



Valencia, curso 2015-2016

# Caracterización de miRNAs asociados a la respuesta a estrés por sequía en plantas de melón

**Pablo Estévez Gallardo**

## DIRECTORES

**Dra. M<sup>ª</sup> Carmen Marqués Romero**

**Dr. Gustavo Germán Gómez**

## TUTOR

**Dr. José Miguel Mulet Salort**

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría hacer constar mi gratitud hacia aquellos sin los que este trabajo no hubiera sido posible. En primer lugar agradecer a mis directores, el doctor Gustavo Germán Gómez y la doctora M<sup>a</sup> Carmen Marqués Romero, por ser mis guías en este viaje que comenzó con los experimentos en el laboratorio y termina ahora recogido en este escrito. Tampoco me olvido del resto del grupo de trabajo, ya que sin el mutuo apoyo y los debates sobre el tema del trabajo, probablemente esta experiencia no hubiera sido la misma. Mención especial entre mis compañeros, a la labor de los bioinformáticos, sin la cual nada de esto sería posible, en términos de la metáfora anteriormente planteada, ellos fueron los responsables de la construcción del medio de transporte.

Por otra parte también he de agradecer a mis padres, por la oportunidad que, con su esfuerzo, me han dado para haber llegado hasta este punto.

# ÍNDICE

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b><u>RESUMEN</u></b>                                                             | <b>3</b>  |
| <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>                                                        | <b>4</b>  |
| - La respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico                       | 4         |
| - El melón                                                                        | 7         |
| - Los RNAs no-codificantes                                                        | 8         |
| <b><u>OBJETIVOS</u></b>                                                           | <b>13</b> |
| <b><u>MATERIAL y MÉTODOS</u></b>                                                  | <b>14</b> |
| - Preparación del material vegetal                                                | 14        |
| - Tratamiento de estrés                                                           | 15        |
| - Obtención de las muestras                                                       | 15        |
| - Extracción de RNA                                                               | 15        |
| - Secuenciación                                                                   | 16        |
| - Procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación                      | 17        |
| - Validaciones biológicas                                                         | 18        |
| - Análisis estadístico de los resultados                                          | 20        |
| <b><u>RESULTADOS y DISCUSIÓN</u></b>                                              | <b>21</b> |
| - Diseño experimental, análisis fenotípico y toma de muestras                     | 21        |
| - Análisis de lecturas de secuenciación de sRNAs                                  | 22        |
| - Expresión diferencial de sRNAs y predicción de dianas de miRNAs para validación | 26        |
| - Validación biológica de los resultados                                          | 29        |
| - <u>miR171 y su diana, CNG Channel 1-like</u>                                    | 29        |
| - <u>miR168 y su diana, CA2</u>                                                   | 31        |
| - <u>miR160 y su diana, ARF17</u>                                                 | 32        |
| - <u>miR397 y su diana, LACASSE-11</u>                                            | 33        |
| <b><u>CONCLUSIONES</u></b>                                                        | <b>35</b> |
| <b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>                                                        | <b>36</b> |
| <b><u>FIGURAS SUPLEMENTARIAS</u></b>                                              | <b>42</b> |

## **RESUMEN**

Frente al enfoque reduccionista y de organismos modelo de los estudios clásicos, en este trabajo se plantea una primera aproximación a un estudio holístico a nivel de silenciamiento génico por sRNAs de la respuesta a sequía en una planta de interés agrícola, el melón. De esta manera, a partir del procesado informático de los datos de secuenciación, se estudiaron los perfiles de abundancia y diversidad en la expresión de sRNAs y se predijeron los posibles miRNAs con expresión diferencial, así como sus respectivas dianas de mRNA para posteriormente validar biológicamente, por RT-PCR, el sistema de predicción bioinformático. A falta de más pruebas que lo confirmen definitivamente, los resultados confieren una fiabilidad considerable a las predicciones realizadas por este sistema.

## **INTRODUCCIÓN**

Las plantas, debido a su naturaleza sésil, se encuentran sometidas a un medio ambiente fluctuante del cual no pueden huir. Es por ello por lo que habitualmente sufren condiciones más o menos desfavorables para su desarrollo (por ejemplo: escasez de agua, nutrientes y/o luz; temperaturas no óptimas; ataques de insectos, virus u otros organismos, etc.), y para sobrevivir han tenido que desarrollar estrategias de protección molecular (como los osmolitos compatibles, la regulación molecular de la apertura y cierre estomáticos, la síntesis de toxinas, etc.) (Zhu, 2002). A estas condiciones desfavorables para las plantas se les denominan estreses y se clasifican en dos grupos en función de la naturaleza del factor que los causa: estreses bióticos y estreses abióticos. Los estreses bióticos son aquellos causados por otros organismos, ya sean nematodos, insectos, hongos, bacterias, virus o viroides (a pesar de que no existe consenso sobre si estos dos últimos han de considerarse seres vivos, se incluyen en este grupo). Se consideran estreses abióticos (sequía, salinidad, frío, calor, etc.) aquellos que son provocados por factores ambientales carentes de vida (escasez de agua, exceso de sales, temperaturas extremas, etc.) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Cramer *et al.*, 2011).

### **La respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico**

De entre los estreses abióticos más comunes, la sequía que sufren determinadas regiones de la Tierra limita seriamente la producción agraria y el abastecimiento de la población que reside en ellas (FAOLAND & WATER, 2013).

En las plantas el agua circula a favor del gradiente de potencial hídrico, es decir, la planta sólo es capaz de captar agua si el potencial hídrico de sus raíces es menor que el del suelo, lo cual dependerá tanto de la cantidad de agua como de otros factores que determinan su disponibilidad, como la concentración de solutos, las fuerzas matriciales (p.e. capilaridad y tensión superficial), la presión, la gravedad, etc. Así, en las plantas el estrés por déficit hídrico se produce cuando no hay agua disponible para ser captada por la planta, es decir, cuando el potencial hídrico del suelo es demasiado bajo, lo que por lo general responde a causas climáticas (elevadas temperaturas y escasas precipitaciones) (Taiz y Zeiger, 2006). Este problema, que causa pérdidas millonarias en la agricultura, se ha tratado de solventar tradicionalmente mediante el riego (el 70% del agua dulce mundial extraída se consume para riego agrícola según el informe de FAO, 2013), pero esto

conduce a medio-largo plazo a otro problema aún mayor, la salinización del suelo, lo que hace necesaria una mejor comprensión de la respuesta de las plantas a la sequía en busca de una solución biotecnológica que permita la mejora de las plantas de interés agrícola.

A lo largo de los millones de años de su evolución, las plantas han desarrollado múltiples estrategias en respuesta a las cambiantes condiciones ambientales causantes de estrés, entre ellas la sequía. Estas estrategias de respuesta a sequía han sido ampliamente estudiadas y clasificadas según el tipo de mecanismo en: morfológicas, fisiológicas y moleculares (Levitt, 1972; Turner, 1986).

Las estrategias morfológicas, han sido tradicionalmente clasificadas en función de la naturaleza de su acción en: escape, evasión y flexibilidad fenotípica. Las estrategias morfológicas de escape están, por lo general, asociadas a aquellas plantas que viven en ambientes áridos y se basan en el establecimiento de ciclos vitales breves, con un florecimiento rápido en los períodos de mayor disponibilidad hídrica (Maroco *et al.*, 2000; Araus *et al.*, 2002). Las estrategias de evasión se diferencian de las anteriores en que las plantas completan su ciclo vital en condiciones desfavorables evitando perder agua por transpiración (por reducción de la superficie foliar expuesta a intercambio gaseoso y absorción directa de luz) y tratando de captar la máxima posible (proliferación radicular), es decir, aumentando la proporción raíces/parte aérea (Larcher, 2000; Kavar *et al.*, 2007). Morfológicamente hablando, las estrategias de evasión y de plasticidad fenotípica son muy similares, la diferencia estriba en que en estas últimas los cambios se producen a nivel molecular y son reversibles, como en los procesos de aclimatación, mientras que las primeras se corresponderían con procesos de adaptación (Farooq *et al.*, 2009).

Las estrategias fisiológicas de respuesta a sequía son múltiples y se pueden clasificar según su objetivo. Un ejemplo de ello son los mecanismos para la conservación de agua en los tejidos, que habitualmente se relacionan con el ajuste osmótico (a mayor concentración de solutos, menor potencial osmótico y por tanto menor potencial hídrico, lo que induce la entrada de agua a la célula). Esto tiene gran relevancia en el correcto funcionamiento fisiológico de la planta, tanto por la necesidad del agua como por la importancia de mantener la turgencia, así el ajuste osmótico que la planta realiza para ello lo hace mediante los denominados osmolitos compatibles (pequeñas moléculas producidas por la planta que pueden acumularse en el citoplasma con este fin sin causar toxicidad), siendo un ejemplo conocido por su abundancia la prolina (Wahid y Close, 2007). Además, se ha comprobado que los osmolitos compatibles cumplen otra función simultáneamente, la de proteger las proteínas que en condiciones de baja hidratación se vuelven susceptibles de ser

degradadas (Samuel *et al.*, 2000; Hamilton y Heckathorn, 2001). La preservación de la estabilidad de la membrana celular es también muy relevante, y para ello intervienen moléculas como sorbitol, manitol, prolina y trehalosa entre otros (Hoekstra *et al.*, 2001).

Otra estrategia fisiológica consiste en la protección contra el daño oxidativo que se produce en situaciones de estrés, incluyendo la sequía (Smirnoff, 1993). Para ello las plantas disponen de mecanismos tanto enzimáticos (peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, etc.) como no-enzimáticos (Gong *et al.*, 2005), aunque los primeros son los más efectivos (Farooq *et al.*, 2008).

Por último, ya que muchas de las respuestas a estrés por sequía conllevan una reducción del crecimiento, una estrategia fisiológica de regulación de fitohormonas vinculadas al crecimiento es fundamental. De este modo, la cantidad endógena de ácido abscísico (ABA) y etileno aumenta, pues son inhibidores del crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006), mientras que el contenido de auxinas, citoquininas y giberelinas disminuye (Nilsen y Orcutte, 1996). De todas ellas cabe destacar el papel de la acumulación de ABA, que abarca desde la inducción del cierre estomático (Turner *et al.*, 2001) hasta la regulación de la expresión de genes en respuesta a sequía (Bray, 1997).

Finalmente, las estrategias de nivel molecular son aquellas correspondientes a la acción de proteínas que intervienen en algunos de los procesos de respuesta ya explicados, entre otros, y también a la regulación de su expresión génica. Algunas de las proteínas de respuesta a estrés por déficit hídrico más relevantes son las dehidrinas y las chaperonas, que protegen a otras proteínas de ser desnaturalizadas y degradadas como consecuencia del estrés (Gorantla *et al.*, 2007). La actividad de estas proteínas, entre otras, depende de la percepción por la planta del estrés hídrico, que viene mediada por múltiples señales químicas basadas en variaciones de las concentraciones de calcio, fitohormonas, especies reactivas de oxígeno, etc., y de la transducción de la señal para regular la expresión de genes, a través de rutas como por ejemplo las cascadas de MAPKs (Chen *et al.*, 2002).

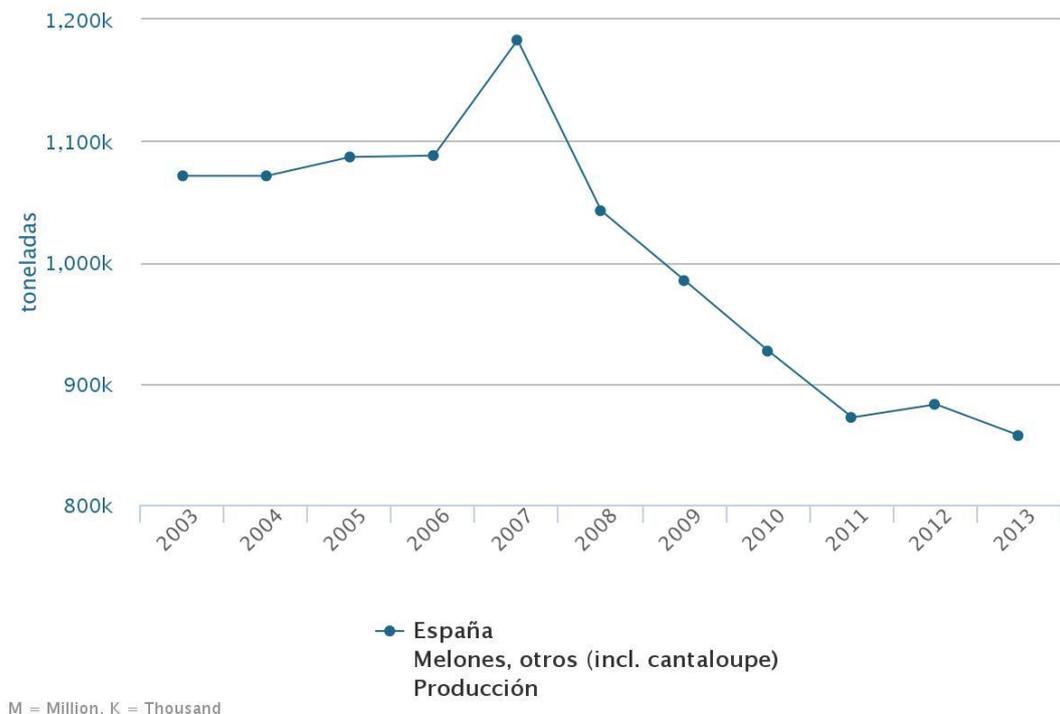
Es mucho lo que se ha avanzado en la comprensión de las respuestas de las plantas sometidas a estrés hídrico en las últimas décadas, aunque la mayor parte de los estudios se centran en plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*. Quizá esta sea una de las causas por las cuales en la práctica apenas se hayan desarrollado variedades de interés comercial tolerantes a sequía y que el rendimiento de las pocas existentes tampoco sea muy elevado, como es el caso del maíz Genuity DroughtGard Hybrids de Monsanto. Aunque otra posible razón es que el problema haya resultado

ser más complejo de lo que se creía, y los enfoques realizados hasta ahora, al centrarse en el análisis de un único estrés, la sequía (cuando en la naturaleza suelen acompañarle el calor y la salinidad) y con genes individuales, quizás han sido demasiado reduccionistas y sea necesario uno más holístico, más propio de la biología de sistemas, que permita identificar las propiedades emergentes de sistemas complejos como son las redes de regulación de la respuesta a estrés, así como sus nodos centrales (Chawla *et al.*, 2011; Cramer *et al.*, 2011).

## **El melón**

Una de las plantas de interés agronómico susceptible de ser mejorada genéticamente para incrementar su tolerancia a la sequía es el melón.

El melón (*Cucumis melo* L.) es un cultivo de secano y por lo tanto puede sufrir períodos de sequía prolongada, de hecho las regiones de España donde se concentra su producción (Castilla la Mancha, Murcia y Comunidad Valenciana) son algunas de las Autonomías con menores precipitaciones anuales. Este cultivo posee un gran interés agrícola para España dado que es el principal productor y exportador europeo de esta fruta, contribuyendo con un 47% de la producción europea (Fig. 1). Tal es así que la tendencia a la baja de la producción española determina en gran medida la europea (Fig. S1). Según datos más recientes del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España produjo en 2014 un total de 750.151 toneladas, dato que reafirma la tendencia a una disminución en la producción de melón español, dadas las 857.000 toneladas del 2013. Asimismo, el productor más importante del mundo es China y al igual que España marca la pauta europea, éste determina la mundial (Fig. S2), ya que supone aproximadamente el 50% del total (datos obtenidos de la aplicación FAOSTAT - <http://faostat3.fao.org/compare/S>).



**Fig. 1:** Representación de la producción de melón en España (toneladas) entre 2003 y 2013. Tomada de FAOSTAT.

La secuenciación de su genoma por parte del consorcio español Melonomics (García Mas *et al.*, 2012) lo convierte en un buen candidato en el que estudiar mecanismos moleculares de la respuesta a estrés hídrico a la vez que permite emplear técnicas biotecnológicas de mejora directamente aplicables a la producción agrícola.

### Los RNAs no codificantes

Tras el descubrimiento de los pequeños RNAs de interferencia (Fire *et al.*, 1998) se ha avanzado mucho en el estudio de estrategias moleculares de regulación génica en condiciones de estrés diferentes de las clásicas (detalladas en el apartado 1.2). Sólo en fechas recientes podemos encontrar referencias a la función que ejercen los pequeños RNAs no codificantes (sRNAs) en la regulación de genes de respuesta a sequía (Zhou *et al.*, 2010; Eldem *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2012; Ferdous *et al.*, 2015), y ninguna de ellas en melón. Para esta especie apenas podemos encontrar estudios de estas características, todos ellos en respuesta frente a estreses bióticos, la alimentación de un áfido (Sattar *et al.*, 2012) y la infección por virus (González-Ibeas *et al.*, 2011; Herranz *et al.*, 2015).

Los RNAs no-codificantes (ncRNAs) se definen como RNAs que no son traducidos en proteínas y constituyen un conjunto muy amplio y diverso funcionalmente, pues abarcan aquellos involucrados

en la traducción (ribosomales –rRNAs– y transferentes –tRNAs–); los que intervienen en el procesamiento de RNA (pequeños RNAs nucleares y nucleolares –snRNA, snoRNA–); así como los implicados en la regulación de la expresión génica (de interferencia –siRNAs– y micro RNAs –miRNAs–), entre otros. Los miRNAs y siRNAs (incluidas sus variantes como: tasiRNAs y NATsiRNAs) forman el grupo que podemos denominar como RNA de interferencia (RNAi), debido a que su función es la de inhibir la expresión génica, actuando por lo general a nivel de mRNA, principalmente causando la degradación de éste e impidiendo así que llegue a traducirse en proteína (Mattick y Makunin, 2006; Sunkar *et al.*, 2007).

De entre todos estos tipos de ncRNAs, en este estudio se han secuenciado los de pequeño tamaño (sRNAs), y de entre ellos se han elegido los miRNAs para realizar una primera validación biológica del sistema de predicción bioinformático empleado, debido a su mayor grado de conocimiento y a la sencillez con la que se puede comprobar si ejercen su función como se predice, dada la posibilidad de medir las variaciones en los niveles de sus mRNAs diana correspondientes. Como la validación es el principal objetivo de este trabajo, a continuación se definirán los miRNAs, su biogénesis y sus mecanismos de acción y regulación.

Los miRNAs son RNAs de pequeño tamaño (por lo general de 21 a 24 nucleótidos) cuya función es de interferencia o silenciamiento génico, es decir, inhiben la expresión de genes, ya sea post-transcripcionalmente, induciendo la degradación del mRNA (el cual adquiere el apelativo de “diana”); traducionalmente, impidiendo que se inicie el proceso de traducción en proteína, o incluso transcripcionalmente por metilación del DNA.

La síntesis de los miRNA (Fig. S3) comienza con la transcripción de los llamados genes *MIR*, que se concentran especialmente en regiones intergénicas del genoma y, al igual que el resto de genes, la mayoría de éstos tienen su propia unidad de transcripción (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). La transcripción es mediada por la RNA polimerasa II (Pol II), que es reclutada por un complejo denominado Mediator (Kim *et al.*, 2011), dando lugar a una forma inmadura, previa al miRNA, llamada pri-miRNA. Además, se ha descrito que algunos estreses pueden alterar la transcripción de algunos genes *MIR*, generando variaciones en los niveles de miRNA (Liang *et al.*, 2012).

Posteriormente los pri-miRNAs son procesados por endonucleasas de la familia DCL RNasa III dando lugar a RNAs cortos de doble cadena (dsRNAs), sufriendo la estructura “stem-loop” una primera escisión que da lugar a una forma intermedia, precursora del miRNA maduro, el pre-

miRNA (Margis *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2010). A continuación, pueden suceder nuevas escisiones en intervalos de aproximadamente 21 nucleótidos (Liu *et al.*, 2012).

La longitud de los miRNAs depende de la enzima DCL que intervenga; de manera que DCL1 y DCL4 dan lugar a miRNAs de 21 nucleótidos, DCL2 de 22, y DCL3 de 24 (Chen *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2010). De este modo, el hecho de que DCL1 sea la responsable de la biosíntesis de la mayoría de los miRNAs de plantas explica por qué el tamaño predominante es de 21 nucleótidos (Reinhart *et al.*, 2002). Además, el proceso puede volverse más complejo si más de una DCL interviene secuencialmente en el procesado del pri-miRNA (Wu *et al.*, 2010). Destaca también el estudio de Vázquez y colaboradores (2008), quienes sugieren que la jerarquía funcional de las DCL y la variación de su expresión en función del tejido ejercen un papel clave en el control de la acumulación y actividad de los miRNAs.

El tamaño de los sRNAs es muy importante ya que según cuál sea éste puede variar su función, así por ejemplo los de 22 nucleótidos pueden generar siRNAs a partir del mRNA diana (Chen *et al.*, 2010; Cuperus *et al.*, 2010), mientras que los de 24 están implicados en la regulación de la metilación (Wu *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2014).

Por otra parte, cabe destacar que las DCL no son las únicas proteínas implicadas en este proceso. La proteína HYL1/DRB1 (*Hyponastic Leaves 1*) con dominio de unión a dsRNA, la proteína con dedos de zinc SE (*Serrate*), y la proteína TGH (*Tough*) con dominio G-patch, son necesarias para el procesamiento del pri-miRNA y la acumulación de miRNAs (Kurihara *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2012). Es sabido que TGH mejora la actividad de DCL1 en el procesamiento del pri-miRNA, mientras que SE y HYL1 mejoran la precisión de dicho procesamiento (Kurihara *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2012).

Expuesta ya la biogénesis de los miRNAs maduros, es necesario explicar cómo actúan éstos en el silenciamiento génico (Fig. S4). En primer lugar, es importante destacar que el miRNA maduro es de doble cadena, denominándose una “acompañante” y la otra “guía” (el dúplex miRNA/miRNA\*), y es esta última la que es reconocida por una endonucleasa de la familia AGO (*Argonaut*) que junto con otras forman el complejo catalítico RISC. Según se ha comprobado, el desensamblaje del dúplex miRNA/miRNA\*, necesario para la formación de dicho complejo, no depende de la actividad endonucleasa de AGO1, sin embargo, otras proteínas como HSP90 (*Heat Shock Protein*

90) y SQN (*Squint*) podrían intervenir en la eliminación de la hebra acompañante (Iki *et al.*, 2010; Iki *et al.*, 2012).

La familia de proteínas *Argonaut* suele contener muchos miembros (en *Arabidopsis* la familia se compone de 10 AGO diferentes; Mourrain *et al.*, 2000). El factor que determina a qué AGO se une la hebra guía es el nucleótido del extremo 5' (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008), que en la mayoría de casos es una uridina, la cual se relaciona con AGO1, motivo por el cual es a ésta a la que se asocian más frecuentemente, aunque lógicamente pueden unirse a otras AGO (Mi *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Se especula que otros factores, como por ejemplo variaciones en los niveles de expresión de las proteínas AGO en distintos tejidos de la planta puedan ser decisivos a la hora de establecer esta asociación (Thieme *et al.*, 2012).

El extremo 3' es también importante, pues la 2'-O-metilación mediada por la metiltransferasa HEN1 estabiliza el dúplex miRNA/miRNA\* (Abe *et al.*, 2010).

Una vez explicadas las peculiaridades del complejo RISC, conviene centrarse en cómo se ejerce la inhibición de las dianas. Se plantean cuatro estrategias diferentes: corte de la diana, desestabilización de la diana, inhibición traduccional y metilación de DNA.

El corte del mRNA diana es el mecanismo de acción más conocido, y se basa en la actividad endonucleasa del dominio PIWI de AGO, que forma un pliegue RNasa H-like, capaz de cortar RNA complementario a la cadena guía portada por RISC (Liu *et al.*, 2004). De este modo, cuando el mRNA es cortado, da lugar a fragmentos a los que, o bien les falta el nucleótido “cap” del extremo 5', o bien un contienen un extremo 3' desadenilado, por lo que las exonucleasas los detectan y degradan.

La desestabilización del mRNA mediada por miRNA no ha podido ser aún demostrada en plantas, pero en animales es de hecho más frecuente que el corte de la diana y consiste en una desadenilación y *decapping* simultáneos (Wu *et al.*, 2006; Karginov *et al.*, 2010). Esta estrategia es reversible, ya que no requieren cortar el mRNA, y es precisamente en dicha reversibilidad donde reside su interés, pues podría facilitar una respuesta rápida frente a cambios repentinos en el ambiente causantes de estrés (Voinnet, 2009). Por ello, y dadas algunas evidencias, como que una pequeña parte de las dianas de miRNAs no presentan productos de corte (German *et al.*, 2008), se

creo que es posible que suceda en plantas pero no haya sido confirmado debido a su baja frecuencia en éstas.

La inhibición traduccional se dedujo a partir de la evidencia que suponían algunos cambios detectados a nivel de proteína pero no de mRNA, sugiriendo que podría ser un proceso más común de lo que se pensaba inicialmente (Brodersen *et al.*, 2008; Beauclair *et al.*, 2010). Li y colaboradores (2013) proponen que esta estrategia se basa en la inhibición del inicio de la traducción por exclusión del mRNA diana de la membrana de los polisomas, incluso afirman que depende de una proteína denominada *Altered Meristem Program1* (AMP1). Todavía queda mucho que investigar sobre este mecanismo de regulación, como por ejemplo su relación y equilibrio con la estrategia de corte de la diana, ya que algunos mRNAs han mostrado ser regulados por ambos sistemas (Brodersen *et al.*, 2008; Beauclair *et al.*, 2010), o por otro lado, el papel de las diferentes AGO en este tipo de regulación, ya que la asociación de miRNAs con los polisomas es AGO-dependiente (Lanet *et al.*, 2009; Reynoso *et al.*, 2012).

Finalmente, la metilación del DNA consistiría en una estrategia de regulación transcripcional, dado que una región metilada del DNA no puede ser transcrita. Se ha comprobado que en *Oryza sativa* DCL3 genera miRNAs de 24 nucleótidos que, una vez asociados con AGO4, provocan la metilación de citosinas tanto en el gen *MIR* como en el gen diana (Wu *et al.*, 2010). Esto también ha sido demostrado en *Arabidopsis*, con la salvedad de que los miRNA que DCL3 generaría y podrían ejercer esta función oscilaban entre 23 y 25 nucleótidos de longitud (Vázquez *et al.*, 2008). Esto no quiere decir que todos los miRNA de aproximadamente 24 nucleótidos puedan afectar a la metilación del DNA, como es el caso del miR163 que se une a AGO1 (Wu *et al.*, 2010), de hecho esto parece indicar que el papel de AGO4 es fundamental, incluso existen estudios que plantean la hipótesis de que el clado “AGO4/AGO6/AGO9” ha sufrido una especialización funcional destinada a regular la metilación (Zheng *et al.*, 2007; Eun *et al.*, 2011).

En definitiva, lo más importante de este trabajo, y del proyecto del que forma parte, es que plantean un innovador abordaje para un estudio clásico como es el estrés vegetal, en una especie de importancia agrícola para España, con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre su biología molecular y así poder mejorar su producción en el futuro.

## **OBJETIVOS**

El proyecto en el que se incluye este trabajo pretende abarcar desde un punto de vista holístico las respuestas a diferentes estreses a nivel de sRNA en plantas de melón, aunque para este caso los datos se centrarán en los cambios producidos en condiciones de sequía.

1. Exponer plantas de melón a condiciones controladas de estrés por sequía, con el objeto de contar con material biológico para la caracterización de la respuesta de la planta a esta condición limitante.
2. Lograr una aproximación superficial al conocimiento de la respuesta de *Cucumis melo* frente a sequía a nivel de sRNAs a partir de datos de lecturas.
3. Validar biológicamente la predicción bioinformática realizada por medio de RT-PCR semicuantitativa del mRNA diana de algunos miRNAs.

## MATERIAL y MÉTODOS

### **Preparación del material vegetal**

Las semillas de melón *Cucumis melo* var. Piel de sapo (provistas por el Dr. Antonio Monforte del CSIC), fueron tratadas con hipoclorito sódico al 15% durante 15 minutos seguido de dos lavados con agua destilada, para favorecer su germinación. A continuación fueron colocadas en placa donde permanecieron 48h a 37°C en oscuridad y finalmente 24h a 25°C con luz. Adicionalmente, en base a nuestra experiencia, para optimizar la tasa de germinación se les practicó un corte en la parte apical de la semilla para facilitar la salida homogénea de los cotiledones, sin dañar el endospermo.

Posteriormente para el cultivo se trasladaron a macetas de 12 cm de diámetro con sustrato mixto de turba y perlita durante unos 11 días, momento en que producen la primera hoja verdadera. Es importante la eliminación de plántulas “outlayer”, con crecimiento retrasado o acelerado, para homogenizar la muestra (Fig. 2).



**Fig. 2:** Fotografía de plántulas de melón seleccionadas por su homogeneidad en el crecimiento para realizar el experimento.

## **Tratamiento de estrés**

Se aplicó el tratamiento correspondiente (a excepción del grupo control) en grupos (bandejas) de 9 plantas. En el caso del estrés que nos ocupa, la sequía, el tratamiento consistió simplemente en la detención del riego. El riego del grupo control se efectuó por absorción a través de la parte inferior de las macetas, añadiendo en las bandejas 1'2 litros cada 2 días de una solución salina de Hoagland (1'8 litros el fin de semana).

Todo este proceso se llevó a cabo en un fitotrón con las siguientes condiciones de cultivo: ciclo de 16h luz/8h oscuridad, a 25°C y 20°C, respectivamente.

## **Obtención de las muestras**

El muestreo se realizó en varios tiempos, siendo el primero el “tiempo cero” ( $t_0$ ) una mezcla de hojas de 4-5 plantas tomada antes de empezar los tratamientos. Las siguientes tomas de muestras se realizaron a los 2 días ( $t_1$ ), 4 días ( $t_2$ ), 7 días ( $t_3$ ), 11 días ( $t_4$ ) y 14 días ( $t_5$ ), consistiendo este último ( $t_5$ ) en una mezcla de una hoja por cada una de las 9 plantas de cada grupo (no hay réplicas). El muestreo consistió en cortar cada vez una hoja verdadera (la segunda por debajo del ápice) totalmente desarrollada.

Las muestras fueron tomadas como mezclas de 3 hojas de 3 plantas diferentes por triplicado (3 réplicas de 3 hojas cada una). Las hojas se cortaron y se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido.

## **Extracción de RNA**

Antes de enviar a secuenciar las muestras es necesario extraer y purificar el RNA. Para ello se realizó una molienda en mortero con nitrógeno líquido, seguido de un protocolo de extracción fenólica. Para ello se tomaron aproximadamente 100 mg de muestra, se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido y se pasaron a un tubo Eppendorf al que se le añadió 1 ml de Trizol (Tri REAGENT , Sigma-Aldrich); la mezcla se agitó con vórtex y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se le añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo, se mezclaron

con vórtex y todo ello se incubó a T<sup>a</sup> ambiente durante unos 15 minutos, tras lo cual se centrifugaron 15 min a 13000 rpm a 4<sup>o</sup>C. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se volvió a realizar una extracción con cloroformo para eliminar cualquier resto de Trizol, pero esta vez añadiendo sólo 100 µl de cloroformo. La fase acuosa se recogió en un nuevo tubo y se le añadió isopropanol (aprox. 450 µl, 1 vol. de fase acuosa) y se dejó precipitando durante 5 a 10 min a 4<sup>o</sup>C. El RNA se recogió por centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos en frío. Al pellet resultante se le añadieron 300 µl de etanol 70% y se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 7000 rpm. A continuación se retiró el sobrenadante, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 100 µl de agua libre de RNasas. A continuación se añadieron 10 µL de acetato de sodio 3M y 300 µl de etanol absoluto y se dejó precipitando el RNA durante 2 horas a -80<sup>o</sup>C. Transcurrido ese tiempo el RNA se recuperó por centrifugación (13000 rpm durante 10 minutos a 4<sup>o</sup>C) y tras un lavado del pellet con etanol 70%, se resuspendió en 20 µl de agua y se conservó a -20<sup>o</sup>C hasta su posterior utilización.

Para una óptima secuenciación de los sRNA se requirió la separación de éstos del RNA total, y para ello se realizó una segunda extracción mediante el kit "REALTOTAL microRNA kit" (Durviz SL, Paterna, Valencia), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante para muestras de sangre, puesto que se partía de RNA total purificado y no de material vegetal.

## **Secuenciación**

La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa Sistemas Genómicos S.L. (Paterna, Valencia), quienes generaron bibliotecas de cDNA para posteriormente realizar una secuenciación "paired-end" (100 x 2) en un secuenciador "Illumina HiSeq 2000" (San Diego, California, EEUU).

Para realizar la secuenciación de tipo Illumina fueron necesarios 4 pasos previos: tagmentación, reacción de retrotranscripción, creación de bibliotecas y formación de clusters.

La tagmentación consiste en la unión de adaptadores a los extremos 3' y 5' del RNA. A continuación se realizó una reacción de retrotranscripción para tener DNAs copia de los sRNAs (pues la secuenciación de Illumina requiere DNA). Los cDNAs fueron amplificados por PCR, constituyéndose así las bibliotecas indexadas de cDNA de doble cadena. La calidad de las bibliotecas fue analizada en Bioanalyzer 2100, High Sensitivity assay y la cuantificación de éstas fue determinada por real-time PCR en LightCycler 480 (Roche).

El “clustering” o formación de clusters es el paso previo a la secuenciación Illumina. Gracias a los adaptadores que previamente fueron añadidos, cada cDNA correspondiente a cada sRNA se unirá a una de las regiones con múltiples copias de oligos, los clusters, donde se vuelven a amplificar.

Por último, la secuenciación se basa en el registro de la luz emitida secuencialmente por nucleótidos marcados fluorescentemente. Así, la importancia de los clusters reside en la necesidad de una emisión fluorescente lo suficientemente elevada para ser detectada y analizada, lo cual es posible gracias a que múltiples copias de cada cDNA están siendo secuenciadas simultáneamente en el tiempo y en un mismo punto.

Dado que cada copia de un mismo sRNA presente en una muestra se une a un clúster diferente y que la secuenciación de cada clúster es considerada como una única lectura por el secuenciador, las “cuentas por millón” (CPM), que dan una idea de la abundancia de cada secuencia, se calcularon a partir de estas lecturas.

### **Procesamiento bioinformático de los datos de secuenciación**

Los datos informatizados obtenidos como resultado de la secuenciación se procesaron en el servicio de Bioinformática del IBMCP mediante múltiples programas informáticos.

Tras la eliminación de las secuencias de los adaptadores empleados durante la secuenciación se analizó la calidad de las lecturas con el programa FastQC (v.0.11.4) (Andrews *et al.*, 2010). Después, el estudio de expresión diferencial (control frente tratamiento) fue realizado mediante línea de comandos bajo el lenguaje de programación R (v.3.2.2) y el software RStudio (v.0.99.489) empleando el paquete edgeR (v.3.12.0) (Robinson *et al.*, 2010). Pero de entre todas las secuencias de sRNAs con expresión diferencial, para poder hacer la validación se requería identificar los posibles miRNAs, y para ello se empleó miRCat (Moxon *et al.*, 2008a), herramienta perteneciente al paquete “UEA sRNA Toolkit” (Stocks *et al.*, 2012).

## Validaciones biológicas

Ya que los resultados obtenidos *in silico* son predicciones, éstas han de ser validadas *in vivo*. El proceso comenzó tras la selección de los miRNA con expresión diferencial realizada con miRCat, entonces se cotejaron éstos con la herramienta online de psRNATarget (Dai y Zhao, 2011), concretamente utilizando su función “user-submitted small RNAs / preloaded transcripts”, para buscar secuencias de potencial interacción con el miRNA, las cuales se introdujeron más tarde en BLAST (Altschul *et al.*, 1997) para su identificación como dianas potenciales. Estas posibles dianas requirieron una posterior comprobación utilizando otra aplicación de psRNATarget, “user-submitted small RNAs / user-submitted transcripts”.

Una vez confirmadas las secuencias de las posibles dianas de los miRNAs se procedió al diseño de oligos de PCR, utilizando la herramienta primer-blast (Ye *et al.*, 2012). Así, el listado de oligos para dianas de sequía y el control de profilina encargados a la empresa Sigma-Aldrich se muestra a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1:** contiene las secuencias y temperaturas de “melting” de todos los oligos empleados para las RT-PCR.

| Diana                                      | GenBank ID     | Secuencia                        | T <sup>a</sup><br>melting<br>(°C) |
|--------------------------------------------|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Profilin                                   | NM_001297545.1 | <b>Fw</b> GTCGTGGCAAGTTTACGTCG   | 56'5                              |
|                                            |                | <b>Rv</b> GTAGCACTAGGAAACACACCG  | 55'4                              |
| Carbonic anhydrase 2-like                  | XM_008446713.1 | <b>Fw</b> CGATCAATTTCGCCCAAGAGC  | 56'6                              |
|                                            |                | <b>Rv</b> ACAAAGCTTGAGTCAGTTGCAT | 55'3                              |
| Cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like | XM_008441118.1 | <b>Fw</b> GAGTGCCAATTTGAGTGCCG   | 57'1                              |
|                                            |                | <b>Rv</b> GACGCCTTTGGTTTCTTGCC   | 57'3                              |
| Auxin Response Factor 17                   | XM_008447139.1 | <b>Fw</b> TGGCGTATGCTTGAGGTTAC   | 55'0                              |
|                                            |                | <b>Rv</b> TTCTCAGCTGTTCCCTGTGGC  | 57'5                              |
| Lacasse 11                                 | XM_008451024.1 | <b>Fw</b> GAATGGAACGCAACTGACGG   | 56'7                              |
|                                            |                | <b>Rv</b> TGCATGAACCAAACCCCTGG   | 58'3                              |

Para hacer la reacción de retrotranscripción (RT), cantidades equivalentes de RNA total de cada una de las muestras se juntaron en un tubo, este RNA había sido cuantificado con un espectrómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU), y en caso de haber diferencias entre muestras se realizaban los ajustes pertinentes mediante diluciones. A continuación se realizó un tratamiento con DNasa, pues el DNA genómico contaminaría el resultado si acompaña al cDNA obtenido por RT a partir del RNA, para ello se siguió el protocolo del kit utilizado (DNase I, RNase-free, Thermo Scientific”).

El termociclador empleado en la RT-PCR era un Mastercycler<sup>®</sup> pro S (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Por un lado, las condiciones de la reacción de retrotranscripción eran: 42°C-1h / 70°C-5”; y el kit empleado fue el “Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit”. Por otra parte, las condiciones de la PCR eran: 94°C-3’ / {94°C-30” / 57°C-30” / 72°C-45”} x35 ciclos / 72°C-5’ / 4°C-∞; y el kit empleado el “DNA polimerase netzyme, Épica S.L.”.

El siguiente paso es la electroforesis, para la cual se empleó TAE 1X como tampón y agarosa al 1'5%, y se corrieron los geles durante unos 25 min a 130V.

Finalmente para la cuantificación, se recurrió a un programa de análisis de imágenes llamado "ImageJ" (Schneider *et al.*, 2012), con el que se midieron los valores de intensidad de las bandas de los geles de electroforesis.

Adicionalmente, se realizó una comprobación para asegurar que las dianas habían sido correcta y específicamente amplificadas, comenzando por la extracción del cDNA de las bandas de los geles de agarosa que se utilizaron para analizar las RT-PCR mediante el kit "Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit", siguiendo las instrucciones del producto. El cDNA extraído de cada banda fue enviado a secuenciar al servicio de secuenciación del IBMCP (secuenciador capilar ABI 3100) para corroborar que se tratase de las dianas correspondientes.

### **Análisis estadístico de los resultados**

Para que los resultados fuesen estadísticamente válidos se realizaron para cada diana tres réplicas técnicas. Dados los datos de intensidad de banda, se aplicó un sencillo test estadístico, la "prueba t" para confirmar si las diferencias eran o no estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) y por tanto si las predicciones bioinformáticas podían ser validadas o no.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### **Diseño experimental, análisis fenotípico y toma de muestras**

Las plantas crecidas en el invernadero fueron sometidas a estrés hídrico en la forma y condiciones descritas en el apartado “Tratamiento de estrés” de Material y Métodos. A pesar de que se realizó un muestreo a distintos tiempos, para este trabajo sólo se tomó el material vegetal correspondiente al tiempo 4 (T<sub>4</sub>), es decir, plantas sometidas a estrés durante 11 días. Como se puede observar en la **Fig. 3**, en ese tiempo las plantas muestran síntomas característicos de estrés hídrico, como son pérdida de turgencia foliar y retraso en el crecimiento.

Para la toma de muestras se cortó una hoja madura de cada planta de un total de 9, generando 3 réplicas al combinar 3 hojas cada una. Éstas fueron congeladas inmediatamente y conservadas a -80°C para su posterior procesamiento.



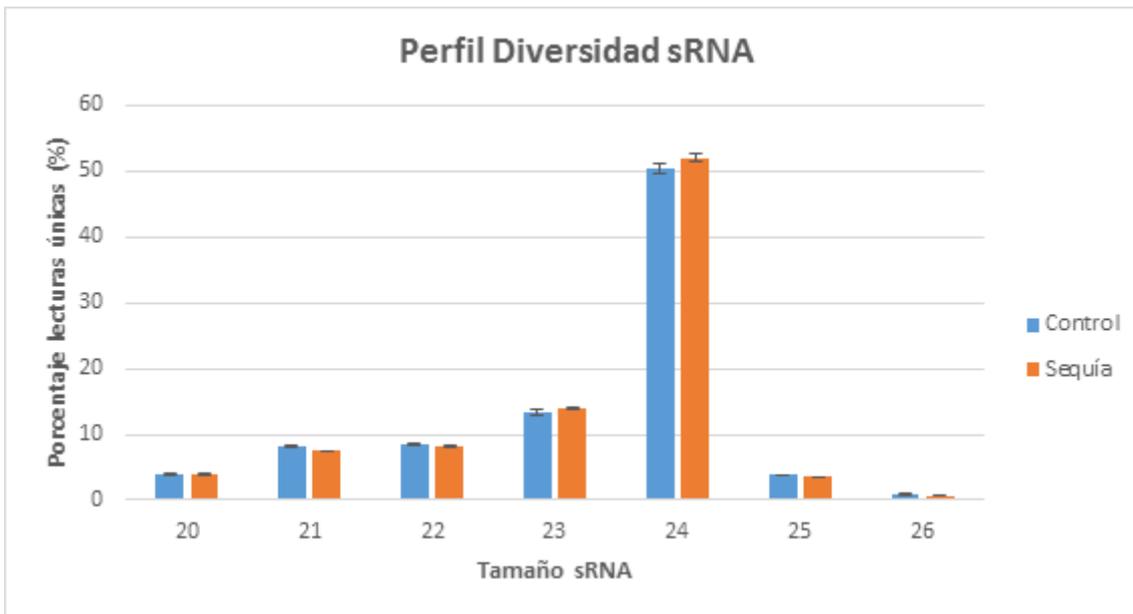
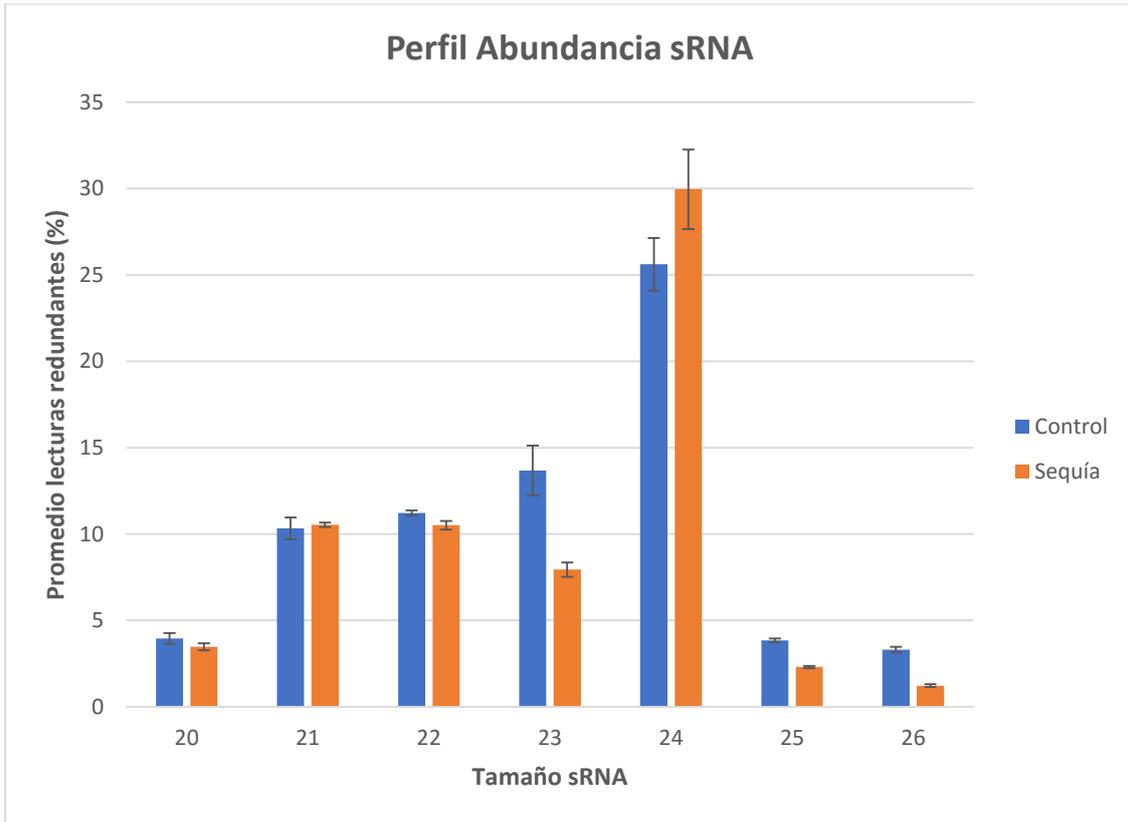
**Fig. 3:** a la izquierda planta control, a la derecha con tratamiento de sequía a tiempo 3 (7 días).

## **Análisis de lecturas de secuenciación de sRNAs**

Los pequeños RNAs (sRNAs) extraídos y purificados a partir de las muestras detalladas en el apartado anterior, procedentes tanto de plantas sometidas a estrés hídrico, como de plantas no tratadas, se enviaron a la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España), que se encargó de la generación de bibliotecas y de la secuenciación según un proceso descrito por Illumina (San Diego, California, EEUU). Para más información del tratamiento de las muestras así como del proceso de secuenciación consultar la sección de Material y Métodos.

A continuación, el Servicio de Bioinformática del IBMCP procedió a la eliminación de las secuencias de los adaptadores empleados para secuenciación Illumina, así como a un primer análisis de la calidad de las bibliotecas. Se determinó que éstas tenían una calidad de lectura promedio de Q37 en la escala Phred, es decir, una precisión del 99'98%, lo que supone una calidad óptima para este tipo de análisis.

A partir de la secuenciación no sólo se obtuvieron las secuencias de los sRNAs y su abundancia en cada muestra, sino que ésta también proporcionó otros datos susceptibles de ser analizados, éstos fueron el recuento de lecturas redundantes y de lecturas únicas. Las lecturas totales o redundantes son aquellas que abarcan todas las secuencias obtenidas, mientras que en el recuento de lecturas únicas, o no-redundantes, se agrupan las idénticas y se contabilizan como una. Al clasificar estos datos según el tamaño de las secuencias se pudieron establecer perfiles de abundancia (Fig.4A) y diversidad (Fig.4B) de sRNA, en función del porcentaje de lecturas redundantes y únicas, respectivamente.



**Fig. 4:** presenta el % de lecturas redundantes (A) y no-redundantes (B) para sRNAs de entre 20 y 26 nt, comparando control y sequía. Las barras de error se corresponden con la desviación estándar.

Centrándose en los sRNAs de tamaños comprendidos entre 20 y 26 nucleótidos (rango lo suficientemente amplio para abarcar aquellos reconocidos como los principales con actividad biológica), resultó que las secuencias más abundantes y a la vez diversas fueron las comprendidas entre 21 y 24 nt, especialmente las de 24 nt. Al comparar entre control y sequía se aprecian diferencias a nivel de abundancia en lecturas de 22 y 23 nt (a favor del control) y de 24 nt (a favor de la sequía), mientras que respecto a la diversidad las diferencias son menores y tanto en lecturas de 23 como de 24 nt se podría afirmar que las muestras de sequía son ligeramente más diversas, al contrario de las de 21 nt, donde el control presenta un poco más de diversidad.

En primer lugar, el hecho de que el rango de tamaños de las secuencias más destacable abarque entre 21 y 24 nucleótidos coincide con lo esperable, dado que la mayoría de sRNAs con actividad biológica oscilan entre dichos tamaños (Chitwood y Timmermans, 2010), sin embargo que el tamaño mayoritario sea 21 o 24 nt es una cuestión más controvertida, pues depende de múltiples factores como la especie, el tejido, las condiciones de estrés y si presenta fenotipo o no, como se discutirá a continuación.

Así, existe un estudio realizado en hojas de melón (Sattar *et al.*, 2012) que destaca sobre el resto las lecturas de 24 nucleótidos, especialmente en el control respecto a las muestras de respuesta temprana y tardía frente al estrés por herbivoría de áfidos; mientras que González-Ibeas y colaboradores (2011) postulan que en cultivares de melón tolerantes o susceptibles a algunos virus, las secuencias más abundantes y diversas son de 21 nucleótidos. El motivo por el que González-Ibeas y colaboradores (2011) obtienen un resultado diferente podría deberse al tipo de tejidos empleados (cotiledones, fruto y ovario) frente a las hojas maduras de Sattar y colaboradores (2012). Esta importancia del "factor tejido" queda patente en un reciente trabajo (Herranz *et al.*, 2015) en el que se analizan 4 tejidos de melón diferentes, observándose de nuevo una mayor abundancia de sRNAs de 24 nucleótidos en hojas y de 21 nucleótidos en cotiledones, si bien las mayores diferencias entre estos dos tamaños se encuentran en raíz y floema. Por otra parte, también se pone de manifiesto en este trabajo que el "factor estrés" es incluso más relevante, ya que las variaciones en los perfiles de acumulación de especies de sRNAs son mayores en las plantas infectadas con MNSV (*Melon Necrotic Spot Virus*); así, salvo en el floema, se produce un gran aumento en el número de lecturas redundantes de 21 nucleótidos acompañado de un descenso de las de 24. Adicionalmente, este estudio permite revisar también la importancia del "factor especie", pues presenta también resultados de una especie filogenéticamente muy próxima al melón, el pepino (*Cucumis sativus*), pudiéndose observar diferencias cuando se comparan los mismos tejidos. A este

respecto, un trabajo anterior realizado también en pepino (Martínez *et al.*, 2011) plantea las lecturas de 24 nt como las más diversas, aunque no las más abundantes, esas serían las de 22 nt y por tanto con un elevado nivel de redundancia. Estudios en otras especies menos afines como *Medicago truncatula* (Szittyá *et al.*, 2008), *Solanum* spp. (Song *et al.*, 2010) y *Citrus trifoliata* (Moxon *et al.*, 2008b) reafirman la dominancia de los sRNAs de 24 nucleótidos, estableciéndolo con un patrón considerablemente frecuente.

Por otra parte, si se toma como factor determinante del patrón de lecturas el estrés por sequía en otras especies, los perfiles descritos son muy variables, por lo que a continuación se comentan algunos de ellos. En el caso de *Populus trichocarpa* (Shuai *et al.*, 2013), los resultados son similares a los que aquí se presentan en melón, ya que las lecturas de 24 nt son las más abundantes y por lo general las lecturas de sequía dominan tanto en abundancia como en diversidad sobre las del control; aunque la diferencia está en las lecturas únicas, pues en *P. trichocarpa* la diversidad es mayor en secuencias de 21 nt. Wang y colaboradores (2011) muestran datos de *Medicago truncatula* que coinciden en gran medida con los que se obtuvieron en este trabajo, puesto que tanto las lecturas únicas como las redundantes de 24 nt predominan sobre el resto, al igual que lo hacen todas las lecturas de las muestras de sequía respecto al control. Por último, el caso de la caña de azúcar en condiciones de sequía (*Saccharum* spp.) ha sido investigado y reflejado en dos artículos con diferentes enfoques: comparando variedades más y menos tolerantes al estrés (Ferreira *et al.*, 2012) y otro que adicionalmente contrasta datos de hojas y raíces (Thiebaut *et al.*, 2014).

De este modo, en el primero de los estudios recientemente mencionados (Ferreira *et al.*, 2012), se muestran una serie de patrones muy similares en rasgos generales, dominando en todos ellos las lecturas de 21 nt (únicas y redundantes). Las únicas diferencias apreciables son las inversiones en la ligera dominancia del estrés sobre el control (y viceversa) entre lecturas redundantes y únicas de 21 y 24 nt, a la vez que sucede lo mismo en la comparación entre las variedades con distinto grado de tolerancia a sequía; de lo que se podría deducir que quizás el grado de tolerancia de la planta al estrés no sea el factor más significativo a la hora de determinar el perfil de lecturas.

Por otro lado, del segundo artículo (Thiebaut *et al.*, 2014) se puede extraer que el tejido es muy relevante en el perfil de lecturas, ya que en el caso de la raíz dominan tanto a nivel de abundancia como de diversidad las secuencias de 24 nt, mientras que en las hojas lo hacen los de 21 nt. En éste también comparan variedades tolerantes y susceptibles a sequía, y se observa que en las muestras de raíz apenas hay diferencias significativas entre ellas, no obstante en las hojas sí que hay variación, especialmente en las lecturas únicas, lo cual refleja la complejidad de las interacciones entre factores determinantes del patrón de lecturas.

### **Expresión diferencial de sRNAs y predicción de dianas de miRNAs para validación**

El Servicio de Bioinformática del IBMCP, así como dos bioinformáticos de nuestro grupo de trabajo, sometieron las secuencias cuyo tamaño oscilaba entre 18 y 36 nucleótidos (entre las cuales se encontrarían siRNAs y miRNAs) a un análisis de expresión diferencial empleando el paquete informático edgeR, obteniéndose así datos de CPM (cuentas por millón) y logFC (log Fold-Change). El valor de CPM muestra una cuantificación relativa de las secuencias, que se corresponde con el número de lecturas de una misma secuencia por cada millón de secuencias totales de la muestra. El logFC es el resultado de comparar las CPM del control y de las muestras tratadas, y por tanto es el valor que propiamente aporta información de expresión diferencial; éste se calcula como la diferencia entre el logaritmo en base dos de las CPM de la muestra tratada y el de las CPM del control, de manera que un logFC positivo implica una mayor expresión en muestras de sequía, y un valor negativo, mayor expresión en el control.

Dado que uno de los objetivos de esta investigación consiste en la validación biológica de los resultados obtenidos *in silico*, era necesario identificar aquellas secuencias potencialmente funcionales en la regulación de los mRNAs y diferenciarlas de las que son subproductos de degradación. Por ser los miRNAs los más extensamente caracterizados fueron seleccionados para realizar los estudios de actividad biológica. Así se utilizó el programa miRCat para determinar las secuencias de los posibles miRNAs con expresión diferencial en sequía (respecto al control), para lo cual se vale de los resultados del análisis de edgeR.

Se obtuvieron así 9 secuencias, que fueron cotejadas con miRBase para su identificación y que constituyeron la base sobre la cual realizar las validaciones biológicas (Tabla 2).

**Tabla 2:** presenta las secuencias predichas como miRNA por miRCat (inferior) alineadas con las secuencias correspondientes registradas en miRBase (superior), “gaps” en rojo y “mismatches” en azul. Junto a ellas se muestran los datos de edgeR (logFC y CPM) que corroboran su expresión diferencial, y su identificación según miRBase.

| Secuencia miRBase<br>miRNA predicho               | CPM<br>control | CPM<br>sequía | logFC | Identificación<br>miRNA |
|---------------------------------------------------|----------------|---------------|-------|-------------------------|
| UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUGU<br>CAUUGAGUGCAGCGUUGAUGU   | 0.600          | 7.180         | 3.42  | cme-miR397              |
| UUGGACUGAAGGGAGCUC<br>UUGGACUGAAGGGAGCUCU         | 224.000        | 94.400        | -1.25 | cme-miR319a             |
| UAGCCAAGGACGAC_UUGCCUA<br>GC_AAG_UCGUCUUGGCUACCU  | 5.990          | 1.570         | -1.92 | ptc-miR169u-5p          |
| CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU<br>CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU    | 216.000        | 58.600        | -1.88 | bra-miR168c-3p          |
| UGCUCACUUCUCUUUCUGUCAUC<br>UGCUCACUUCUCUUUCUGUCAG | 19.900         | 6.450         | -1.62 | mtr-miR156i-3p          |
| UUACUAAAGAAUACCGUGUGC                             | 10.400         | 3.400         | -1.60 | Desconocido             |
| AAAUUAUGAUGUUGGGUCU<br>AAAUUAUGACGUAGGCUCUGC      | 14.500         | 0.140         | -6.37 | ptc-miR171g             |
| UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA<br>UGCCUGGCUCCUGUAUGCC       | 2.800          | 0.399         | -2.75 | cme-miR160c             |
| GUUGACAGAAGAGAGUGAGCAC<br>UGACAGAAGAGAGUGAGCAC    | 23.600         | 11.300        | -1.07 | cme-miR156j             |

A continuación, se utilizaron las herramientas online de psRNATarget para, en primer lugar, determinar, con ayuda de BLAST, las posibles dianas de los miRNAs potenciales predichos por miRCat, y después, confirmar la unión miRNA-diana predicha.

Para realizar la predicción de dianas se emplearon los parámetros que psRNATarget presenta por defecto: la expectativa (E), que representa el grado de complementariedad del miRNA y la diana, y su valor puede ser  $\leq 3$  (a mayor valor, menor complementariedad); y UPE, que supone una medida de la accesibilidad de la diana para el miRNA, cuyo valor puede ser  $\leq 25$  (a mayor valor, menor accesibilidad). De este modo se obtuvieron predicciones de dianas para 8 de los 9 miRNAs, y en 7 de ellas fueron corroboradas las uniones miRNA-diana (Tabla 3).

**Tabla 3:** muestra las secuencias y nombres de los miRNA dados por miRCat frente a su correspondiente diana predicha mediante psRNATarget y sus “resultados de predicción”: la expectativa (E), la accesibilidad de la diana (UPE) y el mecanismo de inhibición del miRNA sobre su diana. El fondo verde corresponde a dianas predichas que coinciden con las definidas en la bibliografía, el rojo a aquellas que no lo hacen y entre paréntesis las que aparecen en la literatura científica. En los datos escritos con fuente de color azul no ha sido confirmada la unión “miRNA-mRNA diana” en psRNATarget. Aquellos destacados en negrita fueron los 4 seleccionados para la validación biológica.

| Secuencia miRNA predicho | Identificación miRNA  | Diana                                                                 | Resultados de predicción |               |                   |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------|
|                          |                       |                                                                       | E                        | UPE           | Inhibición        |
| CAUUGAGUGCAGCGUUGAUGU    | <b>cme-miR397</b>     | <b>Lacasse-11</b>                                                     | <b>1,5</b>               | <b>11,677</b> | <b>Corte</b>      |
| UUGGACUGAAGGGAGCUCCCU    | cme-miR319a           | Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 11 (TCP transcription factor)        | 2,5                      | 21,834        | Corte             |
| GCAAGUCGUCCUUGGCUACCU    | ptc-miR169u-5p        | Nuclear transcription factor Y subunit A-1-like                       | 2,5                      | 17,905        | Corte             |
| CCCGCCUUGCAUCAACUGAAU    | <b>bra-miR168c-3p</b> | <b>Carbonic anhydrase 2-like (AGO1)</b>                               | <b>3,0</b>               | <b>20,185</b> | <b>Traducción</b> |
| UGCUCACUUCUCUUCUGUCAG    | mtr-miR156i-3p        | Genomic scaffold, unassembled_sequence34811 (SPL protein)             | 0,0                      | 12,121        | Corte             |
| UUACUAAAGAAUACCGUGUGC    | Desconocido           | ...                                                                   | ...                      | ...           | ...               |
| AAAUUAUGACGUAGGCUCUGC    | ptc-miR171g           | Cyclic nucleotide-gated ion channel 1-like (SCL transcription factor) | 3,0                      | 18,920        | Traducción        |
| UGCCUGGCUCCUGUAUGCC      | <b>cme-miR160c</b>    | <b>Auxin response factor 17</b>                                       | <b>0,5</b>               | <b>19,759</b> | <b>Corte</b>      |
| UGACAGAAGAGAGUGAGCAC     | cme-miR156j           | Squamosa promoter-binding-like protein 9                              | 1,0                      | 14,379        | Corte             |

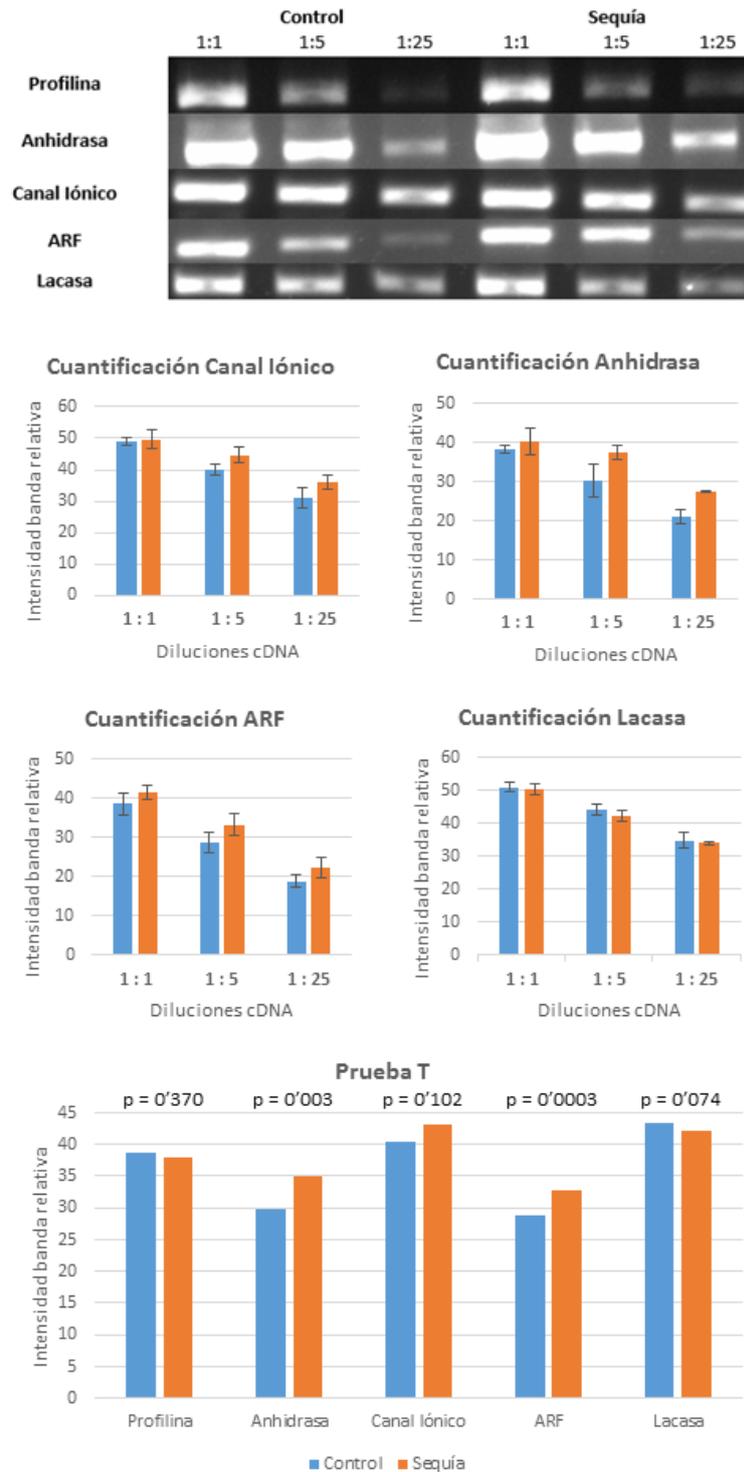
## Validación biológica de los resultados

Con esta finalidad se seleccionaron 4 de los miRNAs con expresión diferencial predichos por miRCat, estos eran: miR168, miR171, miR160 y miR397 (Tabla 3). Para validar la predicción bioinformática se empleó la técnica de RT-PCR semicuantitativa, de manera que si las diferencias de expresión de los miRNA (Tabla 2) era coherente con los niveles de mRNA de sus dianas correspondientes (Fig. 5A-E), teniendo en cuenta la inhibición que los primeros ejercen sobre los últimos, la predicción se consideraría validada. A continuación se expondrán y discutirán los resultados obtenidos para cada caso.

### miR171 y su diana, *CNG Channel 1-like*

En el caso de miR171, a pesar de las diferencias observadas entre plantas control y sometidas a estrés hídrico a nivel del miRNA ( $\log_{FC} = -6.37$ ), no se detectaron diferencias significativas en las concentraciones del mRNA diana analizado ( $p = 0.102$ ) (Fig. 5B, F). Esto podría deberse a que el efecto inhibitor del miRNA sobre su diana sucedería a nivel traduccional, hecho que no puede constatarse con la técnica empleada (RT-PCR).

Este es un caso interesante dado que esta familia de miRNAs no había sido descrita en melón previamente y además, la función que se ha predicho en el presente estudio para la secuencia de miRNA detectada difiere de la descrita en otras especies, que sería la inhibición de diversas formas de factores de transcripción *Scarecrow-like 6 (SCL6)*, provocando una reducción en la elongación de la raíz primaria (Wang *et al.*, 2010). Asimismo, se hallan contrapuestos los resultados observados en *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2008) y *Oryza sativa* (Lv *et al.*, 2010). En el primer caso miR171 se ve inducido por múltiples estreses abióticos (sequía, salinidad y frío), mientras que en el caso del arroz se describe su inhibición por frío únicamente, lo cual pone de manifiesto lo variable que puede ser esta regulación de la expresión génica basada en miRNAs en diferentes especies.



**Fig. 5:** muestra los geles de electroforesis de las RT-PCR del control de profilina y las 4 dianas; diferenciando muestras control y tratadas, y tres diluciones diferentes de cDNA (A). Presenta también las intensidades de banda analizadas con ImageJ de las 4 dianas: canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos 1-like (B), anhidrasa 2-like (C), factor de respuesta a auxinas 17 o *ARF17* (D) y lacasa 11 (E). Además, se representa gráficamente la prueba T (F), donde los datos de intensidad de banda proceden de promediar las 3 diluciones de cDNA, mostradas en las figuras anteriores.

Por otra parte, en este estudio realizado en melón se le ha atribuido una diana diferente, un canal iónico regulado por nucleótidos cíclicos, cuya implicación en un contexto de estrés por sequía y/o salinidad sería fácilmente explicable por su papel directo en la regulación del potencial osmótico, indirectamente del potencial hídrico. No obstante, dada la naturaleza traduccional de su supuesta acción regulatoria sobre esta diana y las limitaciones de la técnica empleada, no se puede asegurar todavía que realmente exista esta relación “miRNA-diana” y deberá ser investigado en el futuro.

Asimismo, aunque no se han cuantificado los niveles del mRNA de *SCL6*, no cabría esperar que la secuencia que se ha identificado como ptc-miR171g tenga dicho efecto en *Cucumis melo*, ya que el programa informático utilizado no ha detectado ninguna diana potencial entre los mRNA de *SCL* de melón. Esto plantea otra diferencia interespecífica respecto a los miRNAs, ya no basada en los niveles de éstos frente a determinados estreses, si no en que miRNAs definidos como integrantes de una familia con determinadas dianas y mecanismos de acción pueden variar según la especie vegetal.

#### miR168 y su diana, CA2

Por otro lado, el miR168 (el cual tampoco había sido descrito en plantas de melón) ha presentado un resultado diferente, puesto que sí se han detectado diferencias significativas en la cantidad de mRNA diana (Fig. C, F).

Ahora bien, al igual que en el caso anterior, la diana identificada para este miRNA en melón, una anhidrasa carbónica tipo 2, no es la que tradicionalmente se ha vinculado a miR168 según la bibliografía, que sería el mRNA de *Argonauta 1* o *AGO1* (Vázquez *et al.*, 2004). Aunque el programa informático no presentaba el mRNA de *AGO1* de *C. melo* como posible diana de la secuencia identificada como bra-miR168c-3p, es cierto que guarda cierta homología con la secuencia del mRNA de esta anhidrasa carbónica, y en el futuro sería interesante cuantificar los niveles de *AGO1*, con el fin de averiguar si este miRNA puede tener múltiples dianas en melón, lo cual además podría explicar por qué se detecta variación en la concentración de mRNA de la anhidrasa cuando no cabría esperarlo dada su regulación a nivel traduccional, pues podría estarse viendo afectada indirectamente a través de *AGO1*,

que constituye una pieza esencial en el sistema de regulación por silenciamiento, al establecerse un feedback. (Vaucheret *et al.*, 2004).

### miR160 y su diana, ARF17

En cuanto a miR160, se confirmó que la predicción de una disminución de los niveles del mismo en sequía (Tabla 2) era coherente con un incremento significativo en la acumulación del mRNA del gen diana *ARF17* (*Auxin Response Factor 17*) (Fig. 5D, F).

Los factores de respuesta a auxinas son factores de transcripción que regulan genes en función de la concentración de auxinas, activando o inhibiendo su transcripción según sea el caso. Estudios previos describen cómo un descenso en los niveles de miR160, que tiene un efecto represor sobre *ARF10*, *ARF16* y *ARF17*, hace que éstos se acumulen en hojas (Mallory *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

*ARF16* ha sido relacionado con el control de la formación de la caliptra y del número de raíces laterales, inhibiendo su formación (Wang *et al.*, 2005). Así, Liang y colaboradores (2012) observaron que plantas de *A. thaliana* crecidas en condiciones de déficit de nitrógeno, presentaban un incremento de miR160 y una consiguiente reducción de *ARF16* lo cual se traducía en un mayor desarrollo de raíces laterales. Si bien en este trabajo no se estudiaba el estrés hídrico, las repercusiones que tiene el control de la estructura radicular sobre la respuesta a dicho estrés resultan obvias.

En cuanto a *ARF17*, Mallory y colaboradores (2005) hacen un amplio estudio sobre su regulación mediante silenciamiento por miR160, y así determinan que es muy eficaz, hasta tal punto que en las construcciones transgénicas de tipo *35S:ARF17* (de expresión constitutiva) decrecen notablemente los niveles de *ARF17* y se incrementan los productos de su corte por miR160. Por otro lado, también determinan que esta regulación es fundamental, ya que en una línea transgénica resistente a miR160 más del 55% de las plantas analizadas presentaban algún tipo de defecto del desarrollo, ya sea vegetativo y/o floral, frente al control en que todas se desarrollaban con normalidad.

Pero la clave en el caso de estrés por sequía probablemente resida en *ARF10*, que está implicado en la sensibilidad a ácido abscísico (ABA). La sobreexpresión de miR160 en plantas de *A. thaliana* produce insensibilidad a ABA, mientras que líneas de sobreexpresión de una forma de *ARF10* resistente a mir160 son hipersensibles (Liu *et al.*, 2007). Adicionalmente, otro estudio señala que en plántulas de arroz el ABA ayuda a la acumulación de mRNA de algunos *ARF* mediante la reducción de los niveles de miR160 (Liu *et al.*, 2009).

Estos resultados son coherentes con los del presente trabajo, pues se esperarían niveles más bajos de miR160 en las plantas melón que sufren de estrés hídrico para facilitar el rol de ABA en la tolerancia a dicho estrés. Otros trabajos presentan resultados similares en otras especies como *Populus trichocarpa* (Lu *et al.*, 2008).

#### miR397 y su diana, LACASSE-11

La última secuencia que se estudió, fue identificada como cme-miR397, y al igual que en el caso anterior, se cuantificó su diana potencial, el mRNA de la enzima lacasa 11. El resultado obtenido fue que la acumulación de miR397 en las plantas tratadas con sequía (Tabla 2) se correspondía con unos niveles de mRNA diana significativamente menores respecto al control (Fig. 5E, F).

La identificación de una lacasa como diana de miR397 concuerda con trabajos previos que relacionan este miRNA con dichas enzimas (Sunkar y Zhu, 2004), en algunos casos refiriéndose a su papel en la regulación de la síntesis de lignina (Lu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014) y en otros tratando de dar una explicación con implicaciones en la respuesta a estrés hídrico, dada su regulación negativa sobre una lacasa que reduce el crecimiento radicular (Cai *et al.*, 2006).

Pero quizás sea también interesante en términos de respuesta a sequía su otra diana mencionada en la bibliografía (que aunque no se ha analizado en este experimento podría ser interesante para futuros estudios), el mRNA de la  $\beta$ -fructofuranosidasa (Zhou *et al.*, 2010), implicada en el metabolismo de la sacarosa y el almidón. Su importancia residiría en la

hipótesis de que el equilibrio entre síntesis y metabolismo de los glúcidos puede ser esencial para tolerar la sequía (Ding *et al.*, 2013).

Como ya se ha comentado previamente, el resultado de la cuantificación realizada en este trabajo muestra un aumento del miR397 en condiciones de sequía en *Cucumis melo*, al igual que sucede en *A. thaliana* (Sunkar y Zhu, 2004) y al contrario que en *Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 2010), o como en la soja con genotipo sensible a sequía y opuestamente al tolerante (Kulcheski *et al.*, 2011); lo cual supone una reafirmación de la hipótesis que ya se planteó con los miRNA anteriormente explicados, de que existe una importante variación intraespecífica en este sistema de regulación de la expresión génica, incluso al tratarse de un mismo miRNA.

## **CONCLUSIONES**

- Se puso a punto un sistema para la sincronización en la germinación de plántulas de melón.
- Fue posible determinar el patrón general de acumulación de sRNAs en plantas de melón expuesta a sequía.
- Se identificaron miRNAs con expresión diferencial en plantas de melón expuesta a sequía.
- Para al menos 2 de estos miRNAs con expresión diferencial (miR160 y miR397) fue posible validar las dianas predichas bioinformáticamente, así como cambios en su acumulación en respuesta a condiciones de estrés hídrico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abe, M., Yoshikawa, T., Nosaka, M., Sakakibara, H., Sato, Y., Nagato, Y., & Itoh, J. I. (2010). *WAVY LEAF1*, an ortholog of *Arabidopsis HEN1*, regulates shoot development by maintaining microRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice. *Plant physiology*, *154*(3), 1335-1346.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, *25*(17), 3389-3402.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. *Reference Source*.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., & Royo, C. (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals of Botany*, *89*(7), 925-940.
- Beauclair, L., Yu, A., & Bouché, N. (2010). microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *62*(3), 454-462.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, *2*(2), 48-54.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, *320*(5880), 1185-1190.
- Cai, X., Davis, E. J., Ballif, J., Liang, M., Bushman, E., Haroldsen, V., ... & Wu, Y. (2006). Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *57*(11), 2563-2569.
- Chawla, K., Barah, P., Kuiper, M., & Bones, A. M. (2011). Systems Biology: A Promising Tool to Study Abiotic Stress Responses. In *Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance* (pp. 163-172). United Arab Emirates: Bentham Science.
- Chen, H. M., Chen, L. T., Patel, K., Li, Y. H., Baulcombe, D. C., & Wu, S. H. (2010). 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(34), 15269-15274.
- Chen, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., ... & Budworth, P. R. (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *The Plant Cell*, *14*(3), 559-574.
- Chitwood, D. H., & Timmermans, M. C. (2010). Small RNAs are on the move. *Nature*, *467*(7314), 415-419.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, *11*(1), 163.
- Cuperus, J. T., Carbonell, A., Fahlgren, N., García-Ruiz, H., Burke, R. T., Takeda, A., ... & Carrington, J. C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature structural & molecular biology*, *17*(8), 997-1003.
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, *39*(2), W155-W159.
- Ding, Y., Tao, Y., & Zhu, C. (2013). Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of experimental botany*, *64*(11), 3077-3086.
- Eldem, V., Akçay, U. Ç., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S., & Unver, T. (2012). Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PLoS one*, *7*(12), e50298.
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E. R., Simon, S. A., ... & Matzke, M. (2011). AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, *6*(10), e25730.

- FAO. (2013). *Sustainability dimensions*. February 5<sup>th</sup>, 2016, de FAO. Website: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e04.pdf>
- FAOLAND & WATER. (2013). *Drought*. February 5<sup>th</sup>, 2016, de FAO. Website: <http://www.fao.org/docrep/017/aq191e/aq191e.pdf>
- Farooq, M., Aziz, T., Basra, S. M. A., Cheema, M. A., & Rehman, H. (2008). Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 161-168.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. In *Sustainable Agriculture* (pp. 153–188). Netherlands: Springer.
- Ferdous, J., Hussain, S. S., & Shi, B. J. (2015). Role of microRNAs in plant drought tolerance. *Plant biotechnology journal*, 13(3), 293-305.
- Ferreira, T. H., Gentile, A., Vilela, R. D., Costa, G. G. L., Dias, L. I., Endres, L., & Menossi, M. (2012). microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). *PLoS One*, 7(10), e46703.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- García-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., González, V. M., ... & Alioto, T. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(29), 11872-11877.
- German, M. A., Pillay, M., Jeong, D. H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., ... & De Paoli, E. (2008). Global identification of microRNA–target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nature biotechnology*, 26(8), 941-946.
- Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., & Zhang, C. (2005). Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169(2), 313-321.
- González-Ibeas, D., Blanca, J., Donaire, L., Saladié, M., Mascarell-Creus, A., Cano-Delgado, A., ... & Aranda, M. A. (2011). Analysis of the melon (*Cucumis melo*) small RNAome by high-throughput pyrosequencing. *BMC genomics*, 12(1), 393.
- Gorantla, M., Babu, P. R., Lachagari, V. R., Reddy, A. M. M., Wusirika, R., Bennetzen, J. L., & Reddy, A. R. (2007). Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of experimental botany*, 58(2), 253-265.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*, 36(1), D154-D158.
- Hamilton, E. W., & Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, 126(3), 1266-1274.
- Herranz, M. C., Navarro, J. A., 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(1), 117.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.
- Hu, W., Wang, T., Xu, J., & Li, H. (2014). MicroRNA mediates DNA methylation of target genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 444(4), 676-681.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2012). Cyclophilin 40 facilitates HSP90-mediated RISC assembly in plants. *The EMBO journal*, 31(2), 267-278.
- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M. C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhashi, I., ... & Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular cell*, 39(2), 282-291.

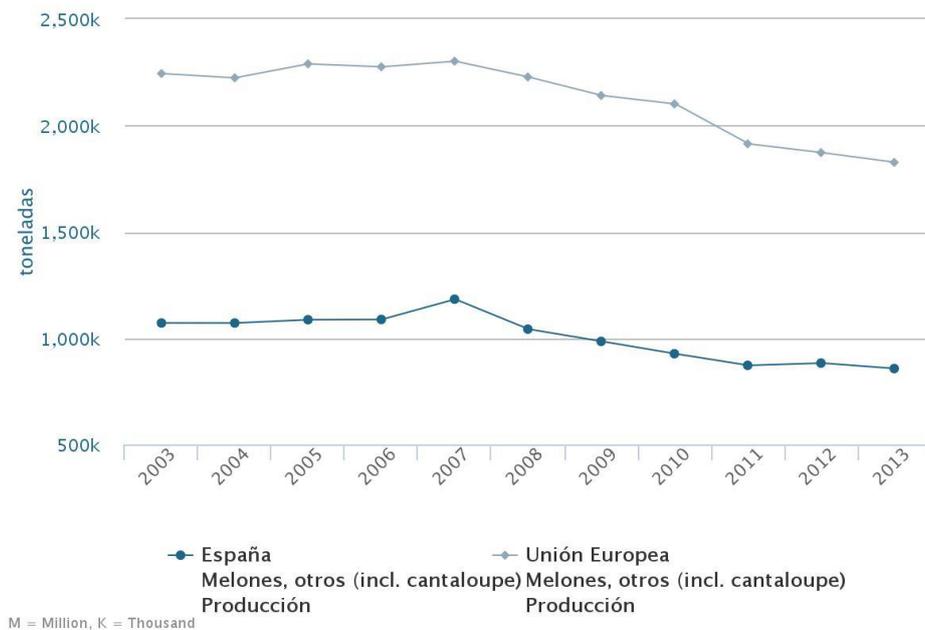
- Karginov, F. V., Cheloufi, S., Chong, M. M., Stark, A., Smith, A. D., & Hannon, G. J. (2010). Diverse endonucleolytic cleavage sites in the mammalian transcriptome depend upon microRNAs, Drosha, and additional nucleases. *Molecular cell*, *38*(6), 781-788.
- Kavar, T., Maras, M., Kidrič, M., Šuštar-Vozlič, J., & Meglič, V. (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, *21*(2), 159-172.
- Kim, Y. J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S. Y., Mo, B., & Chen, X. (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO journal*, *30*(5), 814-822.
- Kulcheski, F. R., Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., ... & Abdelnoor, R. V. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC genomics*, *12*(1), 307.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., & Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *Rna*, *12*(2), 206-212.
- Lanet, E., Delannoy, E., Sormani, R., Floris, M., Brodersen, P., Crété, P., ... & Robaglia, C. (2009). Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *The Plant Cell*, *21*(6), 1762-1768.
- Larcher, W. (2000). Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant biosystems*, *134*(3), 279-295.
- Levitt, J. (1972). Physiological Adaptations. (Book Reviews: Responses of Plants to Environmental Stresses). *Science*, *177*, 786.
- Li, S., Liu, L., Zhuang, X., Yu, Y., Liu, X., Cui, X., ... & Zhang, F. (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell*, *153*(3), 562-574.
- Liang, G., He, H., & Yu, D. (2012). Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, *7*(11), e48951.
- Liu, C., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of *Arabidopsis* Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant physiology*, *159*(2), 748-758.
- Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, *14*(5), 836-843.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., ... & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, *305*(5689), 1437-1441.
- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., & Carrington, J. C. (2007). Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*, *52*(1), 133-146.
- Liu, Q., Zhang, Y. C., Wang, C. Y., Luo, Y. C., Huang, Q. J., Chen, S. Y., ... & Chen, Y. Q. (2009). Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS letters*, *583*(4), 723-728.
- Lu, S., Li, Q., Wei, H., Chang, M. J., Tunlaya-Anukit, S., Kim, H., ... & Yeh, T. F. (2013). Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10848-10853.
- Lu, S., Sun, Y. H., & Chiang, V. L. (2008). Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *The Plant Journal*, *55*(1), 131-151.
- Lv, D. K., Bai, X., Li, Y., Ding, X. D., Ge, Y., Cai, H., ... & Zhu, Y. M. (2010). Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*, *459*(1), 39-47.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, *17*(5), 1360-1375.
- Mao, W., Li, Z., Xia, X., Li, Y., & Yu, J. (2012). A combined approach of high-throughput sequencing and degradome analysis reveals tissue specific expression of microRNAs and their targets in cucumber. *PloS one*, *7*(3), e33040.

- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS letters*, 580(10), 2442-2450.
- Maroco, J. P., Pereira, J. S., & Chaves, M. M. (2000). Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4 Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45(2), 119-137.
- Martínez, G., Forment, J., Llave, C., Pallás, V., & Gómez, G. (2011). High-throughput sequencing, characterization and detection of new and conserved cucumber miRNAs. *PLoS One*, 6(5), e19523.
- Mattick, J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human molecular genetics*, 15(1), R17-R29.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., ... & Chen, S. (2008). Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133(1), 116-127.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., ... & Ré moué, K. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101(5), 533-542.
- Moxon, S., Schwach, F., Dalmay, T., MacLean, D., Studholme, D. J., & Moulton, V. (2008a). A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. *Bioinformatics*, 24(19), 2252-2253.
- Moxon, S., Jing, R., Szittya, G., Schwach, F., Pilcher, R. L. R., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008b). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome research*, 18(10), 1602-1609.
- Nilsen, E. T., & Orcutt, D. M. (1996). *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. New York, NY: John Wiley and Sons Inc.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & development*, 16(13), 1616-1626.
- Ren, G., Xie, M., Dou, Y., Zhang, S., Zhang, C., & Yu, B. (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12817-12821.
- Reynoso, M. A., Blanco, F. A., Bailey-Serres, J., Crespi, M., & Zanetti, M. E. (2013). Selective recruitment of mRNAs and miRNAs to polyribosomes in response to rhizobia infection in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 73(2), 289-301.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25(7), 2383-2399.
- Samuel, D., Ganesh, G., Yang, P. W., Chang, M. M., Wang, S. L., Hwang, K. C., ... & Chang, D. K. (2000). Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Science*, 9(2), 344-352.
- Sattar, S., Song, Y., Anstead, J. A., Sunkar, R., & Thompson, G. A. (2012). *Cucumis melo* microRNA expression profile during aphid herbivory in a resistant and susceptible interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(6), 839-848.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat methods*, 9(7), 671-675.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Shuai, P., Liang, D., Zhang, Z., Yin, W., & Xia, X. (2013). Identification of drought-responsive and novel *Populus trichocarpa* microRNAs by high-throughput sequencing and their targets using degradome analysis. *BMC Genomics*, 14(1): 233.
- Smirnov, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.

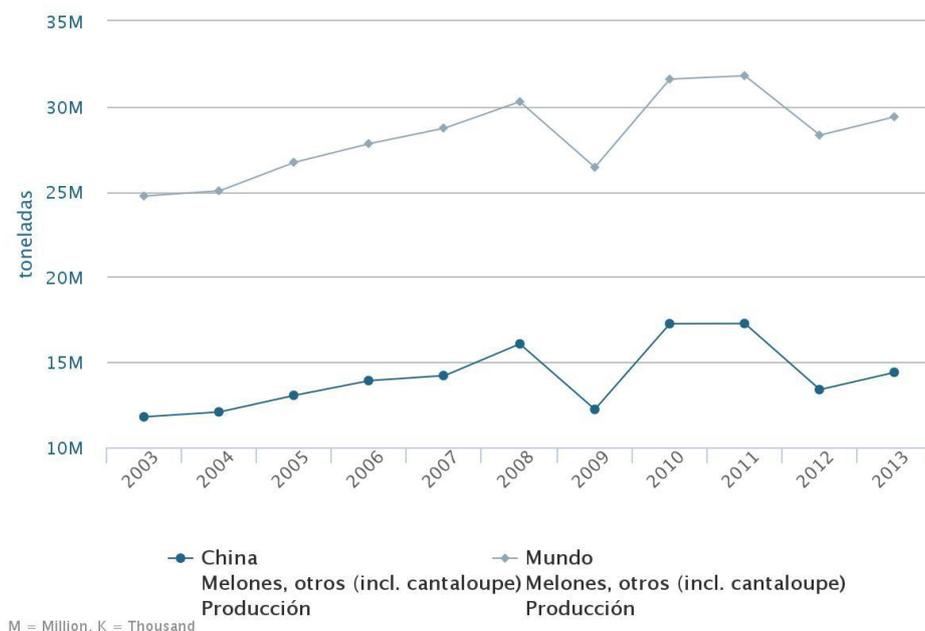
- Song, C., Wang, C., Zhang, C., Korir, N. K., Yu, H., Ma, Z., & Fang, J. (2010). Deep sequencing discovery of novel and conserved microRNAs in trifoliolate orange (*Citrus trifoliata*). *BMC genomics*, *11*(1), 431.
- Stocks, M. B., Moxon, S., Mapleson, D., Woolfenden, H. C., Mohorianu, I., Folkes, L., ... & Moulton, V. (2012). The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics*, *28*(15), 2059-2061.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in plant science*, *12*(7), 301-309.
- Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *16*(8), 2001-2019.
- Szittyá, G., Moxon, S., Santos, D. M., Jing, R., Fevereiro, M. P., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008). High-throughput sequencing of *Medicago truncatula* short RNAs identifies eight new miRNA families. *BMC genomics*, *9*(1), 593.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant and cell physiology*, *49*(4), 493-500.
- Thiebaut, F., Grativol, C., Tanurdzic, M., Carnavale-Bottino, M., Vieira, T., Motta, M. R., ... & Martienssen, R. A. (2014). Differential sRNA regulation in leaves and roots of sugarcane under water depletion. *PLoS one*, *9*(4), e93822.
- Thieme, C. J., Schudoma, C., May, P., & Walther, D. (2012). Give It AGO: The search for miRNA-Argonaute sorting signals in *Arabidopsis thaliana* indicates a relevance of sequence positions other than the 5'-position alone. *Front Plant Sci*, *3*, 272.
- Turner, N. C. (1986). Crop water deficits: a decade of progress. *Advances in agronomy (USA)*.
- Turner, N. C., Wright, G. C., & Siddique, K. H. M. (2001). Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. *Advances in Agronomy*, *71*, 194-233.
- Vázquez, F., Blevins, T., Ailhas, J., Boller, T., & Meins, F. (2008). Evolution of *Arabidopsis* MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic acids research*, *36*(20), 6429-6438.
- Vázquez, F., Gascioli, V., Crété, P., & Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology*, *14*(4), 346-351.
- Vaucheret, H., Vázquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & development*, *18*(10), 1187-1197.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*(4), 669-687.
- Wahid, A., & Close, T. J. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum*, *51*(1), 104-109.
- Wang, C. Y., Zhang, S., Yu, Y., Luo, Y. C., Liu, Q., Ju, C., ... & Chen, Y. Q. (2014). MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant biotechnology journal*, *12*(8), 1132-1142.
- Wang, J. W., Wang, L. J., Mao, Y. B., Cai, W. J., Xue, H. W., & Chen, X. Y. (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *17*(8), 2204-2216.
- Wang, L., Mai, Y. X., Zhang, Y. C., Luo, Q., & Yang, H. Q. (2010). MicroRNA171c-targeted SCL6-II, SCL6-III, and SCL6-IV genes regulate shoot branching in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, *3*(5), 794-806.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2011). Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC genomics*, *12*(1): 367.

- Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K., & Weigel, D. (2010). Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *20*(1), 42-48.
- Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(11), 4034-4039.
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., & Qi, Y. (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Molecular cell*, *38*(3), 465-475.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, *13*(1), 134.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2007). Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO journal*, *26*(6), 1691-1701.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*, *61*(15), 4157-4168.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, *53*, 247.

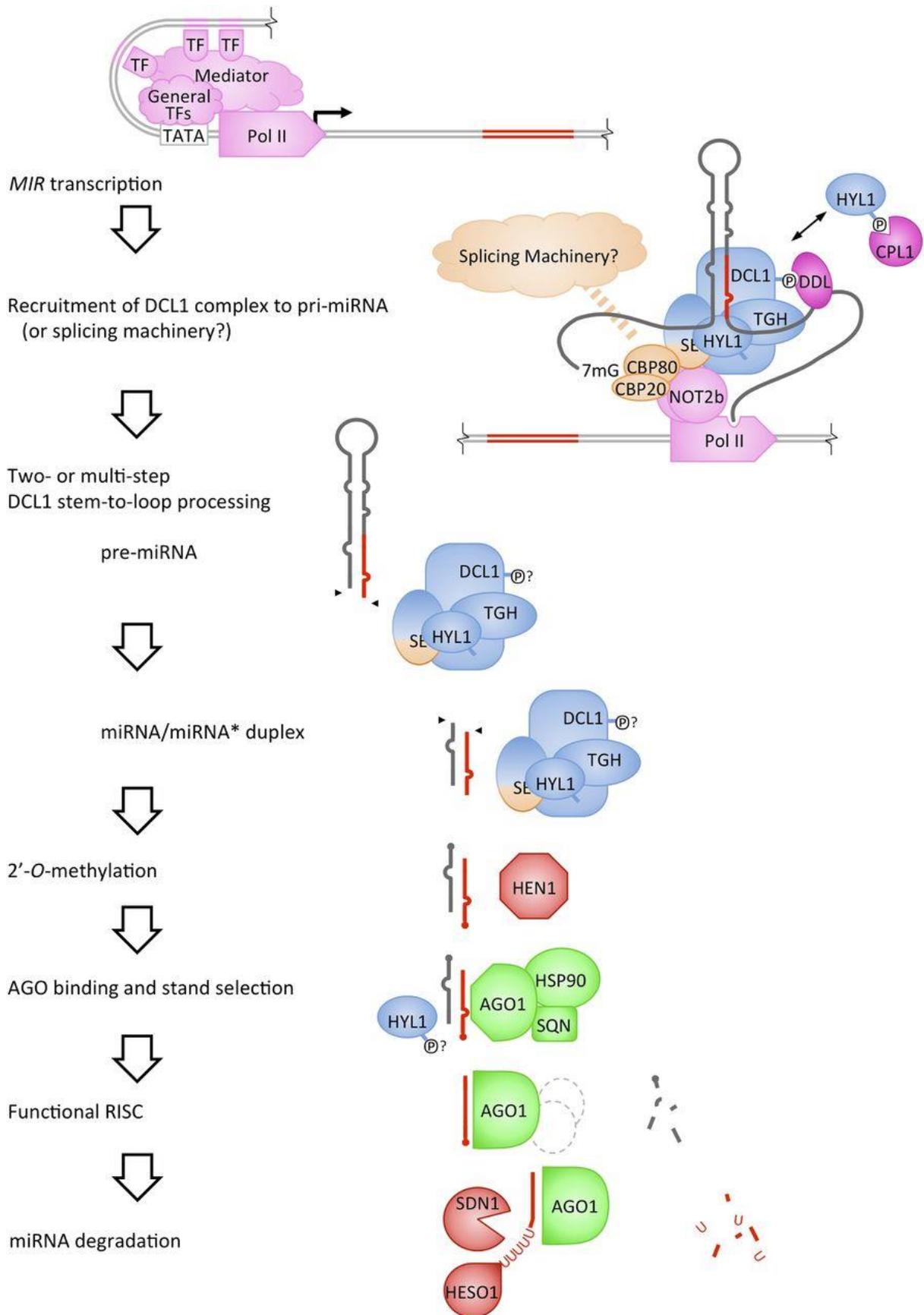
## FIGURAS SUPLEMENTARIAS



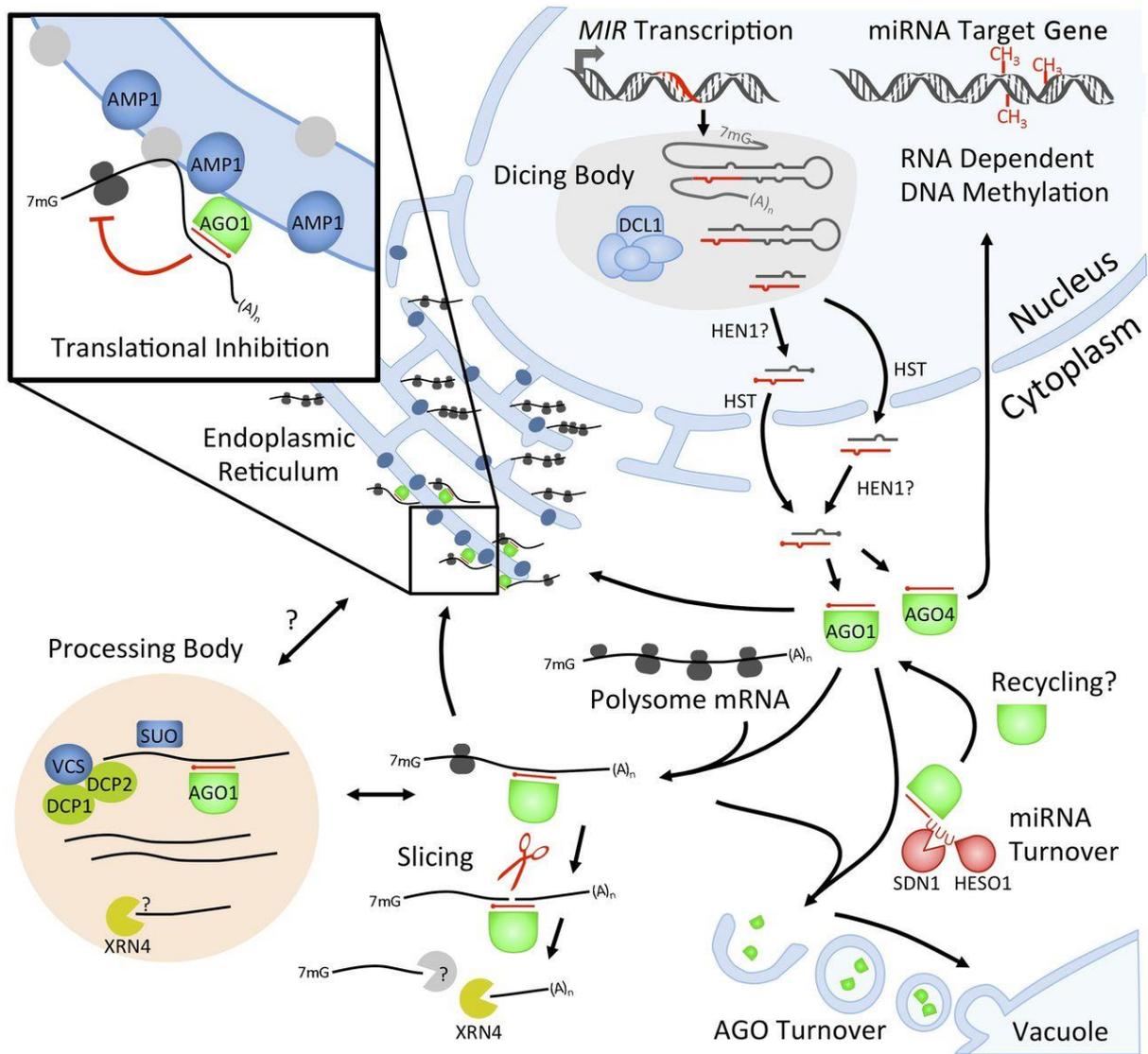
**Fig. S1:** representación de la producción española de melón frente la de la UE entre 2003 y 2013. Tomada de FAOSTAT.



**Fig. S2:** representación de la producción española de melón frente la de la UE entre 2003 y 2013. Tomada de FAOSTAT. Resulta interesante ver lo determinante que es la producción de este país al coincidir sus altibajos a la perfección con la producción global.



**Fig. S3:** esquema de la biogénesis de miRNAs en plantas, tomado de Rogers y Chen (2013).



**Fig. S4:** esquema de los distintos mecanismos de regulación génica mediada por miRNAs en plantas, tomado de Rogers y Chen (2013).