

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



Autor: Sanz Rodríguez, Andrés

Directores: Dr. Gustavo Germán Gómez & Dra. M<sup>a</sup> Carmen Marqués Romero

Tutor: Dr. José Miguel Mulet

Máster de Biotecnología Molecular y Celular en Plantas

Curso académico: 2015-2016 Valencia



## **Agradecimientos:**

Gracias en primer lugar a Gustavo Gómez por aceptarme en el laboratorio para realizar este trabajo y a su gran labor como tutor, especialmente por el esfuerzo realizado para inculcar conocimiento e instruirme en el funcionamiento del laboratorio .

En segundo lugar quiero dar las gracias a M<sup>a</sup> Carmen Marqués por ser una gran persona con actitud siempre positiva que me ayudó siempre que pudo en la realización de esta memoria. Sin ella todo habría sido mucho más difícil.

Quiero agradecer además del resto de compañeros del grupo por hacerme un sitio entre ellos y ser unos compañeros magníficos.

Gracias a mi familia y amigos, por su apoyo encomiable y estar cuando los necesité.

Gracias a todos vosotros por hacer posible la realización de esta memoria.



# Índice:

<b>Resumen:</b>	4
<b>1: Introducción:</b>	5
1.1: El estrés salino	5
1.2: Respuesta de las plantas al estrés salino y métodos de mejora	6
1.3: El cultivo del melón	10
1.4: RNAs no codificantes	11
1.4.1: Biosíntesis de los siRNAs	12
1.4.2: Biosíntesis de los miRNAs	13
1.4.3: Mecanismos de acción de los sncRNAs	14
1.4.4: sncRNAs y el estrés salino	15
<b>2:Objetivos:</b>	16
<b>3: Material y métodos:</b>	17
3.1: Material vegetal	17
3.2: Tratamiento de las semillas	17
3.3: Siembra de las plántulas	17
3.4: Tratamiento de las plantas	18
3.5: Extracción de ARN	19
3.6: Aislamiento de pequeños RNAs	20
3.7: Secuenciación	20
3.8: Tratamiento informático	21
3.9: Análisis del ARN y reacción RT	21
3.10: PCR semicuantitativa	22
3.11: Extracción y purificación de bandas	24
3.12: Análisis de los datos	24
<b>4: Discusión y resultados:</b>	25
4.1: Diseño experimental, análisis fenotípico y toma de muestras	25
4.2: Análisis preliminar de la naturaleza de las secuencias de sRNAs	27
4.3: Expresión diferencial de pequeños RNAs e identificación de miRNAs	30
4.4:Niveles de expresión de las dianas seleccionadas para validación	34
4.4.1:Evaluación del cDNA por amplificación de genes control	34
4.4.2: mir156e y su diana <i>SPL9</i>	36
4.4.3:mir395c y su diana <i>APS1</i>	37
4.4.4:mir166b y su diana <i>ZNRD1</i>	39
<b>5: Conclusiones:</b>	40
<b>6: Bibliografía:</b>	41
<b>7: Anexos:</b>	50



## Resumen:

Desde la antigüedad la salinización del terreno ha supuesto un importante limitante en la producción agrícola. En la actualidad el área afectada por este problema es superior a 800 millones de hectáreas pero esta superficie se incrementa año tras año. Por esta razón es fundamental conocer en profundidad cómo afecta la salinidad a las plantas así como las respuestas que se desencadenan en ellas frente a una situación de estrés, principalmente en especies de interés agrícola, pues los resultados obtenidos pueden ser rápidamente aplicados a planes de mejora. Por otra parte, el estudio de los pequeños RNAs (sRNAs) no codificantes, como reguladores de las respuestas a estrés es un campo emergente del que todavía se conoce muy poco. En este estudio se analizó el efecto del estrés salino sobre melón (*Cucumis melo*) a nivel de poblaciones de sRNAs. Para ello se secuenciaron los sRNAs presentes en las plantas sometidas a estrés, a través de herramientas bioinformáticas, se estudió la abundancia y la diversidad de las lecturas obtenidas. A partir de estas secuencias se identificaron micro RNAs (miRNAs) con expresión diferencial así como los posibles genes diana a los que podrían estar regulando. Por último se intentó validar *in vivo* los resultados predichos *in silico* mediante la evaluación por RT-PCR semicuantitativa de los niveles de transcrito de los genes diana.





# 1.- Introducción.

Desde el inicio de la agricultura la producción se ha visto limitada por diversos factores como sequías, frío, enfermedades y otros estreses a los que se encuentran sometidas las plantas. A lo largo de los años, la búsqueda de variedades más resistentes ha sido una de las vías para la mejora en la producción.

Los estreses se suelen clasificar como bióticos o abióticos. Los primeros son aquellos que presentan un origen biológico (ej. virus, bacterias, insectos, etc.), mientras que los abióticos incluyen aquellas condiciones medioambientales que reducen el crecimiento y/o rendimiento de los cultivos por debajo de los niveles óptimos (Cramer *et al.*, 2011). En la actualidad estos últimos son los principales limitantes de la producción agrícola. En concreto, se considera que estreses como el hídrico o el salino causan pérdidas anuales de entre el 30 y el 60% (Mantri *et al.*, 2008).

## 1.1.- El estrés salino.

Dentro de los estreses abióticos uno de los más importantes es el estrés salino, que es generado en las plantas como consecuencia de una concentración de sales solubles elevada en el medio. Este tipo de suelos se puede encontrar tanto a nivel del mar como en zonas de montaña y desde regiones tropicales a polares (Carillo *et al.*, 2011), aunque es en zonas áridas donde el impacto es mayor. El aporte de sales al suelo puede darse de diversas maneras, de forma natural (salinización primaria): sales depositadas por la lluvia, liberadas por la erosión de minerales o transportadas por el viento desde el mar, entre otras. O también puede deberse a prácticas humanas (salinización secundaria) como consecuencia del uso de fertilizantes minerales o por el empleo en regadío de aguas de mala calidad (Munns & Tester, 2008) añadiéndose así sales al suelo que previamente no estaban presentes en él.

Son conocidos diversos casos a lo largo de la historia donde la salinización de la tierra ha llegado a cotas tan altas como para condicionar profundamente la vida en regiones enteras. Los ejemplos abarcan desde la antigüedad, propiciando la desaparición de las civilizaciones Mesopotámica y Sumeria hace unos 5000 años (Jacobsen & Adams, 1958), hasta la actualidad, siendo uno de los casos más destacados la salinización de regiones de Kazajistán y Uzbekistán cercanas al mar Aral .

Actualmente existen unos 800 millones de hectáreas de suelo afectado por salinidad (FAO, 2008), gran parte de este suelo salino es de origen natural pero unos 45 millones de hectáreas de tierra de regadío y unos 32 millones de tierras de secano están afectadas por salinidad como resultado de la acción humana. El caso concreto de las tierras de regadío es el más evidente debido a que a pesar de ocupar sólo el 15% de la superficie cultivada (230 millones de ha) se concentra en ellas un 33% de la producción mundial de alimentos (Munns & Tester, 2008). A nivel europeo existen entre 1 y 3 millones de hectáreas afectadas, principalmente en la zona mediterránea (European Commission, 2003). En lo que respecta a España, se estima que 525 mil hectáreas de suelo de regadío se encuentran bajo riesgo alto de salinización y 105 mil se encuentran gravemente afectadas (Ladeiro, 2012). Estas zonas se encuentran principalmente en regiones áridas en el sur-sureste de España donde el empleo de agua de poca calidad y la salinización de los acuíferos por intrusiones de agua marina han contribuido fuertemente a su salinización. Adicionalmente, el aumento en la aridez como consecuencia del calentamiento global se verá reflejado en un aumento de la superficie afectada por salinidad.

## 1.2.- Respuesta de las plantas al estrés salino y métodos de mejora.

La salinidad aqueja a las plantas de diversas maneras, pero se pueden resaltar dos principales. Por un lado, una alta concentración de sales en el suelo interfiere en la captación de agua por parte de las raíces al elevar el potencial osmótico del suelo, provocando estrés hídrico. Por otra parte, la acumulación de sales dentro de la planta, especialmente en hojas de mayor edad, puede producir toxicidad iónica.

Un exceso de iones puede perturbar la síntesis proteica y dificultar la asimilación de nutrientes; así, la acumulación de  $\text{Na}^+$  inhibe la absorción de  $\text{K}^+$ , esencial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Por otra parte, el ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), interfiere en la actividad de algunas enzimas (Munns, 2005) debido a la alteración en el equilibrio entre las fuerzas hidrofóbicas y electrostáticas que sustentan la estructura de las proteínas (Conde *et al.*, 2011). Adicionalmente, el estrés salino promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Abogadallah, 2010), las cuales ejercen un efecto deletéreo sobre la planta al reaccionar con diferentes moléculas, causando peroxidación de los lípidos de membrana, oxidación de proteínas o dañando los ácidos nucleicos (Ashraf, 2009;

Munns, 2005). Todos estos efectos conducen a una senescencia prematura de las hojas así como a la aparición de clorosis y necrosis y la disminución de la capacidad fotosintética (Parida & Das, 2005; Carillo *et al.*, 2011), lo que se traduce en una reducción en el desarrollo de las plantas y por consiguiente en la producción de los cultivos.

Las plantas pueden responder ante el estrés salino a diferentes niveles. A nivel celular, modificando por ejemplo la arquitectura de la pared celular; a nivel molecular, ajustando su propio metabolismo mediante la regulación de la expresión génica; y también a nivel epigenético (Krasensky & Jonak, 2012). Todo esto con el fin último de adaptarse y sobrevivir al estrés.

A lo largo del tiempo se han considerado diferentes aproximaciones para el desarrollo de cultivos tolerantes a salinidad. Una es el empleo de programas de mejora clásica, seleccionando líneas de plantas que presentasen una mayor tolerancia a la salinidad. Así se han obtenido variedades prometedoras de maíz (Maiti *et al.*, 1996), trigo (Hollington, 2000) y arroz (Sahi *et al.*, 2006). Sin embargo es importante destacar que la mayoría de las líneas obtenidas por mejora convencional no se han probado en condiciones de campo (Ashraf & Akram, 2009).

También se ha intentado introducir genes mediante hibridación desde especies silvestres a especies comerciales, como es el caso del trigo (Wei *et al.*, 2001) o el tomate (Perez-Alfocea *et al.*, 1994), sin embargo esta aproximación no se ha traducido en la obtención de variedades tolerantes comerciales, lastradas en parte por barreras reproductivas.

Otro camino para la mejora en la tolerancia a la salinidad de las plantas es a través de la ingeniería genética, mediante la inducción de diferentes cambios metabólicos o modificando la expresión de genes implicados en la respuesta a la salinidad. A este respecto se han realizado numerosos estudios conducentes a: a) Reducir la entrada o acumulación de iones tóxicos y b) Minimizar los efectos deletéreos que éstos tienen sobre las plantas.

Existen varias rutas en la señalización del estrés salino, siendo la ruta SOS (Salt Overly Sensitive) la más común (Turan *et al.*, 2012). En esta ruta los iones son percibidos por proteínas de la membrana plasmática denominadas RLCK (Receptor-like Cytosolic Kinases) que transducen la señal empleando  $Ca^{+2}$  como mensajero, el cual, tras ser reconocido por la proteína SOS3 activa a la proteína kinasa SOS2, que

fosforila a SOS1, un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática (favoreciendo así la expulsión de iones de la célula), y a otros antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  presentes en la membrana de la vacuola (NHX) (permitiendo secuestrar iones en la vacuola) (Surekha, 2015).

Diversos estudios pusieron de manifiesto que el aumento en la acumulación de iones tóxicos en la vacuola por la sobreexpresión del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar *NHX1* de arroz (Fukuda *et al.*, 2004) y *Arabidopsis thaliana* (Xue *et al.*, 2004) aumentaba la tolerancia de estas plantas a la salinidad. Lo mismo se constató al sobreexpresar el gen *AVP1* de alfalfa, que codifica una  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa vacuolar (Bao *et al.*, 2009).

Otro componente relacionado con la señalización de la salinidad es el receptor osmosensor ATHK1, que activa la ruta de las MAP kinasas (*Mitogen Activated Protein Kinases*, MAPK) (Urao *et al.*, 1999), según la cual diferentes kinasas (MAPKKK-MAPKK-MAPK) se activan secuencialmente mediante fosforilación y modifican la actividad de algunos factores de transcripción implicados en la regulación de procesos como por ejemplo la biosíntesis de osmolitos (Whitmarsh, 2007; Zhu, 2002).

Los osmolitos compatibles, como prolina, glicina-betaína, sacarosa o trehalosa son otro elemento clave en la respuesta a estrés. En general se trata de compuestos de bajo peso molecular cuya acumulación en el citoplasma permite mantener un potencial osmótico bajo sin inhibir el metabolismo celular. Asimismo también ejercen funciones osmoprotectoras estabilizando proteínas y membranas al poder reemplazar a las moléculas de agua de su superficie (Carrillo *et al.*, 2011). Para aumentar la producción de los diferentes metabolitos se busca sobreexpresar aquellas enzimas clave en su ruta de síntesis. Así, el incremento en la concentración de prolina producido como consecuencia de la sobreexpresión del gen *P5CS* (que codifica la pirrolina-5-carboxilato sintasa), aumentó la tolerancia a salinidad en arroz, trigo y tabaco (Ashraf & Akram, 2009). Por otra parte, el aumento en los niveles de trealosa debidos a la sobreexpresión del gen *OsTPS1* (que codifica la trealosa-6-fosfato sintasa), condujo a una mejora en la tolerancia a salinidad y otros estreses en arroz (Li *et al.*, 2011).

Un punto central en la regulación de la respuesta a salinidad, al igual que en otros estreses, son los factores de transcripción. Estas proteínas permiten regular la expresión de grupos de genes, lo cual los vuelve herramientas muy útiles para el desarrollo de plantas transgénicas teniendo en cuenta que la tolerancia a la salinidad no viene regulada por un único gen. Entre las familias de factores de transcripción que

se conoce que están vinculados a la tolerancia a la salinidad se encuentran MYC, MYB, NAC o bZIP entre otras (Shureka *et al.*, 2015). Varios de estos factores se han empleado con resultados positivos para incrementar la tolerancia a salinidad. Este es el caso del factor de transcripción *SNAC2* sobreexpresado en arroz (Hu *et al.*, 2008) o *GmbZIP1* sobreexpresado en *Arabidopsis thaliana* y en tabaco (Gao *et al.*, 2011).

Asimismo, el incremento en la síntesis de antioxidantes capaces de combatir el efecto citotóxico de las especies de oxígeno reactivas que se producen durante el estrés, como es el caso de las enzimas superóxido dismutasa o la glutatión peroxidasa, ha mostrado ser una vía de la mejora en la tolerancia a diferentes estreses, incluido el salino, en diversas especies de plantas (Roxas *et al.*, 1997; Badawi *et al.*, 2004).

Se ha observado que en condiciones de estrés ocurre un aumento en la expresión de genes que codifican helicasas, correlacionándose con un aumento de tolerancia a estreses como el salino. Estas proteínas, cuya función es separar las dobles cadenas de ADN y ARN, se encuentran implicadas en procesos relacionados con la regulación de la transcripción, reparación, traducción y recombinación de ácidos nucleicos (Vashisht y Tuteja, 2006). La sobreexpresión del gen de la DNA helicasa *MCM6* en tabaco (que se induce en respuesta a salinidad pero no por sequía) produjo un incremento en la tolerancia de estas plantas a salinidad y otros estreses (Dang *et al.*, 2011).

Finalmente, otros participantes en la tolerancia al estrés que se han explorado para la producción de cultivos resistentes al estrés salino son las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) y las proteínas chaperonas. Estas primeras, aunque principalmente asociadas a la tolerancia a sequía, también participan en la tolerancia a la salinidad, contribuyendo en la renaturalización de proteínas o secuestrando iones (Dure, 1993). Sun y colaboradores (2014) sobreexpresaron el gen de una proteína LEA procedente de *Tamarix* en álamo con relativo éxito. Las segundas son conocidas como proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins, HSP*), las cuales se encuentran implicadas en diferentes procesos, destacando su colaboración en el normal plegamiento de las proteínas recién formadas. Su relación con el estrés salino es que presentan la capacidad de estabilizar y replegar proteínas y evitar la formación de agregados de proteínas (Saibil, 2013), minimizando así los efectos dañinos de dicho estrés. Un ejemplo del empleo de estas proteínas para dotar de tolerancia a salinidad lo encontramos en Jiang *et al.*, 2009, donde se expresó en *Arabidopsis* una

chaperona procedente de *Rosa chinensis* obteniéndose resistencia a diversos estreses, incluido el salino.

Todos estos esfuerzos están encaminados a reducir las pérdidas de productividad de diferentes cultivos como consecuencia de una disminución de la superficie y calidad del terreno arable como consecuencia de la salinización. Sin embargo, a pesar de los avances, siguen existiendo incógnitas en cómo lograr plantas tolerantes a la salinidad viables agrónomicamente, por lo cual se hace fundamental un mejor conocimiento de los efectos del estrés salino en las plantas y los mecanismos que se dan en ellas para regular la respuesta a dicho estrés. Ello podría dar lugar a la obtención de variedades de cultivos más tolerantes a la salinidad permitiendo su cultivo en suelos que han perdido su capacidad productiva por la salinización y así ayudar a suplir necesidades alimentarias futuras. Uno de los cultivos que podría beneficiarse de esto es el melón, sobretodo el cultivado en el área mediterránea, debido al creciente aumento de terreno salinizado, como consecuencia de intrusiones de agua marina y al empleo de agua salobre para riego entre otros factores (Rana & Katerji, 2000).

### 1.3.- El cultivo del melón.

Actualmente existen una gran cantidad de estudios centrados en el efecto de los diversos estreses en plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, a pesar de que esto supone una base, es necesario que el conocimiento adquirido en dichas especies pueda reflejarse en una mejora de la producción agrícola, por ello es necesario realizar estudios sobre especies de interés agronómico.

El melón (*Cucumis melo*) es una importante especie hortícola a nivel mundial. El género *Cucumis* pertenece a la familia *Cucurbitaceae* y contiene cerca de 50 especies entre las que se destacan por su importancia *Cucumis sativus* L. (Pepino) y *Cucumis melo* L. (melón) (the plant list, 2010). Se ha considerado tradicionalmente que el origen de *Cucumis melo* se situaba en África, pero estudios recientes empleando DNA cloroplástico muestran que Asia fue realmente su origen (Sebastian *et al.*,2010).

El melón es una planta herbácea rastrera eudicotiledónea, de la cual existen diversas variedades (Piel de sapo, cantaloup, galia) y cuyo fruto (una baya pepónide), de nombre homónimo, se emplea en alimentación.

En la actualidad se producen en el mundo 30 millones de toneladas de melones al año (Anexo 1) principalmente de las variedades Honeydew y Cantaloup siendo China el principal productor con unos 10 millones de toneladas (FAO). A nivel europeo España es el principal productor (40% de la producción europea), aunque en los últimos años su cultivo se ha reducido (Anexo 2). La variedad "piel de sapo" es la más cultivada (MAGRAMA, 2003). Por regiones la producción se concentra sobre todo en Castilla la Mancha y Andalucía con más del 60% de la producción (MAGRAMA, 2003). En el caso de la Comunidad Valenciana, su producción alcanza las 40 mil toneladas (5% de la producción española) concentradas principalmente en la provincia de Alicante (Anexo 3)(MAGRAMA, 2003).

Aparte del interés económico del melón, la reciente secuenciación de su genoma (García-Mas *et al.*, 2012), la cual aporta una importantísima herramienta para su estudio, así como la existencia de análisis previos de pequeños RNAs no codificantes presentes en melón (González-Ibeas *et al.*, 2011) han sido dos factores clave a la hora de seleccionar esta especie hortícola.

#### 1.4- RNAs no codificantes.

Además de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta a estrés salino detallados en el apartado 1.2 de la introducción, en la última década se ha avanzado mucho en la comprensión del papel que las secuencias de RNAs no codificantes (ncRNAs), término referido a aquellos RNAs que no codifican ninguna proteína, tienen en la respuesta a estrés (Mattick & Makunin, 2006; Prasanth & Spector 2007; Matsui *et al.*, 2013).

Los ncRNAs se clasifican como pequeños RNAs no codificantes (sncRNAs) o RNAs no codificantes largos (lncRNAs) según su tamaño sea inferior o superior a 40 nt respectivamente.

En plantas se considera que los lncRNAs participan en la regulación de la transcripción y se encuentran implicados en diversos procesos como la fotomorfogénesis, la vernalización o la fertilidad entre otros (Liu *et al.*, 2015). Por otra parte, los sncRNAs, participarían en la regulación postranscripcional de la expresión génica, en el mantenimiento de la estabilidad del genoma o en la iniciación del ensamblado de la heterocromatina (González-Ibeas *et al.*, 2011).

Dentro de los sncRNAs se distinguen, en función de su biogénesis, dos grupos: pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) y microRNAs (miRNAs). El descubrimiento de la existencia de estos pequeños RNAs en plantas es muy reciente, en 1999 los siRNAs (Hamilton & Baulcombe, 1999) y en 2002 los miRNAs (Reinhart *et al.*, 2002), por lo que actualmente existen lagunas sobre su biosíntesis y funciones.

#### 1.4.1.- Biosíntesis de los siRNAs.

Los siRNAs se forman a partir de RNAs de doble cadena (dcRNAs) perfectamente pareados, pudiéndose diferenciar en función del origen de dicha doble hebra y la ruta de biosíntesis distintos tipos de siRNA, entre los cuales destacan: a) *trans-acting siRNAs* (ta-siRNAs), b) *natural antisense-transcript siRNAs* (nat-siRNAs), c) *repeat-associated siRNAs* (rasiRNAs).

Los ta-siRNAs (*trans-acting siRNAs*) son siRNA que derivan de genes *TAS*. Dichos genes son transcritos por la RNA polimerasa II y la secuencia resultante es cortada por miRNAs específicos, siendo los fragmentos resultantes transformados en siRNAs por la acción secuencial de 3 proteínas (Yoshikawa *et al.*, 2005; Rajeswaran & Pooggin, 2012). El primer paso, llevado a cabo por la proteína SGS3 (*Suppressor of Gene Silencing 3*), consiste en la protección y estabilización de los fragmentos frente a su degradación por parte de RNasas (Yoshikawa *et al.*, 2005). El segundo paso es la síntesis de una cadena complementaria al fragmento dando lugar a una doble hebra de RNA, la precursora de los siRNA. Este paso es llevado a cabo por la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6) (Rajeswaran & Pooggin, 2012). La doble cadena de siRNA resultante es cortada para dar lugar a duplex de siRNA de 21nt, gracias fundamentalmente a la acción de la proteína DCL4, perteneciente a una familia de endonucleasas denominadas *Dicer-like* (DCL) (Vazquez *et al.*, 2004; Yoshikawa *et al.*, 2005).

Los nat-siRNA (*natural antisense-transcript siRNAs*) son siRNA cuya doble hebra de RNA de origen procede de la unión de dos transcritos, derivados de parejas de genes situados en hebras opuestas con regiones solapantes, denominados "*natural antisense gene pairs*" (Jen *et al.*, 2005), un ejemplo de este tipo de genes son *P5CDH* y *SRO5*. A partir del RNA de doble hebra resultante de la unión de los transcritos, se originarán siRNA de 21 nucleótidos por la actividad endonucleasa de DCL4, o de 24 nucleótidos como resultado de la acción de DCL2 (Borsani *et al.*, 2005). En la formación de ambos siRNAs participan las proteínas SGS3, RDR6, así como la RNA



polimerasa DNA-dependiente NRPD1A, aunque el rol de estas proteínas en la formación de los siRNA de 24 nt es poco conocido (Borsani *et al.*, 2005).

Otros posibles orígenes de siRNA pueden ser algunos elementos transponibles, como es el caso de los rasiRNA (*repeat-associated siRNAs*), o también pueden tener procedencia exógena, como los RNA virales o viroidales (Carthew & Sontheimer, 2009).

#### 1.4.2.- Biosíntesis de los miRNAs.

Los miRNAs se encuentran codificados por los genes *MIR*, los cuales, a través de la RNA polimerasa II, originan transcritos de cadena simple denominados pri-miRNAs, que presentan una estructura tipo *hairpin* (Fig. 1). Estos pri-miRNA son estabilizados mediante proteínas DAWDLE (DDL) (Voinnet, 2009) y procesados por endonucleasas tipo Dicer (DCL), las cuales son asistidas por las proteínas HYL, SE y TGH (Rogers & Chen, 2013) que se unen a distintas regiones del pri-miRNA promoviendo la acción de DCL o la precisión en el corte realizado (Dong *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2012). La acción de la DCL sobre los pri-miRNA da como lugar a los pre-miRNA, al cortar la estructura *stem-loop* del resto del transcrito. Estos últimos son procesados de nuevo por las DCL con la asistencia de HYL y SE (Khraiwesh *et al.*, 2012; Rogers & Chen, 2013). La longitud de las secuencias de estos dúplex dependerá del tipo de DCL que realice los cortes, siendo DCL1 la responsable en la mayoría de los miRNAs, dando lugar a fragmentos de 21 nucleótidos. Las endonucleasas DCL3, DCL2 y DCL4 dan lugar a fragmentos de 24, 22 o 21 nucleótidos respectivamente (Xie *et al.*, 2004). Estos dúplex de miRNA son 2-o-metilados por la metiltransferasa HEN1 (*Hua enhancer 1*) (Voinnet, 2009), para evitar su degradación. Los dúplex de miRNA son trasladados desde el núcleo al citoplasma, por medio de una proteína exportadora denominada HASTY (HST) (Rogers & Chen, 2013). Una vez en el citoplasma, ambas cadenas se separan; una de ellas, denominada cadena guía, constituye el miRNA funcional, la otra, denominada "*passenger*" acaba siendo degradada en la mayoría de los casos (Voinnet, 2009).

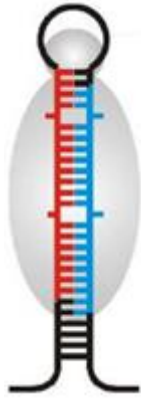


Figura 1: Estructura *hairpin* (*stem loop*), extraído de Shabalina & Koonin, 2008.

### 1.4.3.- Mecanismos de acción de los sncRNAs.

En ambos tipos de sncRNA, tanto el dúplex de siRNAs como el de miRNAs, sólo una de las cadenas, la cadena guía, se incorporará a la proteína con acción endonucleasa AGO1 (*Argonaut 1*), formándose el complejo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) del cual AGO1 es su componente catalítico (Khraiwesh *et al.*, 2012). El sncRNA guía a este complejo hasta un mRNA diana, reconocido debido a presentar una secuencia complementaria. Una vez unido RISC al mRNA diana, AGO1 puede ejercer su acción endonucleasa sobre el mRNA cortándolo entre los nucleótidos 10 y 11 en dirección 5' (Tomari & Zamore, 2005) tras lo cual la degradación se completa por acción de exonucleasas celulares (Orban & Izaurralde, 2005).

Alternativamente, RISC puede inhibir la traducción del mRNA diana. Aunque existen casos reportados de dicha actividad (Li *et al.*, 2013), el mecanismo por el cual se da esta represión en plantas es desconocido actualmente (Roger & Chen, 2013).

De ambas formas se consigue regular post-transcripcionalmente la expresión de los genes (Khraiwesh *et al.*, 2012) en lo que se conoce como silenciamiento postranscripcional del RNA.

Aparte de esta regulación postranscripcional, también se puede dar una regulación a nivel transcripcional. Esto se produce cuando un sncRNA de 24 nt (Sunkar *et al.*, 2007) se une a AGO4 o AGO6 (Zhang *et al.*, 2013) dando lugar al complejo RITS (*RNA-induced Transcriptional Silencing Complex*). La secuencia de sncRNA actúa como guía del complejo hasta una secuencia homóloga de ADN para mediar su metilación, en un proceso denominado *RNA-directed DNA methylation* (RdDM) (Khraiwesh *et al.*, 2010). En este proceso el complejo formado por la unión del sncRNA y AGO se une a la polimerasa V en el núcleo. Adicionalmente, para que

ocurrir la metilación es necesaria la asociación con el complejo DDR, formado por la proteína DRD1 (*Defective in RNA-directed DNA methylation 1*) un factor de remodelación de la cromatina, la proteína implicada en mantenimiento de la estructura cromosómica DMS3 (*Defective in Meristem Silencing 3*) y RDM1 (*RNA-directed DNA Methylation*) (Xie & Yu, 2015). Este complejo permite la separación de las hebras del DNA y con ello la interacción de la polimerasa V con el DNA, así como su actividad (Zhang *et al.*, 2013). Adicionalmente, la proteína RDM1 actúa como intermediario entre AGO y la enzima responsable de la metilación DRM2 (*Domain Rearranged Methyltransferase 2*) (Gao *et al.*, 2010). Este proceso provoca el silenciamiento transcripcional de la secuencia diana.

#### 1.4.4.- sncRNAs y el estrés salino.

Se han descrito algunos sncRNAs que ven modificados sus niveles en respuesta al estrés salino (Borsani *et al.*, 2005, Khraiwes *et al.*, 2012). De esta manera los sncRNAs pueden participar en la regulación de diversas rutas relacionadas con la tolerancia a la salinidad. Por ejemplo, el SRO5-P5CDH siRNA al ser inducido reduce la acumulación de la proteína P5CDH (*Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase*), una enzima que participa en la degradación de la prolina (Funk *et al.*, 2010), de manera que la prolina se acumula en la planta pudiendo ejercer su actividad osmoprotectora. Por otra parte, el miRNA miR169 actúa sobre el factor de transcripción NF-Y (*Nuclear Transcription Factor Y*), el cual regula la expresión de diversos genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos, afectando así al crecimiento (Sun *et al.*, 2015).

Curiosamente, los niveles de miR156 aumentan como consecuencia de un estrés salino en *Arabidopsis thaliana* mientras que se reducen ante un estrés similar en *Zea mays* (Khraiwes *et al.*, 2012). Así, se pone de manifiesto la importancia de estudiar la expresión de sRNAs no solo en plantas modelo sino también en especies agrícolas.



## 2.-Objetivos

Este trabajo forma parte de un proyecto en el cual se pretende estudiar la respuesta que se da en melón (*Cucumis melo*) a diversos estreses a nivel de pequeños RNAs con un enfoque holístico. Sin embargo en este trabajo se exponen resultados obtenidos en aquellas plantas sometidas únicamente a estrés salino. Por ello el objetivo general de este trabajo es realizar una caracterización preliminar de algunos mecanismos de respuesta a estrés salino mediados por sRNAs en melón.

Para esto se siguieron los siguientes objetivos específicos.

- 1- Exponer plantas de melón a situaciones controladas de estrés salino.
- 2- Purificar a partir de ellas extractos enriquecidos con sRNAs y someterlos a estudios de secuenciación masiva.
- 3- Caracterizar las poblaciones de sRNAs obtenidas.
- 4- Identificar potenciales miRNAs de melón con expresión diferencial en plantas expuestas a estrés salino y sus potenciales dianas.
- 5- Validar la actividad de miRNAs seleccionados mediante análisis de acumulación de los transcritos diana.



## 3.-Material y métodos:

### 3.1.-Material vegetal

Como material vegetal para este proyecto se emplearon hojas procedentes de plantas de melón *Cucumis melo* variedad Piel de sapo. Las semillas de dichas plantas fueron proporcionadas por el Dr. Monforte del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (CSIC-UPV).

### 4.2.-Tratamiento de las semillas

Las semillas empleadas fueron esterilizadas con hipoclorito sódico (NaClO) al 15% durante 15 minutos seguido de dos lavados con agua destilada. Adicionalmente, se practicó un pequeño corte en la parte apical de la semilla para facilitar el desprendimiento de la cáscara durante el crecimiento de la plántula sin que se dañasen los cotiledones. Para la pre-germinación de las semillas, éstas se mantuvieron en oscuridad a 37°C durante 2 días envueltas en papel de filtro humedecido y con una base de algodón en placas Petri. Tras este paso se mantuvieron las placas en condiciones de luz y 25°C durante un día.

### 3.3.-Siembra de las plántulas

Tras la germinación de las semillas se procedió a su traslado a un fitotrón. Previo a la siembra se extrajo la cáscara de las semillas y tras un análisis visual se descartaron aquellas plántulas con un desarrollo anómalo. Las plántulas fueron sembradas individualmente en macetas (volumen 700 ml) a una profundidad de 5cm empleando turba-perlita como sustrato.

Las plántulas utilizadas crecieron en un fitotrón sometidas a un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La temperatura en el fitotrón fue de 25°C durante las horas de luz y 20°C en oscuridad. Cada bandeja de plantas fue regada con 1,2 litros de solución salina Hoagland 3 veces a la semana.

### 3.4.-Tratamiento de las plantas

Tras 11 días de crecimiento en el fitotrón se procedió a iniciar el tratamiento. Previamente a su inicio se eliminaron aquellas plantas con crecimiento diferencial (Figura 2).

En total se emplearon 9 macetas para las plántulas control (no tratadas), colocadas sobre una bandeja, y otras 9 macetas para las plántulas con tratamiento salino, en una segunda bandeja.

Aquellas plantas no tratadas fueron regadas inicialmente con 50 ml de agua directamente en cada maceta. Las plantas con tratamiento de salinidad fueron regadas con 50 ml de cloruro de litio (200mM) directamente sobre cada maceta (pruebas previas mostraron que con dicha cantidad se lograba provocar síntomas significativos de estrés salino en las plantas).

Durante el desarrollo de las plantas, se tomaron muestras a diferentes tiempos,  $t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5$ , siendo el tiempo 0 el correspondiente a hojas de 4-5 plantas cosechadas el propio día de inicio de los tratamientos. El tiempo 1 corresponde a las hojas cosechadas a las 48 horas del inicio del tratamiento, el tiempo 2 a las 96 horas, el 3 a las 168 horas y el 4 a los 11 días. Las muestras de los tiempos del 1 al 4 corresponden a una mezcla de 3 hojas de 3 plantas diferentes expuestas a las mismas condiciones (3 réplicas de 3 hojas para cada tratamiento). La muestra de tiempo 5 fue tomada a los 13 días, en este caso se recolectó una muestra formada por una hoja de cada planta (9 hojas totales) de cada tratamiento. Las hojas empleadas corresponden a la segunda hoja por debajo del brote apical para cada planta. Sin embargo, en este trabajo, debido a su condición de acercamiento inicial, sólo se representan los resultados obtenidos de la secuenciación de las muestras del tiempo 4. Las hojas recogidas se guardaron en tubos de rosca manteniéndose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.





Figura 2: Plántulas de *Cucumis melo* previas a su tratamiento.

### 3.5.-Extracción de ARN

Tras la recolección del material vegetal se procedió a la extracción de RNA. El material vegetal (100 mg) se homogeneizó mediante el uso de mortero y nitrógeno líquido. El material homogeneizado fue transferido a un tubo *Eppendorf*. A dicho material se le añadió 1 ml de *trizol* (Tri REAGENT, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EEUU) y la mezcla se agitó con vórtex dejándose reposar 5 min. a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo al eppendorf, se mezclaron con vórtex y se incubó todo a temperatura ambiente durante 10 min. Tras ésto se centrifugó la mezcla a 13000 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo eppendorf. El paso de extracción en cloroformo se repitió una segunda vez con el fin de eliminar por completo cualquier resto de *trizol* de la muestra. La muestra de ácidos nucleicos se precipitó por adición de 500  $\mu$ l de isopropanol, dejándola reposar durante unos 10 min y centrifugándola posteriormente a 15000 rpm durante 10 min a 4°C, tras lo cual se retiró el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min a 4°C, tras lo cual se sustrajo el sobrenadante y se dejó secar para que el etanol evaporase. El pellet se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua, y el RNA se volvió a precipitar añadiendo 10  $\mu$ l de acetato sódico 3M y 300  $\mu$ l de etanol absoluto e incubando la mezcla a -80°C durante 2 horas. Tras una centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos en frío y un lavado con etanol al 70% el pellet resultante, una vez seco, se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua MilliQ libre de RNasas. El RNA total obtenido se conservó a -20°C hasta su uso para evitar la degradación.

### 3.6.-Aislamiento de pequeños RNAs

El aislamiento de pequeños RNAs de las muestras de ARN total anteriormente obtenidas se realizó empleando el kit "REALTOTAL microRNA kit" (Durviz SL, Paterna, Valencia) siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. El proceso consiste fundamentalmente en la precipitación diferencial de ácidos nucleicos según la concentración de etanol presente en la muestra, la captación en membranas de celulosa y su posterior elución.

### 3.7.-Secuenciación

La secuenciación de los pequeños RNAs de las diferentes muestras fue llevada a cabo por la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España), la cual también analizó la calidad y cantidad de snRNAs mediante un Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, California, EEUU). Para realización de la secuenciación se llevaron a cabo previamente 4 pasos. El primer paso es la "tagmentación" uniendo los extremos 3' y 5' del RNA a adaptadores. El segundo paso es la realización de una reacción de retrotranscripción para obtener cDNA a partir del RNA original (la secuenciación Illumina se realiza con DNA). Este cDNA con sus adaptadores es amplificado por PCR para crear bibliotecas indexadas de cDNA siguiendo las recomendaciones de Illumina. El 4º paso es el "*clustering*", consistente en una amplificación de las secuencias en la que cada cDNA, que corresponde a un sRNA, se unirá a un cluster diferente (regiones con múltiples copias de oligos) gracias a sus adaptadores.

Para la secuenciación de las librerías de cDNA por "paired-end sequencing" se utilizó un secuenciador HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, California, EEUU). Durante el proceso se registra la luz emitida por los nucleótidos marcados fluorescentemente, que se van añadiendo a las copias de cDNA de los diferentes clusters (gracias a que en cada clúster hay varias copias de cada cDNA siendo secuenciadas al mismo tiempo la emisión de luz es suficientemente alta como para ser detectada). Que el cDNA de cada copia de un mismo sRNA existente en la muestra se una a un cluster diferente y cada cluster al secuenciarse sea considerado una única lectura, permite conocer la abundancia de cada sRNA en la muestra, la cual se refleja a través de las CPM (cuentas por millón) calculadas en función del número de clústers con la misma secuencia.

### 3.8.-Tratamiento informático

Los datos obtenidos de la secuenciación de las muestras fueron analizados mediante el programa FastQC (Andrews, 2010) para comprobar la calidad de las lecturas obtenidas. Posteriormente el software edgeR (Robinson *et al.*, 2010) fue empleado para detectar los diferentes niveles de expresión entre tratamientos de los diferentes sRNAs. Para la detección de posibles miRNA entre todas las lecturas de sRNAs se utilizó el programa miRCat (Moxon *et al.*, 2008b).

### 3.9.-Análisis del ARN y reacción RT

Tras una nueva extracción de ARN total de las muestras se procedió a la cuantificación de las mismas mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). Se decidió juntar las muestras de cada tratamiento como paso previo a la realización de la RT, y realizar los ajustes necesarios (a través de diluciones en agua estéril) de manera que la cantidad en RNA de todas las muestras fuera la misma (350 ng).

Para la reacción de transcriptasa reversa se empleó el kit " Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso fue tratar las muestras extraídas de ARN con DNAsas (DNase I-RNase free. Thermo Scientific) para la eliminación del ADN genómico. Se adicionó DNasa I y tampón de reacción 10x a las muestras y se incubaron a 37°C durante 30 min, tras esto se les añadió 1 µL de EDTA 50mM y se incubaron durante 10 min a 65°C. Posteriormente se procedió a realizar la síntesis de cDNA a partir del ARN libre de ADN genómico. El volumen de reacción empleado fue de 20 µL incluyendo los siguientes componentes: 8 µL RNA, 1 µL oligo dT, 3 µL agua estéril, 4 µL de Reaction Buffer 5x, 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL dNTP Mix (10mM) y 1µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL). La mezcla se incubó a 42°C durante 60 minseguido de 5 min a 70°C para parar la reacción. Los productos de esta reacción se guardaron a -20°C hasta su uso.

### 3.10.-PCR semicuantitativa

Se realizaron PCR semicuantitativas de las diferentes dianas estudiadas tanto en las muestras tratadas como en las muestras control. Previamente a las PCRs, se realizaron diluciones, tanto del cDNA de las plantas control como del de las plantas tratadas, en agua MilliQ. Las diluciones fueron:1:1, 1:5 y 1:25. Para cada diana estudiada se realizaron PCRs con cada una de estas diluciones.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos eppendorf en untermociclador de PCR Mastercycler® pro S (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El volumen de reacción utilizado fue de 20 µl, incluyendo: 14 µL de agua MilliQ, 0,5 µl primer forward (10 µM) y 0,5 µl de primer reverse (10 µM)(tabla 1), 2 µl de buffer 10x, 0,5µl de taq-polimerasa, 2 µl de cDNA y 0,5 de µl dNTPs (10mM)

Los parámetros de amplificación en el termociclador fueron los siguientes:

1. 3min/94°C (desnaturalización)
  2. 30 sec/94°C (desnaturalización)
  3. 30 sec/57°C (anillamiento)
  4. 45 sec/72°C (extensión)
  5. 5min 72°C
  6. ∞min 14°C
- } 30 ciclos

Como control negativo se sometió a PCR, al igual que el resto de muestras, una reacción como las anteriores pero en vez de cDNA se añadió agua MiliQ.

Los primers específicos para las dianas estudiadas se desarrollaron empleando las herramientas bioinformáticas Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) y OligoAnalyzer 3.1® (Integrated Device Technology, San Jose, California, EEUU). Todos los primers fueron encargados a la empresa Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EEUU).

Tabla 1: Secuencias, temperatura de "melting" y % de guaninas y citosinas de los oligos de las dianas estudiadas.

Nº	Forward secuencia (5'→3')	GC%	TM	Reverse secuencia (5'→3')	GC%	TM
SPL9	GCCAACAGTGTAGCAGATTCC	52,40%	56,1°C	ATTGGTAGCGGCATGAGTTG	50%	55,6°C
APS1	TAA CAA CCC CAT CGC TGT TC	50%	55,2°C	CTC GAG CAC CTT CTC ATG TTG	52,40%	55,7°C
ZNRD1	TCCAATTTCCGCGCGTTTAG	50%	56,2°C	CAGCCGATCTCATCTGTCTGC	57,10%	57,7°C

Tabla 2: Secuencias, temperatura de "melting" de los oligos de las dianas empleadas como control.

Profilina	Forward secuencia (5'→3')	GTCGTGGCAAGTTTACGTCG	TM 56.5°C
	Reverse secuencia (5'→3')	GTAGCACTAGGAAACACACCG	TM 55.4°C
Factor de ribosilación de ADP	Forward secuencia (5'→3')	GTGAGTCCTCATATATCGCGAATGCG	TM 59.1
	Reverse secuencia (5'→3')	GATGTACCAGTGACGTTGTCGG	TM 57.7

Tras la reacción de PCR se procedió a su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v en tampón TAE (40 Mm Tris-HCl pH 7, 20 mM acetato sódico, 1Mm EDTA), empleándose bromuro de etidio para teñir el gel. Las muestras se corrieron durante 30 minutos a 130 voltios. Los geles se visualizaron en transluminador con luz ultravioleta a 250 nm.

Para cada diana estudiada se realizaron 3 réplicas (3 PCR), cada una analizada por duplicado.

### 3.11.-Extracción y purificación de bandas

Las bandas obtenidas para cada target fueron separadas de los diferentes geles mediante espátulas e introducidos en tubos de 1,5 mL. Para la extracción del DNA del gel se empleo el kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) siguiendo las instruccies del fabricante.

El DNA purificado de los diferentes targets fue llevado al servicio de secuenciación del IBMCP con el objetivo de cerciorarse que las bandas observadas han sido ampliadas correcta y específicamente.

### 3.12.-Análisis de los datos

Para el análisis de los geles se empleó la herramienta bioinformática ImageJ (Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) que permite conocer la intensidad de cada una de las bandas observadas en el gel.

A partir de dichas intensidades se utilizó el método estadístico prueba T de Student para comprobar si existían diferencias significativas entre las intensidades de las muestras tratadas y no tratadas para cada uno de las dianas estudiadas ( $p < 0.05$ ) de manera que se pueda confirmar la veracidad de las predicciones.

## 4.- Resultados y discusión:

Este trabajo de investigación está circunscrito en uno mayor cuyo objetivo principal consiste en el estudio de las variaciones que sufren las poblaciones de pequeños RNAs en plantas de melón sometidas a diferentes estreses. En concreto, se detallarán a continuación los resultados preliminares obtenidos a este respecto en plantas sometidas a estrés salino así como una primera aproximación a una validación biológica de éstos.

### 4.1.- Diseño experimental, análisis fenotípico y toma de muestras.

El estrés salino se divide en dos componentes: el estrés iónico y el estrés osmótico. Aunque una sal comúnmente empleada en estudios de las respuestas a estrés salino es el cloruro de sodio (NaCl), se ha comprobado que éste, además de afectar a la respuesta a salinidad puede alterar también rutas implicadas en la respuesta a estrés por déficit hídrico (sequía), complicando el análisis de los resultados. Así, en este experimento se empleó el cloruro de litio (LiCl) como inductor del estrés salino, pues éste activa rutas similares a las del NaCl, pero la concentración necesaria de cloruro de litio para ejercer su toxicidad iónica es una décima parte de la concentración necesaria de NaCl (Tester y Davenport, 2003). De esta forma se consigue someter a las plantas mayoritariamente al estrés iónico reduciendo el impacto del estrés osmótico.

Las plantas de melón objeto de este estudio fueron tratadas con LiCl (200mM) durante 11 días (tiempo 4), frente a las no tratadas, que se regaron únicamente con solución Hoagland (para más información consultar apartado 3.4 de materiales y métodos). Transcurrido ese tiempo se procedió a la recogida de muestras, consistente en tomar una hoja situada debajo de la segunda del brote apical de cada una de las plantas en grupos en grupos de 3 (3 réplicas de 3 hojas, cada hoja procedente de una planta distinta), que fueron inmediatamente congeladas y conservadas a -80°C para su posterior procesamiento.

Como se puede observar en la figura 3, las plantas sometidas a estrés salino durante 13 días presentaban diversos síntomas bastante significativos, entre los cuales destacan una reducción del crecimiento, pérdida de turgencia y clorosis en las hojas. El grado de estos síntomas permite asegurar que el estrés salino ha afectado de forma significativa a la plantas.

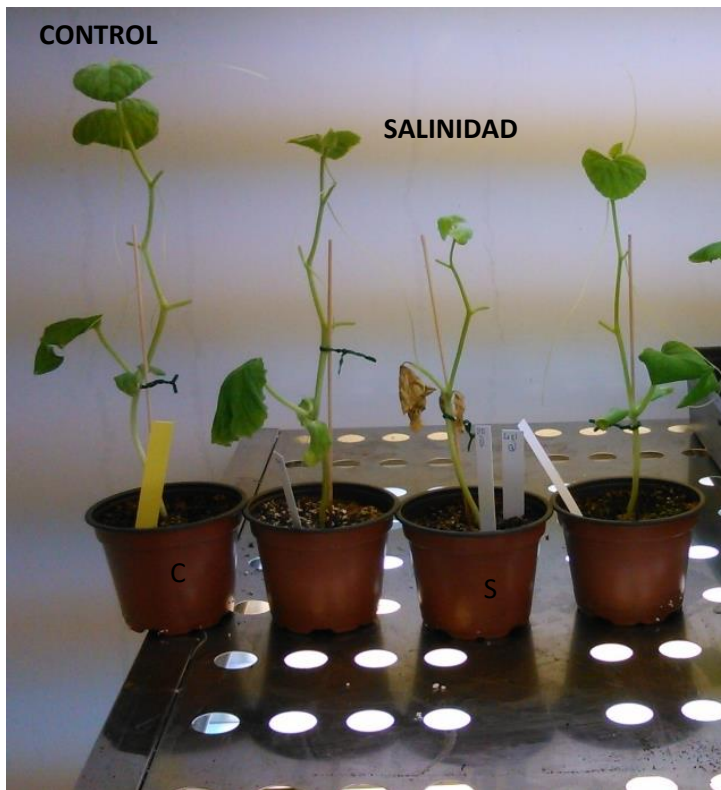


Figura 3: 1ª planta a la izquierda: Control. 3ª planta: tratamiento salinidad



## 4.2.- Análisis preliminar de la naturaleza de las secuencias de sRNAs.

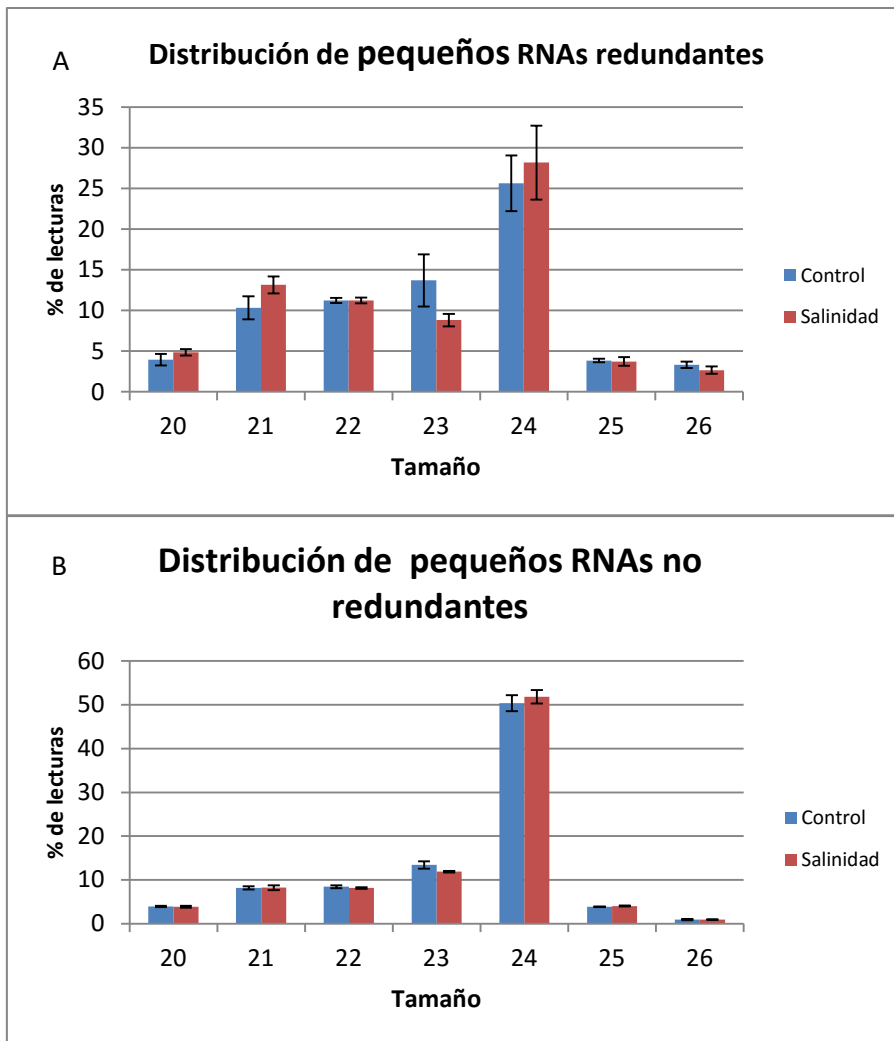
Los pequeños RNAs (sRNAs) extraídos y purificados a partir de las muestras detalladas en el apartado anterior, provenientes de plantas sometidas a estrés salino, así como plantas no tratadas, se enviaron a la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia, España), que se encargó de la generación de bibliotecas 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 los apartados de 3.5 a 3.7 de Materiales y Métodos.

A continuación, el Servicio de Bioinformática del IBMCP procedió a la "limpieza" de las secuencias (eliminación de las secuencias de los adaptadores) así como a un primer análisis de la calidad de las bibliotecas mediante el programa FastQC. Se determinó que todas ellas tenían una calidad de lectura de 37 en la escala Phred, es decir, la probabilidad de que una de las bases de una secuencia sea errónea es menor del 0,02%, lo cual está dentro de los límites admisibles para este tipo de análisis, por lo que se considera que la calidad de las secuencias es buena.

Como resultado de todos estos procesos se nos suministraron una serie de tablas que contenían información de los tipos de secuencias representadas en las bibliotecas, clasificadas por tamaños y número de lecturas.

En este trabajo mostramos únicamente los datos relativos a los sRNAs de tamaños comprendidos entre 20 y 26 nucleótidos, pues son los que se considera que tienen mayor relevancia biológica (Figura 4). Los tamaños menores a 20 suelen corresponder a productos de degradación (Gonzalez-Ibeas *et al.*, 2011).

Las secuencias obtenidas de las bibliotecas se engloban en dos categorías: lecturas redundantes y lecturas únicas. Las primeras incluyen todas las secuencias presentes en la biblioteca; las últimas son subconjuntos de éstas por agrupación de secuencias idénticas. Las secuencias redundantes aportan una idea de la abundancia de sRNAs mientras que las secuencias no redundantes indican la diversidad de sRNAs existente.



**Figura 4:** Distribución de tamaños de los pequeños RNAs de plantas control o tratadas con LiCl 11 días después del inicio del tratamiento. A) sRNAs totales (secuencias redundantes). B) sRNAs no redundantes (secuencias únicas). En el eje X se representan los diferentes tamaños de pequeños RNAs en número de bases. En el eje Y se representa el % de pequeños RNAs del total que tienen cada tamaño. Las barras representan las desviación estándar.

Las secuencias más abundantes fueron las de 21, 22, 23 y 24 nucleótidos tanto en plantas control como tratadas con salinidad, siendo 24 nucleótidos el tamaño mayoritario con diferencia, siendo además el tamaño que presenta una mayor diversidad de secuencias. Que las secuencias más abundantes sean de tamaños de 21-24 concuerda con lo esperado, pues dichos tamaños corresponden a los sRNA (Chen, 2005; Vaucheret, 2006) dentro de los cuales se pueden diferenciar principalmente en microRNAs (miRNAs) y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). Tanto en las plantas control como en las plantas tratadas con salinidad se observa el mayor grado de redundancia (menor proporción de secuencias únicas frente a las secuencias totales) en las secuencias de tamaños 21 y 22 nt mientras que las

secuencias de 24 nucleótidos son bastante menos redundantes(anexo 4).Por un lado esto puede indicar que los sRNAs de menor tamaño (21 y 22 nt) son producidos a partir de precursores de los cuales se escinden secuencias cortas claramente definidas (Moxon *et al.*, 2008a), estos sRNAs son frecuentemente miRNAs y normalmente tienen una alta expresión (Vaucheret, 2006). Por otro lado, la menor redundancia de algunos sRNAs (Ej. los de tamaño 24 nt) podría deberse a que estos sRNAs derivan de loci que generan poblaciones de sRNA heterogéneos (Moxon *et al.*, 2008a). Los sRNAs de mayor tamaño (como los de 24nt) se suelen asociar con procesos de metilación y con la formación de la heterocromatina (Moxon *et al.*, 2008a).

La diversidad en la frecuencia de los distintos sRNAs se ha observado en diversas especies vegetales tales como sauce (Rao *et al.*, 2014), arábidopsis (Rajagopalan *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2009) , algodón (Li *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2014), tomate (Moxon *et al.*, 2008a), vid (Pantaleo *et al.*, 2010) o en pepino (Martinez *et al.*, 2011). En dichos estudios predominan las secuencias de entre 21 a 24 nt, al igual que en nuestros resultados. La preponderancia de un tamaño de secuencias sobre otras varía en función de la especie (Ej. en la vid el tamaño más destacado es el de 21 nt mientras en algodón es el de 24 nt) así como el tipo de tejido dentro de la planta (Ej. en las hojas de tomate las secuencias más frecuentes de los pequeños RNAs son de 21 nucleótidos mientras que en su fruta las secuencias de 22 o 24 son las más frecuentes) u otros factores como las condiciones a las cuales es sometida la planta (Arenas-Huertero *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2014). Sin embargo el tamaño mayoritario suele ser de 24 nt.

En el caso concreto del melón existen varios trabajos previos en los cuales se ha observado también la predominancia de las secuencias de 21 a 24 nucleótidos. González-Ibeas y colaboradores (2011) observaron una mayor abundancia de secuencias de 21 nucleótidos en cotiledones de melón. Sin embargo, Sattar y colaboradores (2012), al estudiar la respuesta de plantas de melón frente a la alimentación de áfidos, detectaron como más abundantes las secuencias de 24 nucleótidos. Estas divergencias encontradas podrían deberse a que estos últimos emplearon hojas adultas como material de partida. Herranz y colaboradores (2015) observaron igualmente una predominancia de las secuencias de 24 nucleótidos en hojas adultas de melón, mientras que en cotiledones las secuencias de 21 nucleótidos eran las más abundantes. Diferencias en la frecuencia de pequeños RNAs entre tejidos de una misma planta se han observado anteriormente en otras plantas (Moxon *et al.*, 2008a; 11 Liang *et al.*, 2014). Herranz y colaboradores (2015) también observaron que el perfil expresión de abundancia de las secuencias cambiaba

drásticamente cuando las plantas eran infectadas con *Melon necrotic spot virus* (MNSV), disminuyendo notablemente las secuencias de 24 nucleótidos a la vez que aumentaban las de 21.

A la hora de comparar las secuencias obtenidas en las plantas control frente a las plantas tratadas, no se observan diferencias entre tratamientos cuando se considera únicamente aquellas secuencias no redundantes (figura 4b), en cambio si se tienen en cuenta las secuencias redundantes encontradas en dichas plantas (figura 4a), sí se aprecian diferencias entre tratamientos, concretamente en las secuencias de 21 y 24 donde se da un aumento de su frecuencia en las plantas tratadas con salinidad a la vez que se observa una disminución de las secuencias de 23 nucleótidos. El aumento de secuencias de 21 y 24 nucleótidos en las plantas sometidas a salinidad sugiere que se está produciendo una respuesta frente al estrés aumentándose la cantidad de miRNAs y siRNAs expresados.

### 4.3.- Expresión diferencial de pequeños RNAs e identificación de miRNAs.

El Servicio de Bioinformática del IBMCP, así como dos bioinformáticos de nuestro grupo de trabajo, sometieron las secuencias cuyo tamaño oscilaba entre 20 y 25 nucleótidos (entre las cuales se encontrarían siRNAs y miRNAs) a un análisis de expresión diferencial empleando las herramientas proporcionadas por el paquete informático edgeR (Robinson *et al.*, 2010).

Aunque ese proceso de análisis no forma parte de los resultados propios de este trabajo, considero necesario hacer una breve explicación de sus fundamentos, pues son necesarios para comprender los pasos posteriores. Así, basándose en el número de lecturas obtenidas para cada secuencia en cada una de las bibliotecas (CPM, cuentas por millón), el programa edgeR permite detectar diferencias significativas mediante la realización de estudios pareados enfrentando las réplicas de las plantas no tratadas frente a las réplicas de las plantas sometidas a estrés salino. Gracias a este proceso se obtiene el LogFoldChange (logaritmo en base 2 del ratio tratamiento/control), un valor que nos indica el grado de variación en la acumulación de una secuencia única entre los tratamientos. Un valor positivo indica un mayor número de copias en las plantas estresadas, mientras que un valor negativo es indicativo de una disminución en el número de copias como consecuencia del estrés.

Cuanto mayor es el valor absoluto de este parámetro, mayor es la diferencia observada entre las dos muestras.

Puesto que uno de los objetivos del presente trabajo de investigación consiste en la validación biológica de los resultados obtenidos *in silico*, necesitábamos identificar aquellas secuencias potencialmente funcionales en la regulación de los mRNAs y distinguirlas de las que son subproductos de degradación.

De entre todas las especies de sRNAs descritas con actividad reguladora (ver apartado 1.4 de la introducción), los miRNAs son los más extensamente caracterizados, por ello fueron nuestros primeros candidatos para empezar a hacer los estudios de actividad biológica.

Con el fin de distinguir de entre todas las secuencias obtenidas las que podrían ser verdaderos miRNAs se empleó el software miRCat (Moxon *et al.*, 2008b). Este análisis fue realizado por uno de los bioinformáticos del grupo, se describe aquí brevemente porque es necesario para comprender los resultados y la discusión posteriores. Así, basándose en características propias de los miRNAs (proceden de un locus del genoma (gen *MIR*) y de transcritos con una estructura secundaria particular), el programa mirCat permite identificar dentro del genoma los miRNAs maduros y sus secuencias precursoras; posteriormente el programa realiza una serie de análisis de los sRNA de cada locus (Ej. búsqueda de patrones de alineación de dos picos de sRNAs en una cadena del locus) y también evalúa la estructura secundaria de posibles transcritos precursores empleando los programas RNAfold y randfold (Moxon *et al.*, 2008b). Gracias a este programa se predijeron varias secuencias como posibles miRNAs (tabla 3, primeras 5 columnas), éstos son los datos que se nos proporcionaron para continuar con la validación biológica.

Basándonos en la secuencia deducida a partir del ensamblaje realizado por mirCat de las bibliotecas de melón se realizó un estudio más profundo de éstas con el fin de tener la mayor información posible. Por una parte, se buscó en la base de datos de mirBase (que contiene los datos de las distintas familias de miRNAs descritos para un amplio número de especies), el miRNA que más se pareciera a la secuencia en cuestión (tabla 3, dos últimas columnas).

Tabla 3: miRNA con expresión diferencial en salinidad y su identificación.

Bibliotecas de Cucumis melo					miRNAs asignados según mirBase	
Nombre de la secuencia	secuencia	CPM control	CPM salinidad	LogFold Change	Nombre	Secuencia
sec1141	UCUCGGACCAGGCUUCAUUCU	67.600	188.000	1,47	atr-miR166b	ucucggaccaggcuucauucc
sec4088	UCGGACCAGGCUUCAUCCCC	3150	6810	1,11	ata-miR166d-3p	ucggaccaggcuucauucccc
sec274	CAAAUUUGACGUAGGCUCU	1.790	5.660	1,66	sin identificar	-
sec3356	UGAAGUGUUUGGGGAACUC	0.9310	3.420	1,82	ata-miR395c-3p	ugaaguguuuggggaacuc
sec2196	CUUUUACUAAAGAAUACCGUG	39.300	162.000	2,05	sin identificar	-
sec4990	AUGGAACAAUGUAGGCAAGG	4.720	12.900	1,43	sin identificar	-
sec4995	AUGUAGGCAAGGAAGUCG	1.13	7.79	2,64	sin identificar	-
sec3375	UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC	10.900	28.500	1,39	atr-miR171c	ugaauugagccgccaauauc
Sasec2266	UAGCCAAAAUGACUUGCCUGC	2.190	9.350	2,05	cme-miR169l	uagccaaaaugacuugccugc
sec4404	UUGACAGAAGAUAGAGGGCAC	11.400	43.700	1,94	cme-miR156e	uugacagaagauagagggcac

Asimismo, se procedió a la búsqueda de los posibles mRNAs diana de dichos miRNAs. Para ello se empleó la herramienta bioinformática psRNA Target (Dai y Zhao, 2011), que realiza un alineamiento con secuencias de unigenes de melón (icugi) con el fin de obtener los mejores candidatos. Los parámetros empleados para la búsqueda son los que presenta por defecto el programa: a) Expectativa (E), que mide el grado de complementariedad entre el miRNA y sus posibles dianas, menor o igual a 3; b) UPE, que indica la accesibilidad del mRNA diana por el miRNA, menor a igual a 25.

A partir de las secuencias de los unigenes predichas por psRNA Target como dianas se empleó la herramienta BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) para buscar secuencias homólogas en otras especies y así poder asignarles una función (tabla 4). Obviamente, este sistema presenta algunas deficiencias, pues al tratarse de secuencias genómicas y no de transcritos pueden obtenerse resultados erróneos por mala identificación de las dianas o por mala asignación de sus funciones, pero sirvió como una primera aproximación con el fin de establecer criterios que permitieran seleccionar los mejores candidatos para llevar a cabo la validación biológica.

**Tabla 4:** Predicción de dianas para los distintos miRNA con expresión diferencial en salinidad. En fondo verde miRNA con sus dianas seleccionados para su validación. En fondo rojo miRNA que no se une a la diana predicha.

Nombre de la secuencia	Nombre CME	Dianas	Secuencia de referencia de la diana (NCBI)	E	UPE	Inhibición	Función de la diana
sec1141	atr-miR166b	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12-like	XM_008447112.1	3.0	12.737	corte	Cataliza la transcripción de DNA a RNA
sec4088	ata-miR166d-3p	homeobox-leucine zipper protein ATHB-14-like	XM_008441332.1	2.0	20.184	corte	Factor de transcripción, implicado en el estrés osmótico
sec274	sin identificar	RALF-like 34 protein	XM_008459646.1	3.0	21.475	Traducción	Proteína implicada en la señalización celular del estrés y el desarrollo
sec3356	ata-miR395c-3p	ATP sulfurylase 1	XM_008440385.1	1.0	14.67	corte	Enzima implicada en la ruta metabólica del sulfato
		low affinity sulfate transporter 3-like	XM_008455557.1	1.0	5.763	corte	Transportador de sulfato
sec2196	sin identificar	uncharacterized LOC103482706	XM_008438986.1	3.0	16.128	corte	-
sec4990	sin identificar	DNA topoisomerase 2	XM_008463589.1	3.0	17.382	corte	Enzima que participa en el relajamiento del ADN superenrollado
sec4995	sin identificar	Ningún resultado	-	-	-	-	-
sec3375	atr-miR171c	Scarecrow-like protein 6	XM_008459909.1	0.0	16.738	corte	Factor de transcripción, implicado en el desarrollo
sec2266	cme-miR169l	phosphoserine aminotransferase, chloroplastic-like	XM_008450270.1	2.5	22.216	traducción	Implicado en la ruta de biosíntesis de a serina
sec4404	cme-miR156e	squamosa promoter-binding-like protein 9	XM_008444850.1	1.5	15.408	corte	Factor de transcripción implicado en el crecimiento y el desarrollo

Atendiéndose a criterios como, importancia de la función de la diana, número total de lecturas (CPM) y grado de diferencia en los niveles entre plantas tratadas y no tratadas (LogFoldChange), se seleccionaron 3 genes candidatos a ser regulados por la acción de miRNAs de melón (ver elementos marcados con fondo verde en la tabla 4), para validar su expresión por RT-PCR semicuantitativa.

Adicionalmente, también se emplearon el factor de ribosilación del ADP y la proteína profilina como dianas de control (Tabla 5), debido a que estudios previos habían puesto de manifiesto que su expresión se mantiene constante en diferentes condiciones de estrés (Kong *et al.*, 2014).

Tabla 5: Dianas control.

Diana	Secuencia de referencia de la diana (NCBI)
Profilina	NM_001297545.1
Factor de ribosilación de ADP	XM_008463181.1

## 4.4.- Niveles de expresión de las dianas seleccionadas para validación.

Los tres genes seleccionados para la validación de los resultados obtenidos de la secuenciación de las bibliotecas de pequeños RNAs en plantas sometidas a estrés salino (figura 4), así como dos genes control, cuya expresión no varía con el estrés según estudios previos (Kong *et al.*, 2014), fueron amplificados por RT-PCR, a partir de una mezcla de RNA de las tres réplicas del experimento, usando un oligodT para la retrotranscripción y oligos específicos para la diana (ver apartado 3.9 de Materiales y Métodos).

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 5.

### 4.4.1.- Evaluación del cDNA por amplificación de genes control.

Como se aprecia en las figuras 5.1 y 5.2, según cabría esperar, no se observaron diferencias significativas ( $p$ -value mayor de 0.05 según t-test) en los valores de expresión de los genes control (profilina y factor de ribosilación del ADP) entre las muestras procedentes de plantas no tratadas y las de aquellas sometidas a estrés salino. Así, de observarse diferencias en la expresión de nuestros genes candidatos en estas dos poblaciones, éstas deberían producirse por efecto de variaciones reales en la cantidad de transcrito en las muestras y no por defectos en la cantidad o la calidad del cDNA proveniente de la RT.



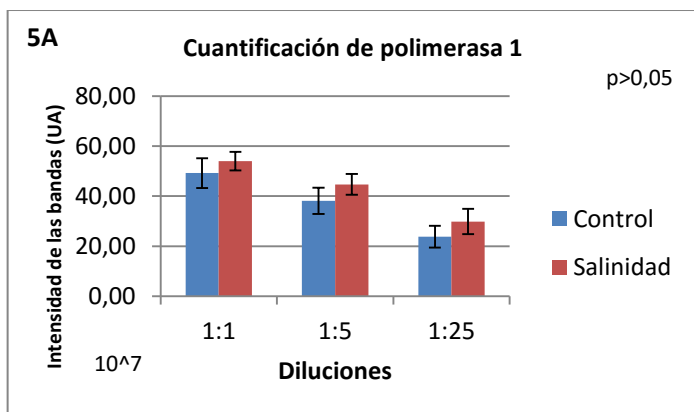
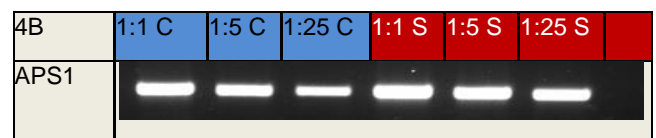
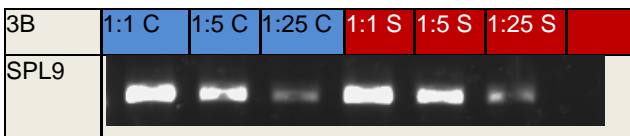
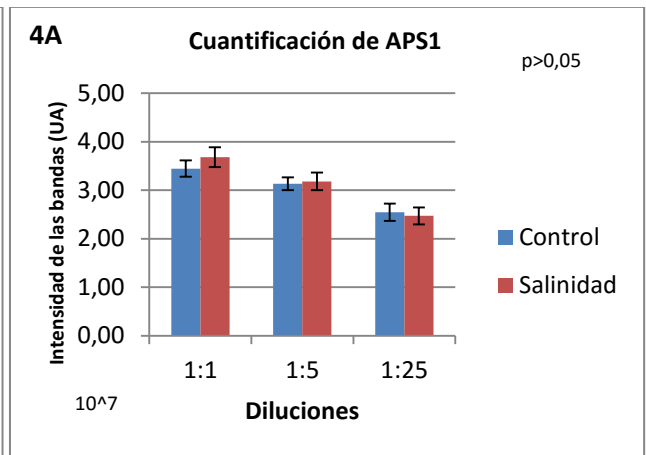
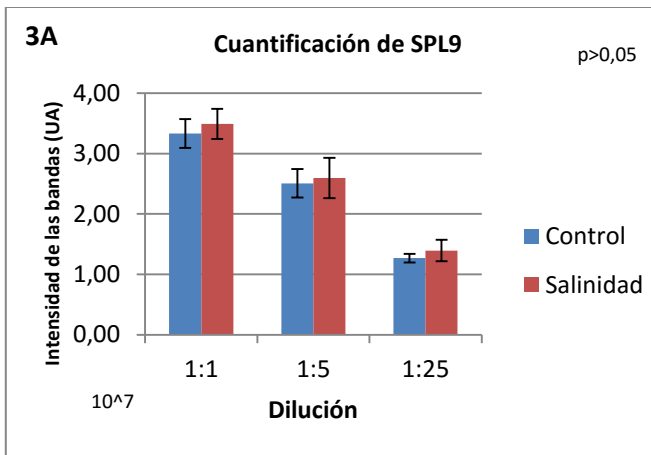
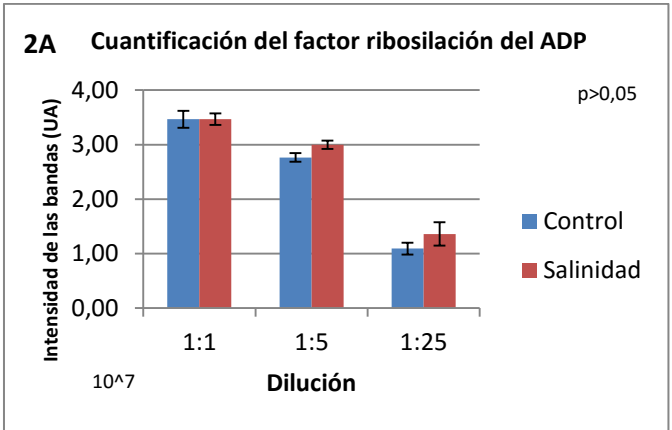
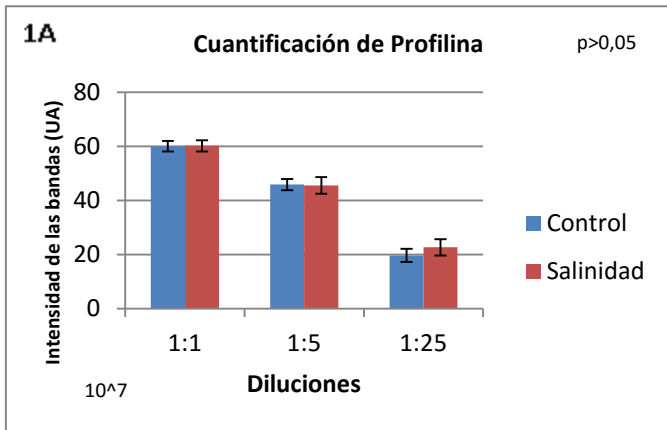
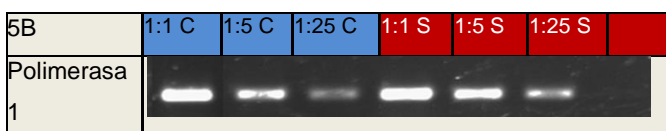


Figura 5: Resultados de la RT-PCR semicuantitativa en las dianas analizadas. Gráficas A: Intensidad de las bandas del gel según el programa ImageJ, representadas en UA (unidades arbitrarias usadas por ImageJ). Gráficas B: Imagen del gel más representativo. 1) Profilina, 2) ADP-FR, 3) SPL9, 4) APS1, 5) Polimerasa 1 (ZNRD1). Las columnas rojas muestran los resultados de las plantas tratadas con salinidad y las columnas azules las de las plantas control. Barras representan el error estándar para cada grupo de datos. La p muestra el valor de p-value según la t de Student.



#### 4.4.2.- mir156e y su diana *SPL9*.

La secuencia sec4404 fue identificada *in silico* como el miR156e de *Cucumis melo*. La secuencia de este miRNA difiere de la descrita para otras especies, destacándose una sustitución de adenina por guanina en el nucleótido 17 (anexo 5). El miR156 ha sido asociado a diversos estreses que abarcan el estrés térmico (Stief *et al.*, 2014), el estrés salino o la sequía (Covarrubias & Reyes, 2010; Wang *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012) entre otros. Esto podría indicar que se trata de uno de los actores generales en la respuesta a estrés. También se ha observado que su sobreexpresión se relaciona con retrasos en la floración o reducción de la dominancia apical (Schwab *et al.*, 2005).

Nuestros resultados muestran un aumento del miR156 en las plantas sometidas a estrés salino (1,94 log fold change). Este incremento de miR156 en plantas crecidas en un ambiente salinopodría ser un mecanismo de defensa mediante el cual las plantas, para soportar mejor las condiciones del estrés, prolongarían su etapa juvenil, suprimiendo la reproducción, hasta que la situación de la planta fuera más favorable (Cui *et al.*, 2014). Existen un par de trabajos en los cuales se observó también un aumento de este miRNA en condiciones de estrés salino (Cui *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014), aunque también hay otros en los que se describe precisamente lo contrario (Ding *et al.*, 2009).

En este trabajo se predijo como posible diana de miR156e el mRNA de *SPL9* (*Squamosa Promoter binding-like protein 9*). Este factor de transcripción forma parte de una amplia familia cuyos componentes presentan diversas funciones en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, que abarcan desde el tiempo de floración hasta la acumulación de biomasa, pasando por el desarrollo de tricomas (Preston & Hileman, 2013; Wang *et al.*, 2015). En el caso concreto de *SPL9* parece estar implicado, entre otras funciones, en la duración del plastocrono (intervalo de tiempo entre la aparición de dos primordios foliares consecutivos), también parece tener un papel relevante interfiriendo en la acumulación de antocianinas en tejidos vegetativos (Gou *et al.*, 2011), en la iniciación de tricomas (Yu *et al.*, 2010) o en el momento de floración (Schwarz *et al.*, 2008).

En trabajos previos ya se había informado de la presencia de sitios de unión de miR156, y también de otro miRNA, mir157, en mensajeros de diferentes miembros de la familia de SPLs (Wang *et al.*, 2015; Preston & Hileman, 2013). Curiosamente, se ha observado en *Arabidopsis* que a la vez que *SPL9* es regulado por miR156, este factor de transcripción regula la expresión de otro miRNA, miR172 (Wu *et al.*, 2009) implicado

en el desarrollo de las hojas, lo que aporta una idea de la complejidad de la regulación mediada por miRNAs.

Según nuestros resultados la acumulación del transcrito de *SPL9* (figura 5.3) no muestra diferencias entre las plantas sometidas a estrés salino y las plantas control ( $p > 0,05$  según t-test). Esto no concuerda con lo esperado, pues la previsión era la de una correlación negativa entre la expresión del miR156 y su diana. Sin embargo, esta relación de aumento de miR156 y disminución de *SPL* en condiciones de salinidad sí se ha puesto de manifiesto en un estudio previo (Cui *et al.*, 2014), aunque en ese caso el inductor de salinidad era NaCl en lugar de LiCl.

Dada la complejidad existente en las rutas de señalización y de regulación génica, no debe extrañarnos que en ocasiones los resultados no concuerden con la hipótesis simplista de que un incremento en los niveles de un miRNA deben venir siempre acompañados de una disminución en la acumulación del mRNA de su diana. Particularmente en el caso del miR156 y de su diana *SPL9*, para los que ya se acumulan datos previos de fenómenos de cruce de rutas.

#### 4.4.3.- mir395c y su diana *APS1*.

La secuencia sec3356 de nuestras bibliotecas de sRNAs presentó una gran homología con el miRNA *ata-miR395c-3p*. En melón se han identificado 6 isoformas de miR395 pudiéndose dividir en dos grupos bastante similares entre sí, variando únicamente en el nucleótido en posición 5' (anexo 6). La inducción de diferentes isoformas de miR395 se ha vinculado profundamente a condiciones de privación de sulfato (Liang *et al.*, 2010; Kawashima *et al.*, 2011). Adicionalmente, también se ha asociado a otros estreses, como el estrés salino (Ding *et al.*, 2009) o la sequía (Xie *et al.*, 2014).

Nuestros resultados muestran un aumento de miR395 en las plantas sometidas a estrés salino (1,82 log fold change). En la literatura existente se aprecia diversidad en los resultados para la expresión de miR395 en salinidad, desde no distinguirse diferencias significativas entre plantas control y tratadas (Xie *et al.*, 2014), pasando por trabajos que concuerdan con nuestros resultados (Ding *et al.*, 2009), hasta trabajos donde se observó el efecto contrario, asociado a niveles elevados de sal en el medio (Wang *et al.*, 2013).

En este trabajo se predijo que una de las posibles dianas del miR395c sería el mRNA de *Cucumis melo APS1* (*ATP sulfurylase 1*). Esta proteína se encuentra localizada en

los cloroplastos y es la diana que se empleó para la validación de los resultados. Otra diana predicha en este trabajo para el miR395c fue el mRNA del transportador de baja afinidad de sulfato *SULTR3*(o *AST*). Ambos genes codifican enzimas implicadas en la ruta metabólica del sulfato (Liang *et al.*, 2010) y se han descrito previamente en la literatura como dianas de la acción de miR395 (Jones-Rhoades & Bartel, 2004).

En concreto, la ATP sulfurilasa es la primera enzima en la ruta de asimilación del sulfato en las plantas, cataliza la activación del sulfato y produce adenosine-5'-phosphosulfate que posteriormente es reducido a  $S^{2-}$ . Gracias a esta ruta las plantas adquieren el  $S^{2-}$  necesario para las síntesis de cisteína, metionina o GSH (glutación) u otros metabolitos (Saito, 2004). Liang y colaboradores (2010) observaron que tanto en plantas en las cuales las diferentes APS estaban inhibidas, como en plantas que sobreexpresaban miR395, se sobreacumulaba sulfato en los tallos y sin embargo en dichas plantas aparecían síntomas de deficiencia en S (clorosis y reducción de crecimiento) indicando que la asimilación del sulfato estaba reprimida.

Por otro lado, los transportadores de sulfato de baja afinidad (*SULTR*) sirven para transportar por el xilema el sulfato y son los responsables de la translocación del sulfato desde las hojas senescentes hacia hojas jóvenes (Liang *et al.*, 2010).

En nuestros resultados, la acumulación del transcrito de *APS1*(figura 5.4) no muestra diferencias entre las plantas sometidas a salinidad y las plantas control ( $p\text{-value}>0,05$  según t-test). Esto no concuerda con lo esperado, pues la previsión existente era la presencia de una correlación negativa entre la expresión del miR395 y su diana. Esta relación entre el aumento de miR395 y disminución de la ATP sulfurilasa en condiciones de estrés se ha observado en trabajos previos (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Liang *et al.*, 2010). Sin embargo también se han descrito casos en los cuales, ante un incremento en la expresión del miR395, la expresión de sus dianas no se veía alterada y en algunos casos incluso aumentaba (Kawashima, *et al.*, 2011).

Así, nos encontramos ante un caso de nuevo en el que no ha sido posible establecer una relación directa entre secuencia de sRNA y mRNA diana. Ésto, que ya había sido descrito en otros trabajos, es otro ejemplo de la complejidad de los mecanismos de regulación génica.

#### 4.4.4.- mir166b y su diana *ZNRD1*.

La secuencia sec1141 fue identificada como el atr-miR166b. Nuestros resultados muestran un aumento del miR166 en las plantas sometidas a estrés salino (1,47 log fold change), lo cual concuerda con trabajos previos (Mangrauthis *et al.*, 2013; Kitazumi *et al.*, 2015). Los miR166 se han encontrado en múltiples especies, desde papaya a tabaco pasando por *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2005; Aryal *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012), y se han asociado a diferentes procesos como la fertilidad (Achard *et al.*, 2004), el desarrollo de las hojas (Mallory *et al.*, 2004) o el de las raíces (Hussain *et al.*, 2015) entre otros. También se han observado variaciones en los niveles de estos miRNA en diferentes condiciones de estrés como sequía (Bertolini *et al.*, 2013), por metales pesados (Zhou *et al.*, 2008) o en el estrés salino, donde se vio que plantas tolerantes a salinidad presentaban una reducción en los niveles de miR166 (Ding *et al.*, 2009).

En este trabajo se predijo mediante un análisis *in silico* empleando la herramienta bioinformática psRNATarget que la diana de nuestra secuencia correspondía al mRNA de la subunidad 1 de la RNA polimerasa DNA dependiente tipo RPA12 (también llamada *Zinc ribbon domain-containing protein 1*, *ZNRD1*) de *Cucumis melo*. Si miR166 actúa realmente sobre esta polimerasa ello implicaría que participa en la regulación de la transcripción de multitud de diferentes genes. Sin embargo, numerosos trabajos previos han predicho como dianas del miR166a miembros de la familia de factores de transcripción HD-ZIP (homeobox-leucine zipper) (Ding *et al.*, 2009; Jones-Rhoades & Bartel 2004), que se encuentran implicados en la respuesta a diversos estreses como salinidad o sequía (Harris *et al.*, 2011) e intervienen en la regulación de procesos como la expansión, división y diferenciación celular (Harris *et al.*, 2011) o la acumulación de antocianinas entre otros.

En nuestros resultados, la expresión de *ZNRD1* (figura 5.5) no muestra diferencias entre las plantas sometidas a salinidad y las plantas control (p-value >0,05 según t-test). Esto a priori no concuerda con lo esperado y al ser ésta la primera vez que se asocia esta diana con el miR166b los resultados obtenidos no se pueden correlacionar con datos previos. Aparte del posible error en la predicción de la diana, otra posible explicación es que el valor de log fold change de nuestro miRNA sea demasiado bajo (poca diferencia real entre tratamientos) de manera que mediante el método empleado (PCR semi-cuantitativa) no se puedan apreciar las diferencias existentes en la expresión de su diana. Una solución es el empleo de un método más sensible como pudiera ser una PCR cuantitativa para la medición de la expresión.



## 5.-Conclusiones:

1. Hemos logrado llevar a cabo un experimento de exposición de plantas de melón a situaciones controladas de estrés salino (LiCl), lo que provee de material biológico para la realización de diversos estudios de respuesta a este tipo de estrés en melón.
2. Se ha obtenido un mapa general de las poblaciones de sRNAs en plantas de melón sometidas a estrés salino.
3. El perfil de sRNA observado en melón es similar al encontrado en estudios previos en los cuales se empleó el mismo tipo de tejidos, siendo las secuencias de tamaño 24 las mayoritarias. Adicionalmente, es en este tamaño donde se encontró un mayor nivel de redundancia en las secuencias. Así mismo, se dio un pequeño aumento en las secuencias redundantes en las plantas tratadas a salinidad.
4. A nivel de las dianas de los miRNA no se han observado variaciones en su expresión entre tratamientos. Pudiendo deberse a diversos factores que abarcan diversas posibilidades, desde un error en la predicción de las dianas del miRNA a que el log fold change del miRNA sea demasiado bajo como para que se aprecien diferencias con la técnica empleada.





## 6.-Bibliografía:

Abogadallah, G. M. (2010). Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behav*, 5(4), 369–374.

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.

Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., & Harberd, N. P. (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 131(14), 3357-3365.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Online en <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

Arenas-Huertero, C., Pérez, B., Rabanal, F., Blanco-Melo, D., De la Rosa, C., Estrada-Navarrete, G., Sanchez, F., Covarrubias, A., & Reyes, J. L. (2009). Conserved and novel miRNAs in the legume *Phaseolus vulgaris* in response to stress. *Plant molecular biology*, 70(4), 385-401.

Aryal, R., Yang, X., Yu, Q., Sunkar, R., Li, L., & Ming, R. (2012). Asymmetric purine-pyrimidine distribution in cellular small RNA population of papaya. *RBMC Genomics*, 13(1), 682.

Ashraf, M., & Akram, N. A. (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. *Biotechnology advances*, 27(6), 744-752.

Badawi, G. H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K., & Tanaka, K. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science*, 166(4), 919-928.

Bao, A. K., Wang, S. M., Wu, G. Q., Xi, J. J., Zhang, J. L., & Wang, C. M. (2009). Overexpression of the Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 176(2), 232-240.

Bertolini, E., Verelst, W., Horner, D. S., Gianfranceschi, L., Piccolo, V., Inzé, D., Pèa, M., & Mica, E. (2013). Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular plant*, 6(2), 423-443.

Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., & Zhu, J. K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell*, 123(7), 1279-1291.

Carillo, P., Annunziata, M., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity Stress and Salt Tolerance. In: *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. Shanker, A., & Venkateswarlu, B. (Ed.). InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.

Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS letters*, 579(26), 5923-5931.

- Conde, A., Chaves, M. M., & Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant and Cell Physiology*, 52(9), 1583-1602.
- Covarrubias, A. A., & Reyes, J. L. (2010). Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 481-489.
- 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.
- Cui, L. G., Shan, J. X., Shi, M., Gao, J. P., & Lin, H. X. (2014). The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *The Plant Journal*, 80(6), 1108-1117.
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, 39(suppl 2), W155-W159.
- Dang, H. Q., Tran, N. Q., Gill, S. S., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2011). A single subunit MCM6 from pea promotes salinity stress tolerance without affecting yield. *Plant molecular biology*, 76(1-2), 19-34.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z., & Zheng, Y. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of botany*, 103(1), 29-38.
- Dong, Z., Han, M. H., & Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 9970-9975.
- Dure, L. (1993). Structural Motifs in LEA Proteins. In: Timothy J, Elizabeth A. (Ed). Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress. *American Society of Plant Physiologists*, 91-103
- European Commission. (2003). Extent, causes, pressures, strategies and actions that should be adopted to prevent and to combat salinization and sodification in Europe. Directorate General Environment. Directorate B, Erosion Working Group (Task 5; Topic: Salinization and Sodification), Brussels, Belgium.
- FAO. (2008). FAO Land and Plant Nutrition Management Service.
- Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., & Tanaka, Y. (2004). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology*, 45(2), 146-159.
- Funck, D., Eckard, S., & Müller, G. (2010). Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 10(1), 1.
- Gao, Z., Liu, H. L., Daxinger, L., Pontes, O., He, X., Qian, W., ... & Miki, D. (2010). An RNA polymerase II-and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature*, 465(7294), 106-109.
- Gao, S. Q., Chen, M., Xu, Z. S., Zhao, C. P., Li, L., Xu, H. J., Tang, Y., Zhao, X., & Ma, Y. Z. (2011). The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Plant molecular biology*, 75(6), 537-553.

- Garcia-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.
- Gonzalez-Ibeas, D., Blanca, J., Donaire, L., Saladié, M., Mascarell-Creus, A., Cano-Delgado, A., Garcia-Mas, J., Llave, C., & Aranda, M. A. (2011). Analysis of the melon (*Cucumis melo*) small RNAome by high-throughput pyrosequencing. *BMC genomics*, *12*(1), 393.
- Gou, J. Y., Felippes, F. F., Liu, C. J., Weigel, D., & Wang, J. W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, *23*(4), 1512-1522.
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, *286*(5441), 950-952.
- Harris, J. C., Hrmova, M., Lopato, S., & Langridge, P. (2011). Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. *New Phytologist*, *190*(4), 823-837.
- 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.
- Hsieh, L. C., Lin, S. I., Shih, A. C. C., Chen, J. W., Lin, W. Y., Tseng, C. Y., Li, W., & Chiou, T. J. (2009). Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant physiology*, *151*(4), 2120-2132.
- Hollington, P. (2000). Technological breakthroughs in screening/breeding wheat varieties for salt tolerance. In: Gupta, S., Sharma, S., Tyagi, N. (Ed.). *Proceedings of the National Conference 'Salinity Management in Agriculture*. Central Soil Salinity Research Institute, 273–89.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., & Xiong, L. (2008). Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant molecular biology*, *67*(1), 169-181.
- Hussain, S., Ali, M., y Shi, B. (2015). MicroRNA-mediated regulatory functions under abiotic stresses in legumes. Parvaiz Ahmad P. (Ed.). *Legumes Under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations*. John Wiley & Sons, 231-245
- Jacobsen, T., & Adams, R. M. (1958). Salt and silt in ancient Mesopotamian agriculture. *Science*, *128*(3334), 1251-1258.
- Jen, C. H., Michalopoulos, I., Westhead, D. R., & Meyer, P. (2005). Natural antisense transcripts with coding capacity in Arabidopsis may have a regulatory role that is not linked to double-stranded RNA degradation. *Genome biology*, *6*(6), R51.
- Jiang, C., Xu, J., Zhang, H. A. O., Zhang, X., Shi, J., Li, M. I. N., & Ming, F. (2009). A cytosolic class I small heat shock protein, RchHSP17. 8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, *32*(8), 1046-1059.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell*, *14*(6), 787-799.

- Kawashima, C. G., Matthewman, C. A., Huang, S., Lee, B. R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., Rubio-Somoza, I., Todesco, M., Rathjen, T., Saito, K., Takahashi, H., Dalmay, T., Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 66(5), 863-876.
- Khraiwesh, B., Arif, M. A., Seumel, G. I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., & Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140(1), 111-122.
- Khraiwesh, B., Zhu, J. K., & Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.
- Kitazumi, A., Kawahara, Y., Onda, T. S., De Koeyer, D., & de los Reyes, B. G. (2015). Implications of miR166 and miR159 induction to the basal response mechanisms of an andigena potato (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) to salinity stress, predicted from network models in *Arabidopsis*. *Genome*, 58(1), 13-24.
- Kong, Q., Yuan, J., Niu, P., Xie, J., Jiang, W., Huang, Y., & Bie, Z. (2014). Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription quantitative real-time PCR analysis in melon. *PLoS one*, 9(1), e87197.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
- Ladeiro, B. (2012). Saline agriculture in the 21st century: using salt contaminated resources to cope food requirements. *Journal of Botany*, 2012,1-7.
- Li, H. W., Zang, B. S., Deng, X. W., & Wang, X. P. (2011). Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*, 234(5), 1007-1018.
- Li, Q., Jin, X., & Zhu, Y. X. (2012). Identification and analyses of miRNA genes in allotetraploid *Gossypium hirsutum* fiber cells based on the sequenced diploid *G. raimondii* genome. *Journal of genetics and genomics*, 39(7), 351-360.
- 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, C., Liu, X., Sun, Y., Yiu, S. M., & Lim, B. L. (2014). Global small RNA analysis in fast-growing *Arabidopsis thaliana* with elevated concentrations of ATP and sugars. *BMC genomics*, 15(1), 116.
- Liang, G., Yang, F., & Yu, D. (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 62(6), 1046-1057.
- Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., & Hu, S. (2015). Long non-coding RNAs and their biological roles in plants. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(3), 137-147.
- Maiti, R. K., Amaya, L. E. D., Cardona, S. I., Dimas, A. M. O., Rosa-Ibarra, M. D., & Castillo, H. D. L. (1996). Genotypic variability in maize (*Zea mays* L.) cultivars for salinity resistance to drought and salinity. *Journal of plant physiology*, 148(6), 741-744.

- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., & Bartel, D. P. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal*, 23(16), 3356-3364.
- Mangrauthis, S. K., Agarwal, S., Sailaja, B., Madhav, M. S., & Voleti, S. R. (2013). MicroRNAs and their role in salt stress response in plants. Ahmad P, Azooz M, Prasad M (Ed). En Salt Stress in Plants, *Springer*, 15-46.
- Mantri, N. L., Ford, R., Coram, T. E., & Pang, E. C. (2010). Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 286-292.
- 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.
- Matsui, A., Nguyen, A. H., Nakaminami, K., & Seki, M. (2013). *Arabidopsis* non-coding RNA regulation in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22642-22654.
- Mattick J. S., & Makunin, I. V. (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*, 15 (1):17-29.
- Ministerio de agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). Torres J y Miquel J. (2003). La geografía del Comercio del melón. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_hortint%2Fhortint\\_2003\\_40\\_16\\_25.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_hortint%2Fhortint_2003_40_16_25.pdf)
- Moxon, S., Jing, R., Szittyá, G., Schwach, F., Pilcher, R. L. R., Moulton, V., & Dalmay, T. (2008a). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome research*, 18(10), 1602-1609.
- Moxon, S., Schwach, F., Dalmay, T., MacLean, D., Studholme, D. J., & Moulton, V. (2008b). A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. *Bioinformatics*, 24(19), 2252-2253.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Orban, T. I., & Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *Rna*, (4), 459-469.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Moxon, S., Miozzi, L., Moulton, V., Dalmay, T., & Burgyan, J. (2010). Identification of grapevine microRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *The Plant Journal*, 62(6), 960-976.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Perez-Alfocea, F., Guerrier, G., Estan, M. T., & Bolarin, M. (1994). Comparative salt responses at cell and whole-plant levels of cultivated and wild tomato species and their hybrid. *Journal of horticultural science*, 69(4), 639-644.

- Prasanth, K. V., & Spector, D. L. (2007). Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes & development*, *21*(1), 11-42.
- Preston, J. C., & Hileman, L. C. (2013). Functional evolution in the plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family. *Frontiers in Plant Science*, *4*(80), 5.
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., & Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*, *20*(24), 3407-3425.
- Rana, G., & Katerji, N. (2000). Measurement and estimation of actual evapotranspiration in the field under Mediterranean climate: a review. *European Journal of agronomy*, *13*(2), 125-153.
- Rao, G., Sui, J., Zeng, Y., He, C., Duan, A., & Zhang, J. (2014). De novo transcriptome and small RNA analysis of two Chinese willow cultivars reveals stress response genes in *Salix matsudana*. *PloS one*, *9*(10), e109122.
- Rajeswaran, R., & Pooggin, M. M. (2012). RDR6-mediated synthesis of complementary RNA is terminated by miRNA stably bound to template RNA. *Nucleic acids research*, *40*(2), 594-599.
- 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.
- 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.
- Roxas, V. P., Smith, R. K., Allen, E. R., & Allen, R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature biotechnology*, *15*(10), 988-991.
- Sahi, C., Singh, A., Kumar, K., Blumwald, E., & Grover, A. (2006). Salt stress response in rice: genetics, molecular biology, and comparative genomics. *Functional & integrative genomics*, *6*(4), 263-284.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature reviews Molecular cell biology*, *14*(10), 630-642.
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, *136*(1), 2443-2450.
- 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.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental cell*, *8*(4), 517-527.

- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 67(1), 183-195.
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R., & Renner, S. S. (2010). Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14269-14273.
- Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in ecology & evolution*, 23(10), 578-587.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., & Bäurle, I. (2014). *Arabidopsis* miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*, 26(4), 1792-1807.
- Sun, G., Stewart Jr, C. N., Xiao, P., & Zhang, B. (2012). MicroRNA expression analysis in the cellulosic biofuel crop switchgrass (*Panicum virgatum*) under abiotic stress. *PLoS One*, 7(3), e32017.
- Sun, Y., Chen, S., Huang, H., Jiang, J., Bai, S., & Liu, G. (2014). Improved salt tolerance of *Populus davidianax P. bolleana* overexpressed LEA from *Tamarix androssowii*. *Journal of Forestry Research*, 25(4), 813-818.
- 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.
- Surekha, C., Aruna, I., Hossain, M., Wam, S., & Neelapu, N. (2015). Present status and future prospects of transgenic approaches for salt tolerance in plants/ crop plants. In Wani, H., & Hossain, A. (Ed.). In: *Managing salt tolerance in plants: Molecular and Genomic perspectives*. CRC press, 329-339
- Tang, S., Wang, Y., Li, Z., Gui, Y., Xiao, B., Xie, J., Zhu, Q. H., & Fan, L. (2012). Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC plant biology*, 12(1), 28.
- Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- The Plant List* (2010). Version 1. Disponible en:<http://www.theplantlist.org/browse/A/Cucurbitaceae/Cucumis>
- Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & development*, 19(5), 517-529.
- Turan, S., Cornish, K., & Kumar, S. (2012). Salinity tolerance in plants: Breeding and genetic engineering. *Australian Journal of Crop Science*, 6(9), 1337.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, 11(9), 1743-1754.

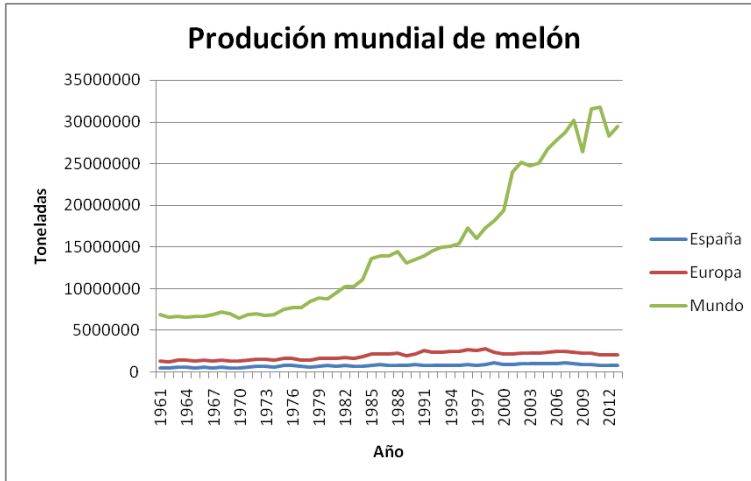
- Vashisht, A. A., & Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(2), 150-160.
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, 20(7), 759-771.
- Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A. C., ... & Crété, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Molecular cell*, 16(1), 69-79.
- Voinnet, O. (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*. 136(4),669-87
- Wang, B., Geng, S., Wang, D., Feng, N., Zhang, D., Wu, L., Ha, C., Zhang, X., & Mao, L. (2015). Characterization of Squamosa Promoter Binding Protein-LIKE genes in wheat. *Journal of Plant Biology*, 58(4), 220-229.
- Wang, M., Wang, Q., & Zhang, B. (2013). Response of miRNAs and their targets to salt and drought stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene*, 530(1), 26-32.
- Wang, 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.
- Wei, Y., Guangmin, X., Daying, Z., & Huimin, C. (2001). Transfer of salt tolerance from *Aeluropus littoralis sinensis* to wheat (*Triticum aestivum* L.) via asymmetric somatic hybridization. *Plant Science*, 161(2), 259-266.
- Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), 1285-1298.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750-759.
- Xie, F., Wang, Q., Sun, R., & Zhang, B. (2014). Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of experimental botany*, 66(3), 789-804.
- Xie, M., & Yu, B. (2015). siRNA-directed DNA Methylation in Plants. *Current Genomics*. 16(1): 23–31.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), 2145-2154.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., ... & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2(5), e104.
- Xue, Z. Y., Zhi, D. Y., Xue, G. P., Zhang, H., Zhao, Y. X., & Xia, G. M. (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. *Plant Science*, 167(4), 849-859.



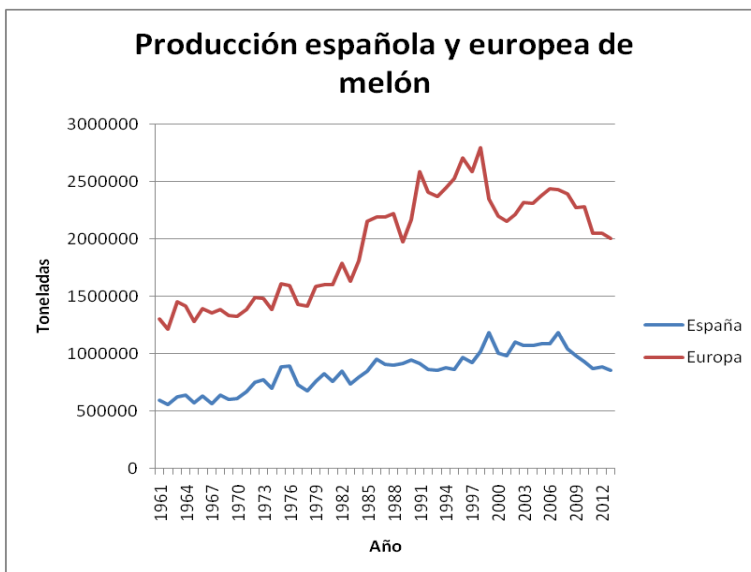
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., & Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development*, 19(18), 2164-2175.
- Yu, N., Cai, W. J., Wang, S., Shan, C. M., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(7), 2322-2335.
- Zhang, H., He, X., & Zhu, J. K. (2013). RNA-directed DNA methylation in plants: Where to start?. *RNA biology*, 10(10), 1593-1596.
- Zhou, Z. S., Huang, S. Q., & Yang, Z. M. (2008). Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*. *Biochemical and biophysical research communications*, 374(3), 538-542.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247-273.



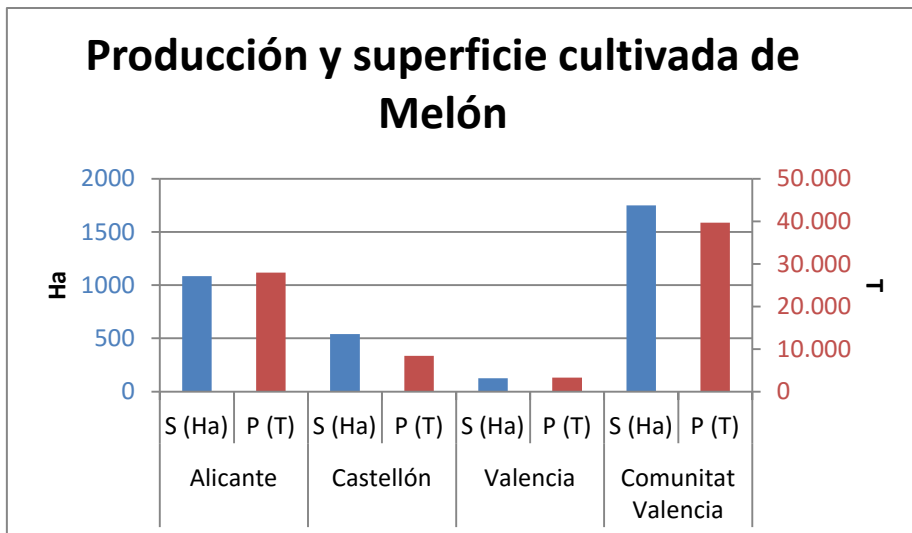
## 7.-Anexos



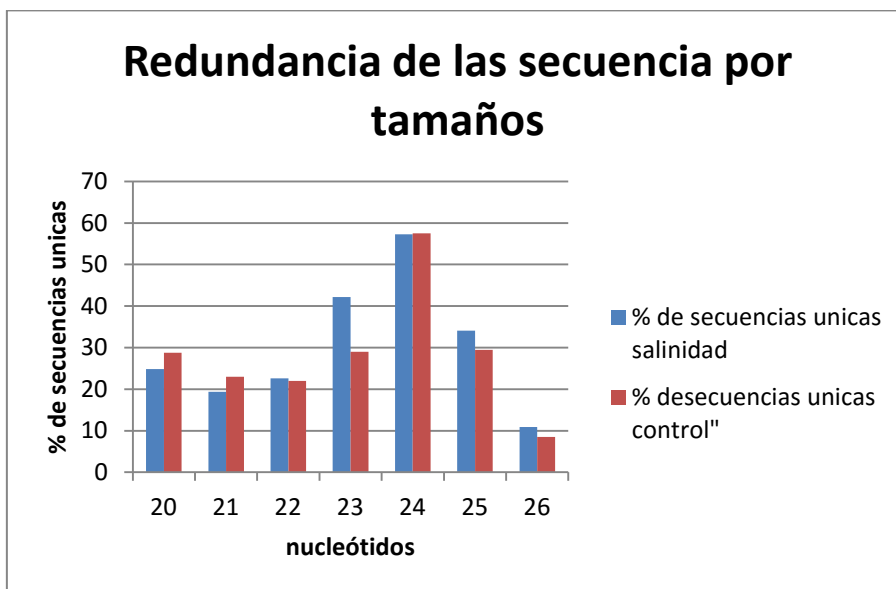
Anexo 1: Producción mundial de melón frente a la producción europea en los últimos 50 años.



Anexo 2: Producción española y europea de melón en los últimos 50 años.



Anexo 3: Producción y superficie cultivada de Melón en la comunidad Valenciana, dividido por provincias. Azul superficie en hectáreas y rojo producción en tonelada.



Anexo 4: Representación del % de secuencias unicas sobre las secuencias redundantes. En el eje X se representa los tamaños de las secuencias, en el eje Y los % de las secuencias únicas frente a las redundantes. A menor % mayor redundancia. Columnas rojas resultados en plantas control, columnas azules resultados en plantas en salinidad.

Anexo 5: Secuencias de los miR156e en diferentes plantas. En rojo los nucleotidos diferentes con respecto a la secuencia del cme-miR156e. Cme: *Cucumis melo*, gma: *Glycine max*, mtr: *Medicago truncatula*, tcc: *Theobroma cacao*, lus: *Linum usitatissimum*, cpa: *Carica papaya*. ath: *Arabidopsis thaliana*. Secuencias extraídas de miRbase.

Nombre	Secuencia madura
sec4404	UUGACAGAAGAUAGAGGGCAC
cme-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGGGCAC
gma-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
mtr-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
tcc-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
lus-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
cpa-miR156e	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
Ath-miR156e	GUGACAGAAGAGAGUGAGCAC

Anexo 6: Secuencias de las diferentes isoformas del miR395. La primera secuencia corresponde a uno de los miRNA con expresión diferencial hallados en las plantas estudiadas. En rojo los nucleótidos diferentes con respecto dicha secuencia (sec3356). Secuencias extraídas de miRbase.

Nombre	Secuencia madura
sec3356	- UGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395a	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395b	UUGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395c	UUGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395d	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395e	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC
cme-miR395f	CUGAAGUGUUUGGGGGAACUC