en la escisión del miR319c canónico (Figura 52 panel inferior).

Una parte mayoritaria de los productos secuenciados (43,8%) correspondió a precursores procesados en una posición no canónica en el brazo 5' adyacente al sitio de corte 4 (marcado con una flecha negra). Aunque este intermediario de procesamiento fue detectado con más frecuencia en plantas expuestas a frío, el sRNA de 22 nt de longitud predicho para ser liberado por este corte no pudo ser recuperado de ninguna de las bibliotecas provenientes de las 3 réplicas realizadas sobre plantas expuestas a esta situación de estrés. Esto sugiere que este punto de procesamiento alternativo identificado en los precursores provenientes de plantas de melón

expuestas a frío, genera una forma de miR319c altamente inestable que no consigue finalizar su proceso convencional de maduración y estabilización en AGO1, dando lugar al significativo descenso de este miRNAs ante esta situación de estrés.

#### 6.4.6 La disminución de miR319c inducida por frío se correlaciona con una mayor acumulación de miembros bien establecidos de la vía de señalización de baja temperatura.

En un intento por intentar identificar la relación funcional existente entre la disminución de miR319c inducida por frío y el proceso de respuesta a bajas temperaturas analizamos las posibles vías metabólicas que pudieran estar reguladas por miR319c en melón.

Si bien los sistemas informáticos predicen que tanto TCP2 como TCP4 podrían ser potenciales dianas de la actividad de miR319c, de acuerdo con nuestros resultados la diana prioritaria para la actividad de miR319c en el melón parece ser TCP2 (Tabla 7).

Tabla 7.- Dianas predichas para el miR319c mediante el programa *psRNA-Target* en sus dos versiones

SECUENCIA	DIANA	EXPECT	UPE	SITIOS DE HOMOLOGÍA	HOMOLOGÍA	POSICIÓN DE HOMOLOGÍA		DESCRIPCIÓN DE DIANA	INHIBICIÓN	ALINEACIÓN DE MIRNA/DIANA
						inicio	final			
TTGGACTGAAGGGAGCTCCT	MU58965	3,5	17,908	1	21	257	277	Cucumis melo transcription factor TCP2-like	Clavage	miRNA 21 UCCUCGAGGGGAAGUCAGGUUC 1 ::: : Target 257 AGGGGACCCUUCAGUCCA AU 277
TTGGACTGAAGGGAGCTCCT	MU58222	4	20,26	1	21	157	177	Cucumis melo transcription factor TCP4	Clavage	miRNA 21 UCCUCGAGGGGAAGUCAGGUUC 1 ::: : Target 157 AGGGGACCCUUCAGUCCA AU 177
TTGGACTGAAGGGAGCTCCT	MU58965	4	-1	1	21	257	277	Cucumis melo transcription factor TCP2-like	Clavage	miRNA 21 UCCUCGAGGGGAAGUCAGGUUC 1 ::: : Target 257 AGGGGACCCUUCAGUCCA AU 277

Por esta razón y para establecer una correlación funcional entre los niveles de miR319c y la respuesta al estrés por frío, analizamos la expresión del mRNA que codifica para el homólogo en melón de *TEOSINTE BRANCHED1 / CYCLOIDEA / PROLIFERATING CELL FACTOR 2* (TCP2), la diana predicha para miR319 en diversas especies vegetales (Jones-Rhoades y

Bartel, 2004; Palatnik *et al.*, 2007) y la prioritaria predicha para miR319c en melón.

```

CMeI-TCP2 (XM_008446308.2)
1911 GGCCUUGCUGGUUGCAAUAGGGGGACCCUUCAGUCCAAUAUUUCACCGUCUCUUUUGCCU 1970
      ::::: ::::::::::::::
miR319c (20 nt)      20 UCCUCGAGGGAAGUCAGGUU 1
miR319c (21 nt)      21 UCCUCGAGGGAAGUCAGGUUC 1

CMeI-TCP4 (XM_008453484.2)
2421 AAACCAGUUUUUUUCUCAGAGGGGACCCUUCAGUCCAGUAACACACCUUCAUUUCGCGC 2480
      ::::: ::::::::::::::
miR319c (20 nt)      20 UCCUCGAGGGAAGUCAGGUU 1
miR319c (21 nt)      21 UCCUCGAGGGAAGUCAGGUUC 1
  
```

Figura 53.- Predicción de la diana por psRNATarget

Los ensayos de cuantificación de transcritos mediante PCR en tiempo real (*qRT-PCR*) revelaron que la acumulación de *TCP2* aumentó significativamente en plantas de melón expuestas a frío (Figura 54), lo que indica que la disminución de miR319c inducida por este estrés se correlaciona con la regulación funcional esperada de su mRNA diana. Por otra parte la actividad reguladora de miR319c sobre el homólogo de *TCP2* en melón, se vio reforzada por la detección (mediante RLM-5'-*RACE*) de residuos de transcrito de *TCP2* compatible con lo esperado según el procesamiento vía complejos miR319c/AGO1 (Figura 55).

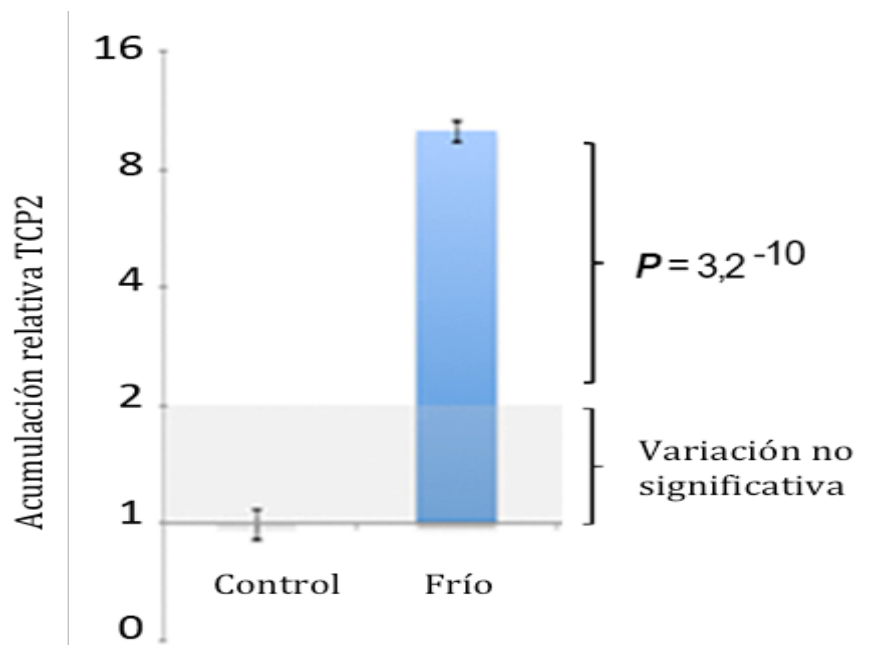


Figura 54.- Histograma que muestra los niveles de acumulación relativa, estimada por *qRT-PCR* del mRNA de *TCP2* en plantas de melón expuestas a frío. Las barras de error muestran el intervalo de confianza de la diferencia entre medias el  $p = p$  valor.

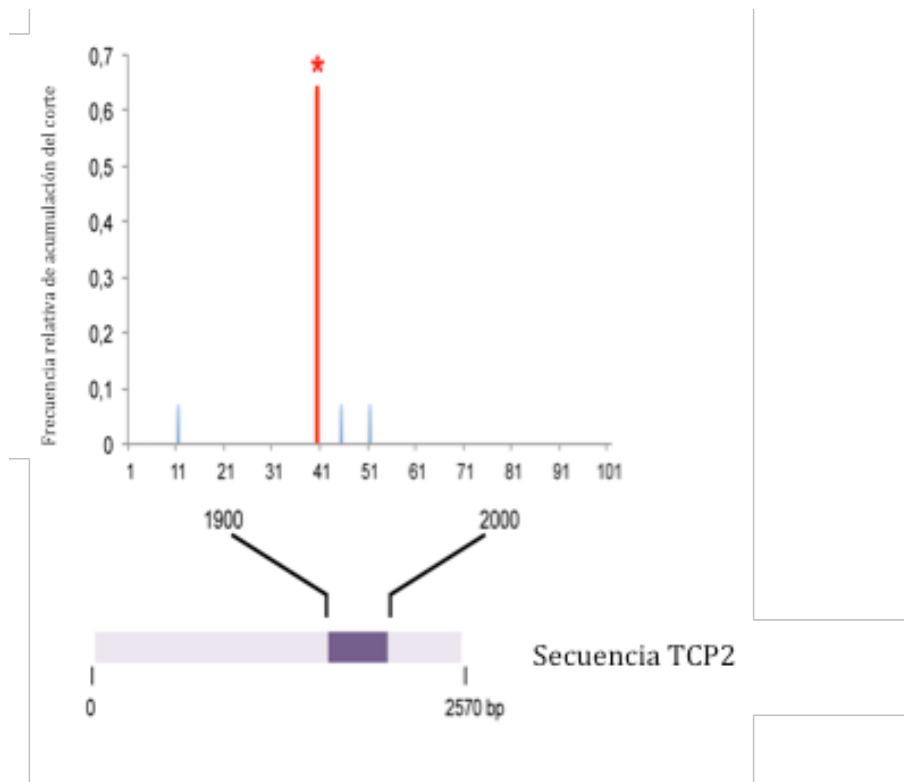


Figura 55.- Representación de la transcripción de TCP2 y TCP4 detectada por 5'RLM-RACE. En el eje X se representa la posición en nucleótido de la región donde se realiza la hibridación y corte del miRNA (cuadro magenta en el gráfico) en TCP2 y TCP4. En el eje Y la frecuencia relativa de los clones secuenciados que muestran el corte en esta posición. El asterisco rojo indica la posición esperada para el corte de TCP2 y TCP4 mediada por miR319.

En estudios recientes se ha descrito que en plantas de arábidopsis TCP2 actúa como regulador positivo de la acumulación del factor de Elongación de Hipocótilo 5 (HY5) (He *et al.*, 2016). HY5 es un factor de transcripción del tipo bZIP que, además de su papel central en la fotomorfogénesis (Oyama *et al.*, 1997; Lau y Deng, 2010), actúa también como un regulador positivo implicado en el proceso de aclimatación a frío en arábidopsis (Catala *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2015), mediante la activación de componentes clave de la biosíntesis de antocianinas (Perea-Resa *et al.*, 2017).

Para evaluar si el aumento del nivel de TCP2 observado en las plantas de melón expuestas al frío, podría asociarse a estos mecanismos de respuesta a bajas temperaturas descritas en arábidopsis, procedimos a determinar, mediante *qRT-PCR*, los niveles del homólogo en melón al factor HY5 de arábidopsis.

Tal y como se muestra en la Figura 56, la acumulación del transcrito que codifica para el factor HY5 en melón se incrementó significativamente en las plantas expuestas al frío. Sugiriendo la existencia de una asociación directa, vía HY5, entre miR319c y HY5 en plantas de melón expuesta a condiciones de bajas temperaturas.

Para obtener evidencias adicionales que respalden esta posibilidad procedimos a evaluar la acumulación de transcritos relacionados con componentes de la biosíntesis de antocianinas tales como, CHALCONA SINTASA (CHS) y CHALCONA ISOMERASA (CHI).

Los resultados obtenidos por qRt-PCR evidenciaron que tal y como se describió previamente durante el proceso de aclimatación a frío en arabisopsis la acumulación de transcritos de CHC y CHI, se incrementó de manera significativa en plantas de melón expuestas a frío (Figura 56).

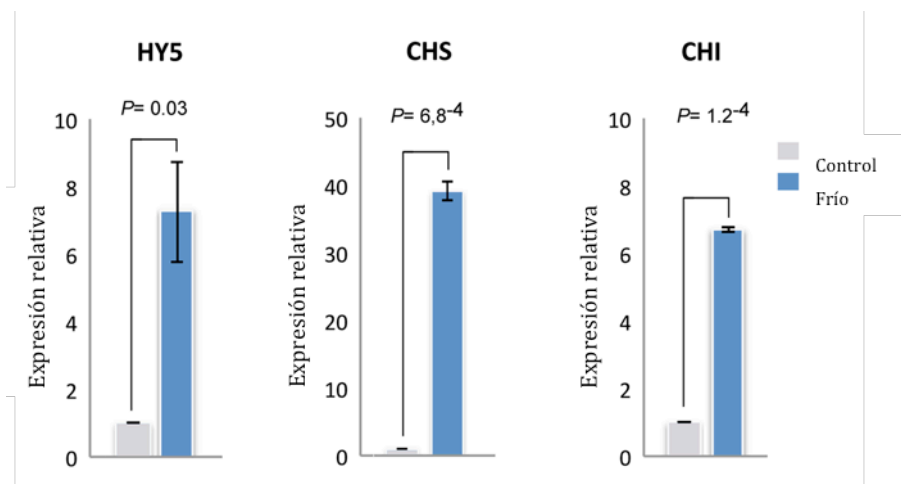


Figura 56.- Acumulación de hipocótilo elongado5 (HY5), chalcona sintasa (CHS) y chalcona isomerasa (CHI) Acumulación relativa con respecto al control no tratado, estimado mediante qRT-PCR, en plantas de melón expuestas a baja temperatura durante 11 días. Las barras de error muestran el intervalo de confianza de la diferencia entre medias. El valor de P se estimó mediante el análisis de t-Test emparejado.

## 6.5 Discusión del capítulo 3

Los miRNA desempeñan un papel fundamental en el control de diversos aspectos tanto del desarrollo como de las interacciones de la planta con el ambiente (Reis *et al.*, 2015; Shriram *et al.*, 2016). En los últimos años, numerosos estudios han evidenciado que, en la totalidad de las especies analizadas, existe una fuerte correlación entre la respuesta al estrés y la acumulación diferencial de ciertos miRNA (Kumar, 2014; Ma *et al.*, 2014; Zhang, 2015). Aunque nuestra comprensión del vínculo entre la expresión de miRNA de las plantas y las condiciones ambientales adversas ha mejorado mucho, todavía quedan por descifrar muchas preguntas al respecto. En este sentido, el conocimiento detallado de los mecanismos que regulan el procesamiento de los precursores de miRNAs bajo condiciones de estrés, es sin duda un desafío interesante (Zhang, 2015).

Para abordar este problema, analizamos la acumulación de miR319 en plantas de melón expuestas a condiciones de baja temperatura. Nuestros resultados indicaron que, en coincidencia con lo observado en otras especies vegetales como arroz (Wang *et al.*, 2014), *Arabidopsis* (Sunkar y Zhu, 2004) y caña de azúcar (Thiebaut *et al.*, 2012), los niveles de acumulación de miRNAs de la familia miR319 son sensibles al estrés inducido por frío.

Un análisis más detallado evidenció que si bien secuencias pertenecientes a todos los miembros de la familia sufrían regulación negativa, miR319c fue el miRNA que mostró una disminución más evidente en respuesta a frío. Además, la observación de que la disminución de miR319c podría asociarse a la regulación negativa de HY5 mediada por TCP2, clave de las vías de biosíntesis de antocianinas implicadas en la señalización de la respuesta a baja temperatura en *Arabidopsis* (Catala *et al.*, 2011), sugiere para miR319c una función reguladora esencial durante el proceso de respuesta a frío en melón (Figura 57).

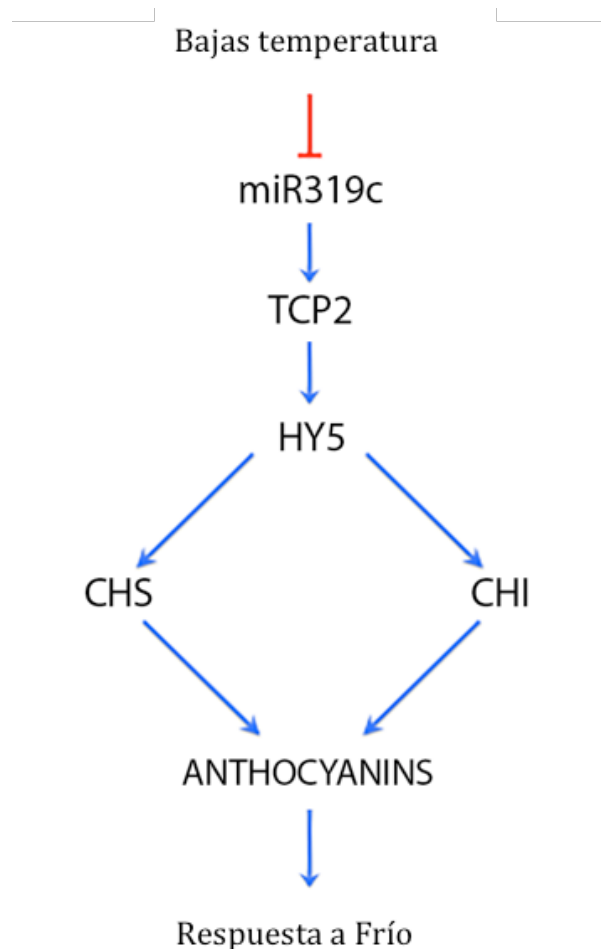


Figura 57.- Ruta de regulación de respuesta a frío medida por el miR319c, Modelo propuesto para la función miR319c en la respuesta al frío en melón. La disminución inducida por baja temperatura de miR319c promueve el aumento de HY5 mediado por TCP2 que modula transcripcionalmente la acumulación de componentes clave de la ruta de biosíntesis de antocianinas (CHS y CHI) involucrada en la respuesta al frío.

Las evidencias acumuladas hasta el momento indican que, en general, existe una correlación positiva entre la acumulación de un miRNA y su precursor correspondiente. Sin embargo, observamos que las plantas de melón sometidas a estrés por frío exhiben una disminución significativa en la acumulación de miR319c asociada a un aumento significativo en los niveles de su precursor. Este resultado, que evidencia que la acumulación diferencial del miR319c es independiente de la transcripción y/o estabilidad del pri-miR319c, abrió la puerta para considerar la posibilidad de que la disminución observada en plantas de melón expuestas a bajas temperaturas pudiera ser consecuencia de alteraciones en el procesamiento de sus precursores.

Para evaluar esta posibilidad, se analizó mediante un alineamiento de secuencias la distribución de los sRNA derivados del pri-miR319c presentes en



plantas control y en plantas sometidas a estrés por frío. Este estudio reveló que la disminución en la acumulación de miR319c se correlacionó estrictamente con un aumento significativo en la acumulación de un miRNA alternativo derivado del precursor miR319c. Este miRNA no canónico, identificado como #miR319c, se determinó como el homólogo en el melón del derivado de los primeros cortes durante la biogénesis de miR319 en arabis (Bologna *et al.*, 2009).

Nuestros datos evidenciaron que en respuesta a condiciones de baja temperatura, la acumulación de miR319c en el melón depende estrictamente de la estabilidad del #miR319c, que surge de la región superior de su horquilla precursora. Estas observaciones son coincidentes con trabajos previos realizados en plantas transgénicas indicando que la acumulación del miRNA alternativo derivado del precursor miR319 compromete la biogénesis y acumulación del miR319 canónico en arabis (Bologna *et al.*, 2009; Sobkowiak *et al.*, 2012).

Las evidencias acumuladas hasta ahora respaldan la idea de que durante el procesamiento secuencial de pri-miR319 son necesarios cuatro cortes (mediados por DCL1) hasta que finalmente se libere el duplo miR319/miR319\* (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009, 2012 y 2013). Nuestro análisis de precursores procesados en plantas no tratadas respalda que, aunque en general el proceso de biogénesis del miR319c en melón comparte estos cortes múltiples, conservados evolutivamente desde el musgo *Physcomitrella patens* a arabis (Addo-Quaye *et al.*, 2009; Bologna *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011), un corte parcial adicional en el brazo 5' de la horquilla precursora puede estar involucrado en el procesamiento pri-miR319c en melón.

La identificación de estos intermediarios, procesados en el brazo 3', respalda la idea de que probablemente deriven del procesamiento incompleto de la horquilla precursora de una manera similar a la descrita durante la biogénesis miR171a/b, miR393b y miR166b en arabis (Bologna *et al.*, 2013). Curiosamente, este sitio de corte parcial no se encontró cuando se analizaron precursores procesados en plantas expuestas al frío, lo que demuestra que el

procesamiento normal de pri-miR319c se ve alterado en las plantas que crecen bajo esta condición ambiental. Considerando que las plantas expuestas al frío (que carecen del corte parcial durante el procesamiento del precursor) exhiben una disminución significativa de los niveles maduros de miR319c, es razonable suponer que este evento de corte adicional podría favorecer la acumulación del duplo canónico miR319c/miR319c\* en plantas de melón.

Es importante destacar que este corte parcial en el brazo 3' de la horquilla, no se detectó cuando los precursores de miR319a se analizaron en plantas control. Curiosamente, cuando examinamos la estructura secundaria predicha para pri-miR319c y pri-miR319a a temperatura de control (28°C) y para pri-miR319c a temperatura de tratamiento en frío (18°C), observamos que el precursor para miR319a (que no presenta este corte parcial) exhibe una estructura de horquilla más estable. Este resultado es consistente con la idea de que los dominios de RNA no estructurados (*loops*) que según las predicciones existen en el precursor de miR319c (en plantas mantenidas a temperatura estándar para el desarrollo de melón, 28-30 °C) podrían estar asociados al corte parcial en el brazo 3' durante la biosíntesis convencional de miR319c en melón. Esta posibilidad es consistente con resultados previos que indican que ciertos dominios alternativos de RNA pueden competir con los dominios canónicos del precursor llegando en algunos casos a ser reconocidos por la maquinaria de procesamiento de un pri-miRNA (Song *et al.*, 2010).

Las causas mecánicas que promueven la disminución de miR319c en las plantas de melón expuestas al frío aún no se han establecido, sin embargo, la observación de que la posición de corte 4 (involucrada en la liberación del duplo canónico miR319c/miR319c\*) está visiblemente alterada bajo condiciones de estrés, permite establecer un vínculo entre la ausencia del corte parcial adicional, con alteraciones en la precisión de procesamiento del precursor miR319c. El miR319c (de 22 nt de longitud), que se espera sea liberado como consecuencia de la alteración en la posición de corte 4, no se detectó en las plantas de melón expuestas al frío, lo que sugiere que este miR319c/ iR319c\* no canónico es inestable.

En conjunto, nuestros resultados son consistentes con la idea de que, en las plantas de melón, el procesamiento del precursor miR319c podría comenzar con un corte parcial en el brazo 3' del tallo superior de la horquilla. El homólogo en melón a DCL1 continuaría luego el procesamiento del precursor mediante cuatro cortes en dirección de bucle a base, hasta que finalmente se libera el miR319c. En coincidencia con lo observado en *arabidopsis*, este corte múltiple de pri-miRNA daría como resultado una acumulación minoritaria (o imperceptible) de la forma madura del miRNA alternativo #miR319c.

Sin embargo en condiciones de baja temperatura y por causas desconocidas – quizá relacionadas con la estructura secundaria del precursor-, el primer corte parcial en el brazo 3' se ve afectado. La falta de este primer procesamiento influiría sobre la eficiencia y precisión de los cortes secuenciales mediados por DCL1 (principalmente corte 4) involucrados en la liberación de miR319c, promoviendo una disminución significativa en la acumulación de la forma madura de miR319c. Además, y como consecuencia de alteración en la biogénesis vía de biogénesis de miR319c, el procesamiento y la acumulación del miRNA alternativo #miR319c en la planta, se ve significativamente incrementada.

La existencia de precursores de miRNA parcialmente procesados ha sido descrita tanto en plantas (Bologna *et al.*, 2013) como animales (Bracken *et al.*, 2011; Gurtan *et al.*, 2012), sin embargo la base funcional y las implicaciones reguladoras de este procesamiento inusual siguen sin ser dilucidadas (Bologna *et al.*, 2013). La observación de que la falta de este intermediario, parcialmente procesado, afecta negativamente la biogénesis de pri-miR319c proporciona nuevos conocimientos sobre la versatilidad del procesamiento de miRNAs de la planta y los mecanismos que los regulan en respuesta a las condiciones ambientales mediadas por este tipo de RNA reguladores.

## 7 DISCUSIÓN

El incremento de la población mundial junto con la industrialización global constituyen dos de los principales eventos responsables del cambio climático (Zang *et al.*, 2015). Considerando que se prevé que estos dos factores continúen en fase de crecimiento exponencial, es imperativo la búsqueda de nuevas alternativas, para producir cultivos destinados a la alimentación, industria, generación de bio-combustibles, etc (Kumar, 2014; Mittler y Blumwald, 2010).

Condicionadas por su naturaleza sésil, las plantas están obligadas a tolerar condiciones ambientales variables, que van a tener un impacto en su desarrollo (Zhu, 2002). Estos factores externos pueden ser agentes inductores de estrés (biótico y abiótico) y para responder a sus efectos las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de adaptación y supervivencia (Shinozaki y Yamaguchi, 2007; Jin *et al.*, 2009, Ramírez *et al.*, 2009).

Dentro de los factores ambientales que afectan negativamente al desarrollo de las plantas, encontramos las bajas temperaturas. El concepto de estrés inducido por bajas temperaturas se refiere exclusivamente al causado por temperaturas que pueden estar entre 1 y aproximadamente 18 grados, dependiendo de la especie que se trate. Dado que las plantas son poiquilotermas, las bajas temperaturas son un factor crítico en el desarrollo de importantes cultivos de interés agronómico. En general, los cultivos de origen tropical o subtropical (ej. tomate, maíz, soja, melón) presentan susceptibilidad al estrés por frío, en tanto que otros cultivos como el trigo y la cebada (originarios de climas templados), muestran menor sensibilidad a este tipo de estrés.

Los efectos de las bajas temperaturas en las plantas incluyen cambios en la bioquímica y biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformacionales en enzimas, en la ultra estructura de mitocondrias y cloroplastos, en los metabolismos fotosintético y respiratorio además de disminución del crecimiento y alteraciones en el desarrollo. Uno de los efectos mejor caracterizados de las bajas temperaturas es la disminución de la fluidez de las membranas, además actualmente se está investigando en la actividad transcripcional, ya que es otro de

los procesos celulares que suele verse profundamente afectado como consecuencia de la exposición de una planta a bajas temperaturas.

### **La sobreexpresión de *BvCOLD1* mejora la tolerancia al estrés por frío y diferentes estreses abióticos en arabidopsis.**

La técnica de sobreexpresión de bibliotecas de ADNc en *Saccharomyces cerevisiae*, permite identificar genes de plantas implicados en resistencia a distintas condiciones inductoras de estrés, como *SR* (Forment *et al.*, 2002), *LTL1* (Naranjo *et al.*, 2006), *BvCKA2* (Kanhonou *et al.*, 2001), *eIF1A* (Rausell *et al.*, 2003); y al estrés osmótico como *BvSAT1* (Mulet *et al.*, 2004a) y *BvGLB2* (Mulet *et al.*, 2004b, Timoneda, 2012). Es sabido que el estrés por frío, por salinidad y por sequía solapan algunos de sus mecanismos moleculares de respuesta (Mahajan y Tuteja, 2005), En este trabajo hemos identificado una nueva aquaporina de *Beta vulgaris* utilizando una estrategia de sobreexpresión en levadura (Serrano R *et al.*, 2003) bajo estrés por frío. Este enfoque se ha utilizado antes para identificar genes de levadura en condiciones de frío (Vicent I *et al.*, 2015) y genes de plantas bajo estrés por sequía o salinidad, pero esta es la primera vez en la que se utiliza para identificar genes de plantas capaces de conferir tolerancia a frío.

La proteína *BvCOLD1* está localizada en el retículo endoplásmico (Figura 22), La sobreexpresión de esta proteína indujo una tolerancia a frío en etapas tempranas del desarrollo de las plantas, pero no en etapas posteriores (Figuras 12 y 29). La función principal de *BvCOLD1* parece estar relacionada con el transporte de boro (Figura 34), ya que se expresa en todos los tejidos, no se regula a nivel transcripcional por estrés y este mineral es esencial para la formación y estructura de la pared celular. Un hipotético mecanismo de funcionamiento sería que al encontrarse en el retículo cargaría este de ácido bórico, que luego quedaría dentro de las vesículas que siguiendo las rutas de transporte vesicular que se originan en el retículo llegarían a la pared celular, donde el boro es indispensable.

## **Los niveles de acumulación de diversos miRNAs de melón varían significativamente en condiciones de baja temperatura**

A lo largo de esta tesis doctoral se ha evidenciado que los miRNAs constituyen elementos clave en los procesos de regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones ambientales adversas. Para abordar este aspecto de la fisiología vegetal en respuesta a bajas temperaturas, en este trabajo se ha empleado melón como modelo experimental, debido principalmente a que es un cultivo asociado a condiciones cálidas (por encima de los 22 °C) y que las bajas temperaturas constituyen un factor limitante en las fases iniciales de su desarrollo en explotaciones convencionales al aire libre, condicionando drásticamente los periodos de siembra.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en melón existe un número considerable de miRNAs (20) cuya expresión está estrechamente relacionada con la exposición de la planta a bajas temperaturas. En general el sentido de esta alteración es mayoritariamente represivo, ya que 17 de los 20 miRNAs mostraron un descenso significativo en sus niveles de acumulación. Otro punto importante a tener en cuenta es que el sentido de la respuesta (incremento o disminución de los niveles de acumulación) fue constante para todos los miembros de una misma familia, lo que pone de manifiesto la existencia de una respuesta regulatoria coordinada, al menos en este sentido, frente a bajas temperaturas.

En lo que respecta a las dianas sobre las que los miRNAs ejercen su actividad reguladora, estos resultados ponen de manifiesto que en melón (al igual que en todas las especies vegetales analizadas) las dianas funcionales de los miRNAs son en su mayoría factores de transcripción, ligados principalmente al control de la respuesta a estrés y el desarrollo.

Considerando la respuesta general (represión de la expresión de miRNAs) y la función de la mayoría de los transcritos dianas, es posible proponer un modelo organizativo del control de la respuesta a estrés mediado por miRNAs en melón en el que aquellos miRNAs que actúan como reguladores de la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés actuarían durante este proceso de dos

maneras antagónicas (Figura 39). Por un lado aquellos miRNAs implicados en la regulación de factores de transcripción relacionados con la respuesta a estrés serían regulados negativamente (disminución en su acumulación) en condiciones de bajas temperatura lo que permitiría la activación transcripcional de aquellos genes encargados de recuperar la homeostasis celular. Por otra parte aquellos miRNAs relacionados con la regulación de factores de transcripción ligados al desarrollo serían regulados positivamente (aumento en su acumulación) lo que se traduciría en una disminución significativa de aquellos procesos relacionados con el desarrollo.

### **La exposición a bajas temperatura altera el procesamiento de un miRNA relacionado con la regulación de la respuesta a frío.**

Las evidencias acumuladas hasta el momento indican que, en general, existe una correlación positiva entre la acumulación de un miRNA y su precursor correspondiente. En este sentido, cabe asumir que las alteraciones en los niveles de acumulación detectados en plantas de melón expuestas a frío son consecuencia directa del aumento o disminución de su actividad transcripcional.

Sin embargo, los resultados expuestos en el capítulo 3 ponen de manifiesto que si bien las plantas de melón sometidas a estrés por frío exhiben una disminución significativa en la acumulación de miR319c, muestran un incremento notable en los niveles de su precursor. Este resultado, que evidencia que la acumulación diferencial del miR319c es independiente de la transcripción y/o estabilidad del pri-miR319c, permitió considerar la posibilidad de que la disminución observada en plantas de melón expuestas a bajas temperaturas pudiera ser consecuencia de alteraciones en el procesamiento de sus precursores.

Nuestros resultados ponen en evidencia que bajo condiciones ambientales adversas (exposición a frío) el procesamiento de ciertos miRNAs (miR319c en este caso) puede verse afectado. Datos de análisis de la estructura secundaria de los precursores sugiere que alteraciones en la arquitectura de pri-miR319c (influenciadas directamente por las bajas temperaturas) podrían ser las responsables de esta alteración en el procesamiento. De ser esto cierto, la estabilidad estructural del precursor estaría actuando como una especie de receptor

de las alteraciones en las condiciones ambientales (temperatura en este caso) y en función a ellas (altas o bajas) regularía positiva o negativamente la biosíntesis de un miRNA (miR319c) implicado en la regulación del proceso de adaptación a bajas temperaturas (vía TCP2-HY5 y la síntesis de antocianinas) (Figura 57).



## 8 CONCLUSIONES

1. Caracterizar la función y localización de BvCOLD1.

*BvCOLD1 se localiza en el retículo endoplásmico y está implicado en tolerancia a frío y en el transporte de ácido bórico.*

2. Generar y caracterizar líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen de forma estable *BvCOLD1*.

*Las plantas transgénicas generadas son tolerantes a frío y a otros tipos de estrés abiótico y además se identificó un fragmento conservado de la proteína que es esencial para su función.*

3. Secuenciación masiva de sRNA obtenidos de plantas de melón sometidas a bajas temperaturas.

*Se obtuvieron más de 30,000,000 de secuencias que realizando los análisis bioinformáticos pertinentes demostraron ajustarse a los parámetros de calidad.*

4. Identificación de miRNAs de melón con expresión diferencial frente a estrés.

*Del conjunto de lecturas se pudieron identificar 19,656 secuencias únicas pertenecientes a 20 familias de miRNA lo que agrupa la mayoría de los miRNA descritos en plantas.*

5. Validación de la relación funcional entre miRNA y su diana mediante identificación de residuos de RNA procesados (degradoma) y por cuantificación de los niveles de acumulación de transcritos por qRT-PCR.

*Se obtuvo una correlación negativa significativa cuando se compararon los niveles de transcrito estimados por qRT-PCR con los de los miRNAs estimados por datos de secuenciación masiva de sRNAs.*

6. Identificar secuencias diferenciales del miR319 en bibliotecas de *Cucumis melo* expuestas a situaciones de estrés.

*Se obtuvieron 13 secuencias de sRNAs con un tamaño comprendido de 20 a 22 nt homologas a miembros de las 4 familias del miR319a, b, c y d.*

7. Cuantificar la acumulación de las secuencias diferenciales.

*Se observa un aumento significativo en la acumulación de pri-miR319c en plantas de melón bajo esta condición de estrés abiótico, evidenciando que la reducción significativa en la acumulación de miR319c observada en plantas expuestas al frío no está relacionada con una disminución en la transcripción o estabilidad de su precursor*

8. Determinar el o los distintos precursores del miR319.

*Los precursores de miR319b y miR319d mostraban el patrón convencional de distribución. En los alineamientos se observó un pico extra al esperado frente a los precursores de miR319c y miR319a. Este pico extra, fue particularmente prominente en el alineamiento frente al precursor miR319c.*

9. Identificar el procesamiento del precursor de miR319.

*Los resultados indican la existencia de una correlación inversa entre el número de lecturas de miR319c y #miR319c recuperadas a partir de plantas de melón en las dos condiciones analizadas, lo que indica la existencia de un procesamiento alternativo de este miRNA inducido por frío.*

## BIBLIOGRAFÍA

1. Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Harberd NP (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131: 3357-3365.
2. Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends Plant Sci* 21:1034-1044.
3. Addo-Quaye C, Snyder JA, Park YB, Li YF, Sunkar R, Axtell MJ (2009). Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by analysis of the *Physcomitrella patens* degradome. *RNA* 15: 2112-2121.
4. Ahmad P, Hakeem KR, Kumar A, Ashraf M, Akram NA (2012). Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *Afr J Biotechnol* 11:2694-2703.
5. Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Hur Y, Nou IS (2015). Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in *Brassica rapa*. *Funct Integr Genomics* 15:383-394.
6. Akhtar M, Jaiswal A, Taj G, Jaiswal JP, Qureshi Mi, Singh NK (2012). DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Jour Gen* 91:385-395.
7. Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC (2005). MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121:207-221.
8. Allen RS, Li J, Stahle MI, Dubroué A, Gubler F, Millar AA (2007). Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *PNAS* 104:16371-16376.
9. Anderberg HI, Kjellbom P, Johanson U (2012). Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front Plant Sci* 3:33
10. Arnadóttir J, Chalfie M (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels *Annu Rev Biophys* 39:111-137.
11. Axtell MJ (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Ann Rev Plant Biol* 64:137-159.
12. Axtell MJ, Bartel, DP (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land-plants. *Plant Cell* 17:1658-1673.
13. Axtell MJ, Snyder JA, Bartel DP (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* 19:1750-1769.
14. Barabasi AL., Oltvai ZN (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat rev gen* 5:101-113.
15. Baranauské S, Mickutė M, Plotnikova A, Finke A, Venclovas Č, Klimašauskas S, Vilkaitis G (2015). Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res* 43:2802-2812.

16. Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
17. Basha E, Neill H, Vierling E (2012). Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in Biochem Sci* 37:106-117.
18. Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014). ROS as key players in plant stress signaling. *J Exp Bot* 65:1229-1240.
19. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In-planta *Agrobacterium*-mediated gene-transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 316:1194-1199.
20. Biancardi E (2005). Genetics and breeding of sugar beet, Science Publishers, Enfield, NH, USA. 367.
21. Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB (2017). Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *Int J Mol Sci* 4:18.
22. Bissoli G, Ninoles R, Fresquet S, Palombieri S, Bueso E, Rubio L, Serrano R (2012). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Jour* 70:704-716.
23. Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG, Palatnik JF (2009). A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J* 28: 3646-3656.
24. Bologna NG, Schapire AL, Palatnik JF (2012). Processing of plant microRNA precursors. *Brief Funct Genomics* 12:37-45.
25. Bologna NG, Schapire AL, Zhai J, Chorostecki U, Boisbouvier J, Meyers BC, Palatnik JF (2013). Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome Research* 23:1675–1689.
26. Borges F, Martienssen RA (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev. Mol Cell Biol* 16:727-741.
27. Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123:1279-1291.
28. Bowler C, Fluhr R (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci* 5:241-246.
29. Bracken CP, Szubert JM, Mercer TR, Dinger ME, Thomson DW, Mattick JS, Michael MZ, Goodall GJ (2011). Global analysis of the mammalian RNA degradome reveals widespread miRNA-dependent and miRNA-independent endonucleolytic cleavage. *Nucleic Acids Res* 39:5658-5668.
30. Brandenburg E (1931) Die Herz und Trockenfäule der Rüben als Bormanglerscheinung. *Phytopathologie Zeitschriften*, 3, S, 499-517.
31. Bray EA, Serres J, Weretilnyk E (2000). Responses to abiotic stresses Buchanan. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. OHIO: Rockville.
32. Brook T, Moyers PL, Morrell J, McKay K (2018). Genetic costs of domestication and improvement, *Jour Her* 109:103-116.

33. Brown P, Bellaloui N, Wimmer M, Bassil E, Ruiz J, Hu H, Romheld V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biol* 4:205-223.
34. BurdMa C, Lers A (2015). miR408 is involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 84:169-187.
35. C Maurel, J Reizer, JI Schroeder, MJ Chrispeels (1993). The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*. *EMBO J* 12:2241-2247.
36. Camacho-Cristobal J, Rexach J, Gonzalez-Fontes A (2008). Boron in plants: Deficiency and toxicity. *Jour of Integ Plant Biol* 50: 1247-1255.
37. Capiati DA, Pais SM, Tellez-Iñon MT (2006). Wounding increases salt tolerance in tomato plants: Evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signaling. *J Exp Bot* 57:2391-2400.
38. Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Elena SF (2009). Reverse-engineering of the *Arabidopsis thaliana* transcriptional network under changing environmental conditions. *Genome Biology* 10:96.
39. Catalá R, Medina J, Salinas J (2011). Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16475-16480.
40. Cava F, de Pedro M, Blas-Galindo E, Waldo G, Westblade L, Berenguer J (2008). Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures in vivo: a tool to study extreme thermophile biology. *Env Micro* 10:605-613.
41. Chaloner T, vanKan JA, Grant-Downton R (2016). RNA 'Information Warfare' in pathogenic and mutualistic interactions. *Trends Plant Sci* 9:738-748.
42. Chen H, Chen X, Chen D, Li J, Zhang Y, Wang A (2015). A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biol* 15:132.
43. Clepet C, Joobeur T, Zheng Y, Jublot D, Huang M, Truniger V, *et al.* (2011). Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* 12:252.
44. Core R (2013). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
45. Csardi G, Nepusz T (2006). The igraph software package for complex network research. *Inter Jour Complex Systems* 1695:1-9.
46. Cui J, You C, Chen X (2016). The evolution of microRNAs in plants. *Current Op Plant Biology* 35:61-67.
47. Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011). Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23:431-442.
48. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, Balint BL (2013). A versatile method to design stem-loop primer-based

- quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. PLoS ONE, 8(1) e55168.
49. Dai X, Zhao PX. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. Nucleic Acids Res. 39: W155-159.
  50. Danisman S (2016). TCP transcription factors at the interface between environmental challenges and the plant's growth responses. Front Plant Sci 7:1930.
  51. Dell B, Huang L. (1997) Physiological response of plants to low Boron. Plant and Soil 193:103-120.
  52. Dewar AM, May MJ, Woiwod IP, Haylock LA, Champion GT, Garner BH, Pidgeon JD (2003). A novel approach to the use of genetically modified herbicide tolerant crops for environmental benefit. Proceedings Biol Sci 270:335-340.
  53. Djami-Tchatchou AT, Sanan-Mishra N, Ntushelo K, Dubery IA (2017). Functional roles of microRNAs in agronomically important plants—potential as targets for crop improvement and protection. Front in Plant Sci, 8:378.
  54. Dohm JC, Minoche AE, Holtgräwe D, Capella-Gutiérrez S, Zakrzewski F, Tafer H, Himmelbauer H (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). Nature 505:546-549.
  55. Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. Proc Natl Acad Sci USA 105:9970-9975.
  56. Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S *et al* (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought high salt and cold responsive gene expression. Plant Jour 33:751-763.
  57. Duncan D (1955) Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11:1-42.
  58. Dutta A, Sen J, Deswal R (2007). Down regulation of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway by low temperature and cloning of a AP2 type C-repeat binding factor (CBF) from *Catharanthus roseus* (L). G. Don. Plant Cell Report 26:1869-1878.
  59. Evans E, Messerschmidt U (2017). Review: Sugar beets as a substitute for grain for lactating dairy cattle. Jour of Animal Sci and Biotech, 8.
  60. FAO (2009).«COMO ALIMENTAR AL MUNDO 2050.» LA AGRICULTURA MUNDIAL EN LA PERSPECTIVADEL AÑO 2050. ROMA: FAO. 2-6.
  61. Fedoroff N, Battisti D, Beachy R, Cooper P, Fischhoff D, Hodges C, Knauf V, Lobell D, Mazur B, Molden D (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century Science 327:833-834.
  62. Feuillet C, Leach JE, Rogers J, Schnable PS, Eversole K (2011). Crop genome sequencing: lessons and rationales. Trends Plant Sci. 16:77-88.
  63. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. World agricultural statistics = Statistiques agricoles mondiales =

- Estadísticas agrícolas mundiales. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
64. Fortin MG, Morrison NA, Verma DPS (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res* 15:813-824.
  65. Gao Z, He X, Zhao B, Zhou C, Liang Y, Ge R, Shen Y, Huang Z (2010). Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 51:767–775.
  66. Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, Alioto T, Capella-Gutiérrez S, Blanca J, Cañizares J, Ziarsolo P, Gonzalez-Ibeas D, Rodríguez-Moreno L, Droege M, Du L, Alvarez-Tejado M, Lorente-Galdos B, Melé M, Yang L, Weng Y, Navarro A, Marques-Bonet T, Aranda MA, Nuez F, Picó B, Gabaldón T, Roma G, Guigó R, Casacuberta JM, Arús P, Puigdomènech P (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 109:11872-11877.
  67. Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20:1425.
  68. Goldbach H, Yu Q, Wingender R, Schulz M, Wimmer M, Findeklee P, Baluska F (2001). Rapid response reactions of roots to Boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 164:173-181.
  69. Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci* 5:151.
  70. González M, Xu M, Esteras C, Roig C, Monforte AJ, Troadec C (2011). Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Res Not* 4:289.
  71. Gonzalez-Ibeas D, Blanca J, Donaire L, Saladié M, Mascarell-Creus A, Cano-Delgado A, Garcia-Mas J, Llave C, Aranda MA (2011). Analysis of the melon (*Cucumis melo*) small RNAome by high-throughput pyrosequencing. *BMC Genomics* 12:393.
  72. Goossens A, de la Fuente N, Forment J, Serrano R, Portillo F (2000). Regulation of yeast H<sup>+</sup>-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* 20:7654-7661.
  73. Griffiths-Jones S (2010). miRBase: microRNA sequences and annotation. *Current protocols in bioinformatics* 12:9.
  74. Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA (2012). In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA* 18:1116-1122.
  75. Hall J. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Jour exp bot* 53:1-11.

76. Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
77. Hanaoka H, Uruguchi S, Takano J, Tanaka M, Fujiwara T (2014). OsNIP3; 1, a rice boric acid channel, regulates Boron distribution and is essential for growth under Boron-deficient conditions. *Plant Jour* 78:890-902.
78. Hannah MA, Heyer, A., Hinch D (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 36:233-256.
79. Hao QN, Zhou XA, Sha AH, Wang C, Zhou R, Chen SL (2011). Identification of genes associated with nitrogen-use efficiency by genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes. *BMC Genomics* 12:525.
80. He Z, Zhao X, Kong F, Zuo Z, Liu X (2016). TCP2 positively regulates HY5/HYH and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 67:775-785.
81. Herranz MC, Navarro JA, Sommen E, Pallas V (2015). Comparative analysis among the small RNA populations of source, sink and conductive tissues in two different plant-virus pathosystems. *BMC Genomics* 16:117.
82. Herrin DL, Schmidt GW (1988) Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques* 6:196-200.
83. Hopkins W, Huner N (2004). *Introduction to Plant Physiology*, de John Wiley y Sons Inc. 156-180. New York. Inc.
84. Horns F, Hood ME (2012). The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecology and Evolution* 2:1705-1711.
85. Huang C, Zhou S, Hu W, Deng X, Wei S, Yang G, He G, (2014). The wheat aquaporin gene TaAQP7 confers tolerance to cold stress in transgenic tobacco. *Z Naturforsch C*, 69:142-148.
86. Jagadeeswaran G, Nimmakayala P, Zheng Y, Gowdu K, Reddy UK, Sunkar R (2012). Characterization of the small RNA component of leaves and fruits from four different cucurbit species. *BMC Genomics* 13:329.
87. Jahn TP, Moller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kühlbrandt W Schjoerring JK (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters* 574:31-36.
88. Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 54:713-725.
89. Jewel M, Campbell B, Godwin I (2010). Transgenic plants for abiotic stress resistance. *Transgenic crop plants* 67:132.
90. Ji CY, Jin R, Xu Z, Kim HS, Lee CJ, Kang L, Kwak SS (2017). Overexpression of *Arabidopsis* P3B increases heat and low temperature stress tolerance in transgenic sweetpotato. *BMC Plant Biol* 17:139.



91. Johanson U, Gustavsson S (2002). A new subfamily of Major Intrinsic Proteins in plants. *Mol Biol Evol* 19:456-461.
92. Jones-Rhoades M.W, Bartel D.P (2004). Computational identification of plant micro- RNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787-799.
93. Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Jour* 38:982-993.
94. Kadereit G, Mavrodiev E, Zacharias E, Sukhorukov A (2010). Molecular phylogeny of atripliceae (*Chenopodioideae*): Implications for systematics, biogeography, flower and fruit evolution, and the origin of C-4 photosynthesis. *Am Jour Bot* 97:1664-1687.
95. Kanhonou R, Serrano R, Ros R (2001). A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 47:571-579.
96. Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
97. Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J, Li Y (2006). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of gene for chloroplast w-3 fatty acid desaturase controlled with col inducible promoter in transgenic tobacco. *Planta* 223:1090-1100.
98. Kofalvi S, Marcos J, Cañizares MC, Pallas V, Candresse T (1997). Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from Prunus species: evidence for recombination between HSVd isolates. *Jour Gen Virol* 78:3177-3186.
99. Kosova K, Vitamvas P, Prasil I, Renaut J (2011). Plant proteome changes under abiotic stress Contribution on proteomics studies to understanding plant stress response *Jour Mol Biol* 74:1301-1322.
100. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68-D73.
101. Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA, Agard DA (2011). Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q. Rev. Biophys.* 44:229-255.
102. Kumar R (2014). Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Appl Biochem Biotech* 174:93-115.
103. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:3-25.
104. Larcher W (1995) *Physiological Plant Ecology* 3rd ed. Berlin. Berlin: Springer.

105. Larsson K, Ansell R, Eriksson P, Adler L (1993) A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 10:1101-1111.
106. Lau OS, Deng XW (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* 13:571-577.
107. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
108. Lee SH, Li HW, Koh KW, Chuang HY, Chen YR, Lin CS, Chan MT (2014). MSR7 reverses oxidation of GSTF2/3 to confer tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress. *Jour Exp Bot* 65:5049-5062.
109. Lee SH, Singh AP, Chung GC (2004). Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *J Exp Bot* 55:1733-1741.
110. Li DD, Tai FJ, Zhang ZT, Li Y, Zheng Y, Wu YF, Li XB (2009). A cotton gene encodes a tonoplast aquaporin that is involved in cell tolerance to cold stress. *Gene* 438:26-32.
111. Li G, Santoni V, Maurel C (2014). Plant aquaporins: Roles in plant physiology *Biochim Biophys Acta* 1840:1574-1583.
112. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
113. Li Y, Li C, Ding G, Jin Y (2011). Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways. *BMC Evol Biol* 11:122.
114. Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*, *RNA* 14:836-843.
115. Liu Y, Wang K, Li D, Yan J, Zhang W (2017). Enhanced Cold Tolerance and Tillering in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) by heterologous expression of Osa-miR393a. *Plant Cell Phys* 58:2226-2240.
116. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25:402-408.
117. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297:2053-2056.
118. Love MI, Huber W, Anders S (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq-2. *Genome Biol* 15:550.
119. Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Xu XY, Su YH, McGrath SP, Zhao FJ (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *PNAS* 105:9931-9935.

120. Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P, Kienle MG (2006). Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics* 6:5637-5649.
121. Martin M (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17:10-12.
122. Matsui A, Nguyen A, Nakaminami K, Seki M (2013). Arabidopsis Non-Coding RNA Regulation in Abiotic Stress Responses. *Int J Mol Sci*, 14:22642-22654.
123. Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015). Aquaporins in plants. *Physiol Rev* 95:1321-1358.
124. Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595-624.
125. Meng Y, Shao C, Wang H, Chen M (2011). The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiol* 157:1583-1595.
126. Axtell MJ (2013). Classification and comparison of small RNAs from Plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:137-159.
127. Mignolet L, Spruyt E, Xu N, Idänheimo FA, Hoeberichts FA, Mühlenbock P, Brosché M, Van Breusegem F, Kangasjärvi J (2016). Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *J. Exp. Bot* 67:3831-3844.
128. Mishra AK, Agarwal S, Jain CK, Rani V (2009). High GC content: critical parameter for predicting stress regulated miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 4:151-154.
129. Mittler R (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combinations. *Trends in Plant Sci* 11:15-19.
130. Miwa K., Tanaka M, Kamiya T, Fujiwara T (2010). Molecular mechanisms of Boron transport in plants: involvement of Arabidopsis NIP5; 1 and NIP6; 1. *Adv Exp Med Biol*, 679: 83-96.
131. Moliterni V, Paris R, Onofri C, Orrù L, Cattivelli L, Pacifico D, Mandolino G (2015). Early transcriptional changes in *Beta vulgaris* in response to low temperature. *Planta* 242:187-201.
132. Montesinos C, Gaxiola R, Rios G, Forment J, Leube M, Serrano R (2003). Functional genomics of salt tolerance: the yeast overexpression approach. *International Symposium on Managing Greenhouse Crops in Saline Environment*. 31-38.
133. Mukherji S, Ebert M, Zheng G, Tsang J, Sharp P (2011). MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nature Genet* 43:854-859.
134. Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H, Rosen BP (2014). Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochim Biophys Acta* 1840:1583-1591.
135. Mulet J, Alemany B, Ros R, Calvete J, y Serrano R (2004). Expression of a plant serine O-acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers

- osmotic tolerance and creates an alternative pathway for cysteine biosynthesis. *Yeast* 21:303-312.
136. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279–289.
  137. Navarro M, Marque G, Ajax C, Keller G, Borges JP, Marque C, Teulieres C (2009). Complementary regulation of four eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Environ Exp Bot.* 60:2713-2724.
  138. Negrão S, Schmöckel SM, Tester M (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann Bot* 119:1-11.
  139. Niu D, Wang Z, Wang S, Qiao L, Zhao H (2015). Profiling of small RNAs involved in plant-pathogen interactions. *Methods Mol Biol* 1287:61-79.
  140. Noguchi K, Yasumori M, Imai T, Naito S, Matsunaga T, Oda H, Fujiwara T (1997), bor1-1 an *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of Boron. *Plant Physiol* 115:901-906.
  141. Nolan T, Chen J, Yin Y (2017). Cross talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses. *Biochem* 474:2641-2661.
  142. Nozawa A, Takano J, Kobayashi M, von Wirén N, y Fujiwara T (2006). Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in Boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 262:216-222.
  143. Nuñez-Paleniús HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Grumet R, Lester G, Cantliffe DJ (2008). Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Rev Biotechnol* 28:13-55.
  144. Oyama T, Shimura Y, Okada K (1997). The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* 11:2983-2995.
  145. Palatnik J, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425:257-263.
  146. Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, Carrington JC, Weigel D (2007). Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Dev Cell* 13:115-125.
  147. Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer S. E, Ray A, Winden J, Matzke M, Matzke AJ (2003). Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Phys* 132:1382-1390.
  148. Peiro A, Izquierdo A.C, Sanchez J.A, Pallas V, Mulet J.M, Aparicio F (2014). Patellins 3 and 6, two members of the Plant Patellin family, interact with the movement protein of Alfalfa mosaic virus and interfere with viral movement. *Plant Pathol* 15:881-891.
  149. Penfield S (2008). Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol* 179:615-628.

150. Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R (2007). Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 226:729-740.
151. Perea C, Rodríguez MA, Iniesto E, Rubio V, Salinas J (2017). Prefoldins negatively regulate cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* by promoting nuclear proteasome-mediated HY5 Degradation. *Mol Plant* 10:791-804.
152. Pierre J, Heribert H, Abdelhafid B (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotech* 15:405-414.
153. Pink S, Vogel S (2014). D3NETWORK: Stata module to create network visualizations using D3. js <http://EconPapers.repec.org/RePEc:boc:bocode:s457844>.
154. Pireyre M, Burow M (2015). Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level. *Mol Plant*. 8:378-388.
155. Porcel R, Aroca R, Azcón R, Ruiz J.M (2006). PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Mol Biol* 60:389-404.
156. Porcel R, Bustamante A, Ros R, Serrano R, Mulet JM (2018). BvCOLD1: A novel aquaporin from sugar beet (*Beta vulgaris L.*) involved in Boron homeostasis and abiotic stress. *Plant Cell Environ.* (in press). doi: 10.1111/pce.13416.
157. Quinlan A, Hall I (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26:841-842.
158. Ramanjulu S, Viswanathan C, Jianhua Z, Jian-Kang Z (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Plant Sci* 12:301-309.
159. Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bonnie B, Bartel DP (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616-1626.
160. Reis RS, Eamens AL, Waterhouse PM (2015). Missing pieces in the puzzle of plant microRNAs. *Trends Plant Sci* 20:721-728.
161. Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C, Yu B (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *PNAS* 109:12817-12821.
162. Robinson MD, Oshlack A (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Bio* 11:3-25.
163. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140.
164. Rodriguez M, Bravo J, Sasaki F, Severino F, Maia I (2013). The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. *Plant Sci* 213:106-113.

165. Rodríguez M, Romero MC, Pazmiño DM, Testillano PS, Risueño MC, Sandalio LM (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Phys* 150:229-243.
166. Rogers K, Chen X (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* 25:2383-2399.
167. Roig C, Fita A, Ríos G, Hammond J, Nuez F, Picó B (2012). Root transcriptional responses of two melon genotypes with contrasting resistance to *Monosporascus cannonballus* (Pollack et Uecker) infection. *BMC Genomics*, 13:601-615.
168. Rozema J, Debruijn J, Broekman R (1992) Effect of Boron on the growth and mineral economy of some halophytes and non-halophytes. *New Phyt* 121:249-256.
169. Rymarquis LA, Kastenmayer JP, Huttenhofer AG, Green PJ (2008). Diamonds in the rough: mRNA-like non-coding RNAs *Trends Plant Sci* 13:329-334.
170. Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 46:1568-1577.
171. Sambrook J, Russell D.W (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 25-45
172. Santner A, Calderon LI, Estelle M (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat Chem Biol* 5:301-307.
173. Sattar S, Addo-Quaye C, Song Y, Anstead JA, Sunkar R, Thompson GA (2012). Expression of small RNA in *Aphis gossypii* and its potential role in the resistance interaction with melon. *PLoS One* 7:48579.
174. Sattar S, Song Y, Anstead J, Sunkar R, Thompson G (2012). *Cucumis melo* expression profile during aphid herbivory in a resistant and susceptible interaction. *MPMI*, 25:839-848.
175. Saud S, Chen Y, Baowen L, Fahad S, Arooj S (2013). The different impact on the growth of cool season turf grass under the various conditions on salinity and drought stress. *JFAE* 3:77-84.
176. Savageau MA (1998). Demand theory of gene regulation. I. Quantitative development of the theory. *Genetics* 149:1665-1676.
177. Sayle RA, Milner-White EJ, (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* 20:374.
178. Schulz E, Tohge T, Zuther E, Fernie AR, Hinch DK (2015). Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Cell Environ* 38:1658-1672.
179. Shao H, Wang H, Tang X (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front Plant Sci* 6:902.

180. Shekhawat UK, Ganapathi TR (2013). Overexpression of a native plasma membrane aquaporin for development of abiotic stress tolerance in banana. *Plant Biotechnol* 11:942-952.
181. Shi Y, Ding Y, Yang S (2015). Cold signal transduction and its interplay with phytohormones during cold acclimation. *Plant Cell Physiol* 56:7-15.
182. Shorrocks VM (1997). The occurrence and correction of Boron deficiency. *Plant Soil* 193:121-148.
183. Shriram V, Kumar V, Devarumath RM, Khare TS, Wani SH (2016). MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Front Plant Sci* 7:817.
184. Silva J, Williams R (2001). *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life.* (2nd ed.). University Press, Oxford.
185. Sobkowiak L, Karlowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z (2012). Non-canonical processing of arabidopsis pri-miR319a/b/c generates additional microRNAs to target one RAP2.12 mRNA isoform. *Front Plant Sci* 3:46.
186. Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P (2006). Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in arabidopsis. *Plant Physiol* 140:637-646.
187. Song L, Axtell MJ, Fedoroff NV (2010). RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in Arabidopsis. *Curr Biol* 20:37-41
188. Soto G, Alleva K, Mazzella M.A, Amodeo G, Muschietti J.P, (2008). AtTIP3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS* 582:4077-4082.
189. Sreedharan S, Shekhawat U.K, Ganapathi T.R (2015). Constitutive and stress-inducible overexpression of a native aquaporin gene (*MusaPIP2; 6*) in transgenic banana plants signals its pivotal role in salt tolerance. *Plant Mol Biol* 88:41-52.
190. Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *PNAS* 94:1035-1040.
191. Su Y, Liang W, Liu Z, Wang Y, Zhao Y, Ijaz B y Hua J (2017). Overexpression of *GhDof1* improved salt and cold tolerance and seed oil content in *Gossypium hirsutum*. *Plant Pathol* 218:222-234.
192. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JH (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12:301-309.
193. Sunkar R, Li YF, Jagadeeswaran G (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci* 17:196-203.
194. Sunkar R, Zhu J (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001-2019.

195. Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Fujiwara T (2002). Arabidopsis Boron transporter for xylem loading. *Nature* 420:337-340.
196. Tambussi EA (2004). Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
197. Tanaka M, Fujiwara T (2008). Physiological roles and transport mechanisms of Boron: perspectives from plants. *J Physiol*, 456:671-677.
198. Tanaka M, Wallace IS, Takano J, Roberts DM, Fujiwara T (2008). NIP6;1 is a boric acid channel for preferential transport of Boron to growing shoot tissues in Arabidopsis. *Plant Cell* 20:2860-2875.
199. Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Di Pietro A, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res* 43:140.
200. Tardieu F, Tuberosa R (2010). Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 13:206-212.
201. Thiebaut F, Rojas C, Almeida K, Grativol C, Domiciano G, Lamb C, Engler Jde A, Hemery A, Ferreira P (2012). Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant Cell Environ* 35:502-512.
202. Tingting Du Zamore P (2005). Micro Primer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132:4645-4653.
203. Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, Weigel D (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 6:100-103.
204. Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439:688-694.
205. Uruguchi S, Kato Y, Hanaoka H, Miwa K y Fujiwara T (2014). Generation of Boron deficiency tolerant tomato by overexpressing an *Arabidopsis thaliana* borate transporter AtBOR1. *Front Plant Sci* 5:125.
206. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens, RP (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3:12.
207. Vicent I, Navarro A, Mulet J.M, Sharma S, Serrano R (2015). Uptake of inorganic phosphate is a limiting factor for *Saccharomyces cerevisiae* during growth at low temperatures. *FEMS Yeast Res* 15(3). pii: fov008. doi: 10.1093/femsyr/fov008.
208. Villarías J (1999). Compendio práctico del cultivo de la remolacha azucarera. Ediciones Agrotécnicas, S.L. Madrid.
209. Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Plant Sci* 12:444-451.
210. Wallis J.W, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* 58:409-419.



211. Wang ST, Sun XL, Hoshino Y, Yu Y, Jia B, Sun ZW, Sun MZ, Duan XB, Zhu YM (2014). MicroRNA319 positively regulates cold tolerance by targeting OsPCF6 and OsTCP21 in rice (*Oryza sativa*). PLoS One 9:91357.
212. Wang W, Vinocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.
213. Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004). Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9:244-252.
214. Wei S, Wang L, Zhang Y, Huang D (2013). Identification of early response genes to salt stress in roots of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings. *Mol Biol Rep*, 40:2915-2926.
215. Wieland W.H, Lammers A, Schots A, Orzáez D.V (2006). Plant expression of chicken secretory antibodies derived from combinatorial libraries. *J Biotech* 122:382-391.
216. Wilfried M, Poppenberger R (2016). Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cell Mol Life Sci* 73:797-810.
217. Wimmer M, Eichert T (2013). Review: Mechanisms for Boron deficiency-mediated changes in plant water relations. *Plant Sci*, 203:25-32.
218. Witte C.P, Noël L.D, Gielbert J, Parker J.E, Romeis T (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Bio* 55:135-147.
219. Wudick MM, Luu DT, Maurel C (2009). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins, *New Phytol*. 184:289-302.
220. Xie M, Zhang S, Yu B (2015). microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell Mol Life Sci*, 72:87-99.
221. Yang W, Liu X.D, Chi X.J, Wu C.A, Li Y.Z, Song L (2011). Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta* 233:219-229.
222. Yu X, Peng Y, Zhang M, Shao Y, Su W, Tang Z (2006). Water relations and expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Research* 16:599-608.
223. Yuan D, Li W, Hua Y, King G.J, Xu F y Shi L (2017). Genome-Wide Identification and Characterization of the Aquaporin Gene Family and Transcriptional Responses to Boron Deficiency in *Brassica napus*. *Front Plant Sci* 8:1336.
224. Yujie F, Lizhong X (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci* 72:673-689.

225. Zabed H, Faruq G, Sahu J, Azirun M, Hashim R, Boyce A (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *Scientific World*. 12:345-357.
226. Zangi R, Filella M (2012). Transport routes of metalloids into and out of the cell: A review of the current knowledge. *Chem Biol Interact* 197:47-57.
227. Zarattini M, Forlani G (2017). Toward unveiling the mechanisms for transcriptional regulation of proline biosynthesis in the plant cell response to biotic and abiotic stress conditions. *Front Plant Sci* 2:927.
228. Zhang Q, Chen H, He M, Zhao Z, Cai H, Ding G, Xu F (2017). The Boron transporter *BnaC4.BOR1;1c* is critical for inflorescence development and fertility under Boron limitation in *Brassica napus*. *Plant Cell Environ* 40:1819-1833.
229. Zhang S, Liu Y, Yu B (2015). New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *WIREs RNA* 6:533-545
230. Zhang T, Zhao YL, Zhao JH, Wang S, Jin Y, Chen ZQ, Fang YY, Hua CL, Ding SW, Guo HS (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants* 2:16153.
231. Zhang W, Gao S, Zhou X, Xia J, Chellappan P, Zhou X, Zhang X, Jin H (2010). Multiple distinct small RNAs originate from the same microRNA precursors. *Genome Biol* 11:81.
232. Zhang Y, Ali Z, Wang C, Xu L, Yi J, Xu Z, Liu X, He X, Huang Y, Khan I, Trethowan R, Ma H (2013). Genome wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS ONE* 8:56312.
233. Zhang B. (2015). MicroRNAs: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot* 66:1749-1761.
234. Zhu JK (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167:313-324.
235. Zunaira T, Howton Y, Shahid M (2016). The roles of aquaporins in plant stress responses. *Dev Biol* 4:1-22.

