

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología



DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE miRNAs IMPLICADOS
EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS EN
CUCUMIS MELO

Autor/a:

Beatriz Fernández Gómez

Director/a:

Dra. M^a Carmen Marqués Romero

Tutor/a:

Dr. José Javier Forment Millet

Cotutor/a:

Dr. José Miguel Mulet Salort

Curso académico 2015-2016

VALENCIA, JULIO 2016



Título

Detección y análisis de miRNAs implicados en la regulación de la respuesta a estrés en *Cucumis melo*.

Resumen

Las plantas, como organismos sésiles que son, necesitan desarrollar respuestas rápidas y eficientes para poder sobrevivir a los diferentes estreses medioambientales a los que pueden ser sometidas. Existen numerosos estudios acerca de estas respuestas basados en los principios clásicos de la biología molecular, sin embargo, a principios de los 90 se describieron diferentes especies de pequeños RNAs (sRNAs) no codificantes que presentaban actividad reguladora. Todavía queda mucho para comprender el modo de acción de estos sRNAs. La mayoría del conocimiento obtenido hasta el momento está basado en estudios realizados en organismos modelo, como es el caso de *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, poco se conoce acerca de la importancia de estos elementos reguladores en especies cultivadas.

Dado que el genoma de *Cucumis melo* ha sido completamente secuenciado y debido a la importancia económica de esa especie en España, en nuestro laboratorio se sometieron plantas de *C. melo* var. piel de sapo a diferentes condiciones potencialmente estresantes, y los sRNAs extraídos de ellas se secuenciaron de forma masiva (New Generation Sequencing). De esta forma se identificaron muchas especies diferentes de sRNAs, sin embargo, centramos nuestro estudio en una de ellas, los miRNAs, por ser su biosíntesis, estructura y modo de acción bien conocidas.

En este ensayo se describe un método para la detección y amplificación específica de miRNAs maduros de *C. melo*, algunos de los cuales pueden estar implicados en la regulación de las respuestas a estrés. Además, se analizó la acumulación relativa de éstos en diferentes condiciones de estrés por RT-PCR cuantitativa, y los resultados obtenidos se emplearon para validar los datos obtenidos de la secuenciación masiva. Adicionalmente, se estudió la abundancia relativa de las posibles dianas de mRNA de estos miRNAs con el fin de poder establecer una correlación entre ellos e intentar inferir el modo de acción.

Palabras clave

Cucumis melo; Estrés abiótico; Estrés biótico; Pequeños RNAs no codificantes; miRNAs; Secuenciación masiva; RT-PCR a tiempo real/cuantitativa.

Autor/a del TFG: Dña. Beatriz Fernández Gómez

Director/a: Dña. M^a Carmen Marqués Romero

Tutor/a: D. José Javier Forment Millet

Cotutor/a: D. José Miguel Mulet Salort

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2016

Title

Detection and analysis of miRNAs involved in the regulation of stress response in *Cucumis melo*.

Abstract

Plants, as sessile organisms, need to develop rapid and efficient responses in order to survive to environmental stresses. Many studies were performed regarding this issue based on the classical principles of molecular biology, however in the early 90's new non-coding short RNAs (sRNAs) were identified having regulatory activities, and their mode of action is now starting to be deciphered. Most of the knowledge on sRNAs in plants rely on the studies performed in *Arabidopsis thaliana* or related model organisms, however little is known about the importance of these regulatory elements in crops.

Taking advantage of the complete sequencing of the *Cucumis melo* genome and the economical importance of this crop in Spain, in our lab plants of *C. melo* var. piel de sapo were subjected to several stressful conditions and their sRNAs were extracted and subjected to New Generation Sequencing (NGS). Many different species of sRNAs were identified, however we centered our study in miRNAs, whose biosynthesis, structure and mode of action have been described in depth.

In this essay we describe a method to detect and amplify specific mature miRNAs of *C. melo* putatively involved in the regulation of stress responses. Furthermore, their relative accumulation under different stress conditions was assayed by real-time RT-PCR and the results were used to validate the data obtained by NGS. Additionally, RT-qPCR was also employed to elucidate the effect of these miRNAs in the relative abundance of their mRNA targets in order to better understand their mode of action.

Keywords

Cucumis melo; abiotic stress; biotic stress; small non-coding RNAs; miRNAs; next generation sequencing; real-time/quantitative RT-PCR.

Author: Dña. Beatriz Fernández Gómez

Director: M^a Carmen Marqués Romero, PhD

Academic tutor: José Javier Forment Millet, PhD

Cotutor: José Miguel Mulet Salort, PhD

City and date: Valencia, Julio de 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Gustavo Gómez por aceptarme en el laboratorio para realizar este trabajo, y en especial a mi directora de proyecto, M^a Carmen Marqués, porque se ha involucrado totalmente con la realización del mismo. Gracias por la paciencia, el tiempo, los conocimientos, consejos y correcciones; sin ella este trabajo no hubiera sido posible. Gracias a ellos y a todos los demás miembros del laboratorio, que siempre me han ayudado en lo que he necesitado.

Me gustaría agradecer también este trabajo a mi familia y a mis compañeros y amigos por el apoyo incondicional durante todos estos años, porque sin ellos todo habría sido mucho más difícil.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El estrés en plantas.	1
1.2. El cultivo del melón (<i>Cucumis melo</i>).	2
1.3. RNAs no codificantes.....	3
1.3.1. MicroRNAs	4
1.3.1.1. Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.	4
1.3.1.2. Identificación de miRNAs.....	6
1.3.1.3. miRNAs y la respuesta a estrés.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Material vegetal.	13
3.2. Extracción de sRNAs a partir de RNA total.....	13
3.3. Reacción de Transcripción Reversa (RT) de los sRNAs.	14
3.4. Amplificación de miRNAs por PCR.....	15
3.5. Secuenciación de los productos de PCR.....	16
3.6. Clonación en plásmidos bacterianos.....	17
3.6.1. Ligación.....	17
3.6.2. Transformación.....	18
3.6.3. PCR de colonia.	18
3.7. Extracción del DNA plasmídico (Miniprep).	19
3.8. Secuenciación.....	20
3.9. PCR cuantitativa.	20
3.9.1. Comprobación de la eficiencia de la reacción.	20
3.9.2. Reacción qPCR.	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Detección de los miRNAs mediante RT-PCR.	22
4.1.1. RT pulsada.....	22
4.1.2. Amplificación por PCR.....	23
4.1.3. Evaluación de los productos de PCR por secuenciación.....	24
4.1.4. Determinación de la cantidad mínima detectable por RT-PCR.	25
4.2. Validación de la acumulación diferencial de miRNAs por RT-qPCR.....	26
4.2.1. Eficiencia de la qPCR para los miRNAs.....	26

4.2.2. Análisis de la expresión diferencial de los miRNAs.....	27
4.3. Análisis de la acumulación diferencial de los mRNAs.	31
4.3.1. Predicción de las potenciales dianas de los miRNAs estudiados.....	31
4.3.2. Eficiencia de la qPCR para los mRNAs dianas	31
4.3.3. Análisis de la expresión diferencial de los mRNAs dianas por RT-qPCR	32
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36
7. ANEXO	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo simplificado de la biogénesis de los miRNAs en las plantas	6
Figura 2. Esquema que muestra el ensayo de RT-PCR stem-loop de los miRNAs	10
Figura 3. Representación esquemática de las alternativas metodologías de transcripción inversa de los miRNAs	10
Figura 4. Secuencia universal del cebador stem-loop para RT	14
Figura 5. Protocolo de RT pulsada.....	15
Figura 6. Vector pTZ57R/T, utilizado para llevar a cabo la ligación.	17
Figura 7. Placa de 96 pocillos para PCR cuantitativa.....	21
Figura 8. Diseño de los cebadores para la amplificación del miRNA166 por PCR	23
Figura 9. Resultados de la detección de los miRNAs por RT-PCR.....	24
Figura 10. Resultado de la amplificación de los miRNAs 160, 166 y 168, a partir de distintas cantidades.	26
Figura 11. Representación de los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los controles endógenos para la validación de los miRNAs.....	28
Figura 12. Resultados de la validación biológica de los miRNAs por qPCR.....	30
Figura 13. Representación de los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes control para la validación de los mRNAs.....	32
Figura 14. Resultados de la validación biológica de los posibles mRNAs dianas de los miRNAs estudiados.	34
Figura S1. Producción mundial de melón entre los años 1993 y 2013	40
Figura S2. Resultados de la secuenciación realizada tras la PCR de algunos de los miRNAs estudiados	40

Figura S3. Resultados de las electroforesis en gel de agarosa para la detección de los clones de los distintos miRNAs.....	41
Figura S4. Curvas de eficiencia de la reacción qPCR para el miRNA 397	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los distintos métodos de identificación de miRNAs.....	7
Tabla 2. Evaluación de las principales técnicas de visualización de miRNAs	8
Tabla 3. Condiciones ambientales en las que crecieron las plantas de melón.	13
Tabla 4. Secuencias del cebador específico para la RT de cada miRNA analizado	15
Tabla 5. Secuencias del cebador directo de PCR específico de cada miRNA y del cebador reverso universal	16
Tabla 6. Secuencia del cebador M13/pUC directo y reverso.	19
Tabla 7. Secuencias del cebador directo y reverso de cada una de las posibles dianas de los miRNAs analizados por qPCR	20
Tabla 8. Condiciones de la reacción qPCR.....	21
Tabla 9. Valores de Log Fold Change de los miRNAs para cada una de las muestras.....	27
Tabla 10. mRNAs dianas seleccionados como mejores candidatos a ser regulados por cada miRNA.....	31

LISTADO DE ABREVIATURAS

AGO	<i>Argonaute protein</i> , proteína Argonauta
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato amónico
bp	Pares de bases
<i>C. melo</i>	<i>Cucumis melo</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , DNA complementario
CPM	Cuentas por millón
DCL	<i>Dicer-like</i> , RNasa III semejante a Dicer
ddA	Didesoxiadenosina
ddT	Didesoxitimidina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucleico
dNTPs	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> , Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético
EST	<i>Expressed sequence tag</i> , marcador de secuencia expresada
FC	<i>Fold Change</i>
HEN-1	<i>Hua Enhancer 1</i> , RNA metil transferasa.
HST	Proteína HASTY
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i> , viroide del enanismo del lúpulo
IBMCP	Instituto de Biología molecular y celular de plantas
LacZ	Gen de la β -galactosidasa
LB	Caldo de lisogenia
LFC	<i>Log Fold Change</i>
LiCl	Cloruro de litio
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> , RNA no codificante largo
Mb	Megabases
miRNA	micro RNA

mRNA	<i>Messenger RNA</i> , RNA mensajero
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i> , RNA no codificante
nt	Nucleótido
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , PCR cuantitativa
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA Pol II	Polimerasa II de RNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i> , RNA ribosomal
RT	<i>Reverse transcription</i> , transcripción reversa
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> , pequeño RNA de interferencia
sncRNA	<i>Small non-coding RNA</i> , pequeño RNA no codificante
snRNA	<i>Small nucleolar RNAs</i> , pequeño RNA nucleolar
sRNA	<i>Small RNA</i> , pequeño RNA
<i>Ssp.</i>	Subespecie
TAE	<i>Tris acetate-EDTA</i> , tampón tris-acetato EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> , tetrametiletilendiamina
T _m	Temperatura de melting
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-Hidrocloruro
tRNA	<i>Transfer RNA</i> , RNA de transferencia
Ufc	Unidades formadoras de colonia
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El estrés en plantas.

Las plantas están continuamente afectadas por una variedad de factores ambientales tanto de origen biótico como abiótico. Mientras que los primeros dependen de su interacción con otros organismos vivos, como simbioses, parásitos, patógenos, herbívoros y competidores vegetales, los factores abióticos incluyen aquellos recursos y/o parámetros ambientales que son determinantes para el desarrollo de las plantas, como es el caso de la temperatura, la humedad relativa, la luz, la disponibilidad de agua, los nutrientes minerales y el CO₂, así como también el viento, la radiación ionizante o la contaminación por la presencia de toxinas en el suelo (Koyro *et al.*, 2012).

Respecto a los factores abióticos, las plantas requieren una cierta cantidad de cada uno de ellos para su correcto desarrollo. Un exceso o déficit de una condición ambiental física o química resulta en lo que se denomina estrés abiótico, puesto que afecta de manera adversa al crecimiento, desarrollo y/o productividad de la planta. Por tanto, el efecto que los estreses abióticos tienen sobre las plantas depende de su cantidad o intensidad (Koyro *et al.*, 2012).

Puesto que las plantas son seres sésiles, la falta de mecanismos para escapar de condiciones adversas ha promovido, durante la evolución, el desarrollo de respuestas únicas y sofisticadas al estrés ambiental. La serie de eventos que culminan en una respuesta comienza con la percepción de una señal específica; esta señal generará un conjunto de respuestas internas, desde la inducción o represión de la expresión génica a alteraciones de diversas vías metabólicas. Todo este conjunto de cambios representa nada menos que el esfuerzo de estos organismos sésiles para superar situaciones de estrés, mantener la homeostasis y adaptarse (Macedo, 2012).

Por ello, la supervivencia en ambientes hostiles supone el desarrollo de mecanismos de tolerancia o resistencia. Estas defensas se diferencian principalmente en que, por una parte, la tolerancia trata de reducir o compensar los efectos negativos generados por un determinado factor ambiental, pero no lo inhibe, y reduce la mortalidad que dicho factor provoca o reestablece la capacidad reproductiva de la planta. Por otra parte, los mecanismos de resistencia, reducen el daño causado evitando la exposición de la planta a esas condiciones adversas (Horns y Hood, 2012).

Así pues, el mantenimiento de un medio ambiente sano y la conservación de la biodiversidad local, los cuales se han ido degradando progresivamente al ser sometidos al acelerado cambio climático, se convierten en la principal preocupación de la agricultura moderna (Macedo, 2012). En concreto, el estrés producido por un exceso de sales (salinidad) y por un déficit hídrico (sequía), riesgos que están siendo promovidos colateralmente por el cambio climático global y por el crecimiento de la población, se están convirtiendo cada vez más en serias amenazas para la agricultura y para el estado natural del medio ambiente. Ambos factores están aumentando de forma exponencial, habiéndose convertido el estrés

abiótico en la primera razón de pérdida de cultivos en todo el mundo al reducirse la producción media de la mayoría de ellos en más de un 50% (Koyro *et al.*, 2012); así, se prevé que serán necesarias nuevas tierras dedicadas al cultivo de alimentos y biocombustibles con el fin de mantener a las generaciones futuras (Zhang, 2015). Es por ello, que las soluciones a estos problemas, como la mejora en la tolerancia a la salinidad y a la sequía de los cultivos, son desesperadamente necesarias, lo cual requiere un conocimiento detallado sobre los mecanismos de tolerancia por parte de la planta (Koyro *et al.*, 2012).

Por otra parte, el conjunto de organismos tales como bacterias, hongos, virus o plagas de insectos, que representan los factores bióticos, también provocan la pérdida de los cultivos mundiales, por lo que es importante estudiar las respuestas de las plantas a este tipo de estrés y desarrollar nuevas herramientas para proteger los cultivos de plagas y patógenos. Para contrarrestar la infección de estos patógenos, las plantas han desarrollado una respuesta de defensa, activando o suprimiendo una gran variedad de genes. Tras el ataque de estos organismos, las plantas reconocen una serie de patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), a través de una serie de receptores (PRRs) situados en la superficie celular. Dichos PAMPs o DAMPs activan el sistema inmune, mediante la inducción de la deposición de callosa, producción de especies reactivas del oxígeno, acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) (Huang *et al.*, 2016).

En vista de esta situación general, surge una cuestión mayor: ¿cómo superar todos estos factores adversos? Una respuesta simple es estudiar las respuestas a los diferentes estreses, ya que pueden revelar cómo algunas especies de plantas superan estas condiciones adversas mediante el desarrollo de resistencia o tolerancia, explorar la naturaleza de los cambios ambientales, y finalmente, desarrollar plantas tolerantes y/o resistentes (Macedo, 2012).

Sin embargo, hay otras muchas cuestiones que están sin respuesta, por ejemplo, ¿cómo se regulan estos genes codificadores de proteínas? ¿Qué tipo de redes de genes utilizan las plantas con el fin de responder a los diferentes tipos de estreses abióticos? Una pequeña molécula reguladora de RNA, recientemente descubierta, denominada microRNA (miRNA), puede ser la respuesta a estas preguntas (Zhang, 2015).

1.2. El cultivo del melón (*Cucumis melo*).

Durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el aumento de las herramientas disponibles para el análisis de los genomas de plantas. Desde que estuvo disponible la primera secuencia del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) otras muchas han sido publicadas, algunas pertenecientes a especies de interés agronómico. Es por ello, que tanto por razones científicas como económicas, se están analizando un mayor número de genomas de plantas, los cuales aportan importantes recursos que son útiles para su estudio y reproducción biológica (González *et al.*, 2010a). Este es el caso del melón, cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado (García-Mas *et al.*, 2012).

El melón (*Cucumis melo* L.), junto con el pepino, la sandía y la calabaza pertenece a la familia de las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) y se clasifica en dos subespecies, *C. melo ssp. agrestis* y *C. melo ssp. melo* siendo la India y África sus centros de origen, respectivamente (Gonzalez-Ibeas *et al.*, 2007).

El melón se sitúa como el noveno cultivo hortícola en términos de producción total mundial, estimándose en 29.394 millones de kilos recolectados en 2013 según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2015) (último año en que la FAO dispone de datos) (Fig. S1), siendo China el principal productor. Ese mismo año, en España se produjeron 857 millones de kilos, concentrándose principalmente en la mitad sur de la península ibérica y siendo Castilla-La Mancha la primera región en superficie y producción con casi el 35% del total español, seguida de Murcia, Andalucía y Extremadura.

Se trata de una especie diploide, con un número básico de cromosomas ($2n = 24$) y el tamaño estimado de su genoma es de 450 a 500 Mb, similar en tamaño al genoma del arroz (419 Mb) y cerca de tres veces el tamaño del genoma de *Arabidopsis thaliana* (125 Mb). Sobre la composición del genoma del melón, diversas estimaciones globales indican que alrededor del 30% del mismo está formado por secuencias repetidas. Hasta ahora, se han utilizado los microsatélites para construir el mapa genético de *Cucumis melo* y compararlo con los mapas de otras especies. Por otra parte, tiene una alta variación genética intraespecífica y diversidad morfológica que, junto al pequeño tamaño de su genoma, lo hacen adecuado para una gran variedad de estudios moleculares y genéticos que pueden conducir al desarrollo de herramientas para la mejora de los cultivos. Asimismo, la disponibilidad de la secuencia completa de genoma del melón facilita en gran medida la identificación de los genes subyacentes de ciertos rasgos y la elucidación de mecanismos que regulan características relevantes (Kong *et al.*, 2014).

Además de su significativo valor económico, el melón es también un buen modelo para el estudio de diversas características biológicas, tales como la maduración del fruto, la determinación del sexo y la fisiología del floema.

Desde un punto de vista hortícola, el melón es una planta susceptible a muchas enfermedades, por ello la identificación y mapeo de genes de resistencia puede ser una importante línea de investigación con el objetivo de obtener variedades de melón de mayor interés agronómico (van Leeuwen *et al.*, 2003). De este modo, se han aplicado ya con éxito distintos enfoques genómicos para el cultivo del melón dirigidos a la caracterización molecular de importantes características agronómicas tales como resistencias de patógenos (González *et al.*, 2010b).

1.3. RNAs no codificantes.

Buena parte del genoma de los organismos eucariotas es transcrito en RNAs no codificantes (ncRNAs), es decir, en moléculas de RNA funcionales pero que no son traducidas a proteínas. Hoy en día, son cada vez más las evidencias que sugieren para ellos un papel fundamental en la regulación de procesos biológicos.

Los ncRNAs se clasifican en ncRNAs estructurales, también llamados "housekeeping" ncRNAs (rRNAs, tRNAs, snoRNAs, etc) y ncRNAs reguladores. Estos últimos, se dividen a su vez en función de su tamaño en ncRNAs pequeños (sncRNAs), los cuales contienen menos de 40 bp y están asociados al silenciamiento del RNA, y en ncRNAs largos (lncRNAs), con más de 40 bp y que están relacionados con el desarrollo y la diferenciación celular. En plantas, dichos ncRNAs podrían estar implicados en funciones tales como la regulación del desarrollo o en procesos de respuesta a estrés (Hüttenhofer *et al.*, 2005).

Concretamente, los sncRNAs, se clasifican según su biogénesis y función en microRNAs (miRNAs), los cuales son producidos a partir de RNA de cadena simple, y RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), generados a partir de RNA de doble cadena que puede ser endógeno o foráneo. Ambos tipos pertenecen al conjunto de RNAs de interferencia, ya que pueden controlar la expresión génica y resultan esenciales para la estabilidad del genoma, el desarrollo, la diferenciación, la comunicación celular, la señalización y las respuestas adaptativas al estrés biótico y abiótico (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

1.3.1. MicroRNAs

Aunque los microRNAs fueron descubiertos por primera vez en 1993, el término "miRNA" no fue reconocido hasta 2001. Desde entonces, los miRNAs han atraído la atención de numerosos científicos, demostrándose mediante varios enfoques tanto biológicos como computacionales que esta nueva clase de pequeños RNAs tiene diversas e importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de la planta (Zhang *et al.*, 2006).

En las plantas, los miRNAs regulan genes que codifican factores de transcripción, proteínas de respuesta a estrés y otras proteínas que afectan al desarrollo, crecimiento y fisiología de las plantas, actuando tanto a nivel transcripcional (afectando a la metilación del DNA y la remodelación de la cromatina), como post-transcripcional (promoviendo la degradación del mRNA o bloqueando su traducción). Asimismo, la diversidad de interacciones predichas entre los miRNAs y sus dianas sugiere que nuestra comprensión de las funciones biológicas de los miRNAs seguirá evolucionando (Rogers y Chen, 2013).

1.3.1.1. Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.

Los miRNAs provienen de la transcripción de genes miRNA (MIR). La mayoría de las plantas poseen más de 100 genes MIR, que se encuentran principalmente en las regiones intergénicas a lo largo del genoma.

La biogénesis de los miRNAs requiere múltiples pasos con el fin de formar miRNAs maduros. En primer lugar, los genes MIR son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) a un miRNA primario (pri-miRNA), que es generalmente una larga secuencia de más de varios cientos de nucleótidos y que presenta una estructura en horquilla (stem-loop) (Zhang *et al.*, 2006). Estos pri-miRNAs se estabilizan mediante la adición de una cola en el extremo 5' de 7-metilguanósina y una cola en el extremo 3' de poliadenilato.

En segundo lugar, el pri-miRNA se escinde a un precursor miRNA o pre-miRNA. Este paso es controlado por la enzima Dicer 1 (DCL1) en plantas, la cual vuelve a procesar el pre-miRNA, dando lugar a un dúplex de miRNA. Por esta razón, los mutantes con pérdida de función de DCL1 tienen bajos niveles de síntesis de miRNAs (Zhang *et al.*, 2006).

Dentro de la familia de DCL, existen miembros que generan pequeños RNAs de distintos tamaños, por lo que los dúplex generados pueden variar en su longitud. Por ejemplo, DCL1 y DCL4, generan RNAs de 21 nucleótidos, DCL2, de 22 nucleótidos y DCL3, de 24 nucleótidos. Entre ellos, DCL1 es responsable de la biogénesis de los miRNAs a partir de la mayoría de los genes MIR, mientras que los DCL restantes producen sólo una pequeña fracción del total de miRNAs. Estas diferencias en el tamaño, hacen que los miRNAs puedan ser funcionalmente distintos, por lo que la jerarquía funcional entre estas enzimas junto con las diferencias en la expresión de genes DCL, puede jugar un papel importante en el control espacio-temporal de la biogénesis y la actividad de los miRNA (Rogers y Chen, 2013).

Según se ha observado en *Arabidopsis thaliana*, los dúplex de miRNA son 2'-O-metilados por la metiltransferasa Hua Enhancer 1 (HEN1), para que no sean degradados, y exportados desde el núcleo al citoplasma, mediante la proteína HASTY (HST), donde se separan en cadenas sencillas de miRNA maduros por la acción de las helicasas. Una de estas hebras, la "hebra guía", seleccionada por la proteína Argonauta (AGO), con acción endonucleasa, entra en un complejo ribonucleoproteico conocido como el complejo silenciador (RISC), mientras que la otra hebra, conocida como la "hebra pasajera", es degradada por este mismo complejo (Fig.1).

Una vez que RISC está activado, los miRNAs se emparejan de acuerdo con su secuencia de bases con la molécula de mRNA complementaria y pueden actuar, bien escindiendo el mRNA en el sitio correspondiente a los nucleótidos 10 y 11 de la molécula de mRNA, gracias a la función endonucleasa de AGO, o bien, inhibiendo la traducción a proteína de este mRNA diana (Zhang, 2015).

Por lo tanto, mediante la determinación de perfiles específicos de miRNA, es posible identificar genes cuya expresión debe estar restringida cuando se produzcan cambios de estado celulares, respuesta a estrés u oncogénesis (Benes y Castoldi, 2010). No obstante, no hay que olvidar que, paralelamente a la regulación que estos miRNAs hacen sobre sus transcritos diana, existe una regulación transcripcional de los genes MIR de los que provienen, por lo tanto, la acumulación espacio-temporal de miRNAs específicos está también mediada por dicho control en la transcripción (Rogers y Chen, 2013).

Además de miRNAs específicos de especie, existen otros muchos que están evolutivamente conservados, algunos de gusanos a humanos, o de helechos a eudicotiledóneas o monocotiledóneas en plantas. Generalmente, en plantas, sólo están conservados los miRNAs maduros, a diferencia de los animales, en los que aparte de los maduros también se conservan los precursores (Zhang *et al.*, 2006).

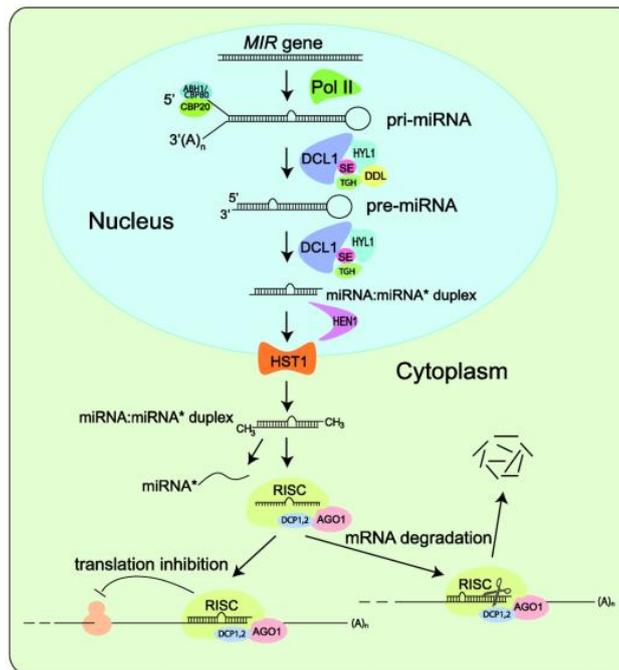


Figura 1. Modelo simplificado de la biogénesis de los miRNAs en las plantas. Los genes MIR son transcritos por la Polimerasa II en miRNAs primarios (pri-miRNAs) que se doblan para formar una estructura de horquilla. Los pri-miRNAs y los miRNAs precursores se procesan de forma secuencial por la enzima DCL1 (Dicer I) para producir uno o varios dúplex de miRNA, que son metilados por HEN1 (Hua Enhancer 1) y transportados al citoplasma por la proteína HST1 (HASTY1). El miRNA se incorpora al complejo RISC (complejo de silenciamiento), en el que está incluido AGO1 (Argonauta 1) que dirige la inhibición de la traducción o la escisión del transcrito de mRNA diana (Yang y Li, 2012).

1.3.1.2. Identificación de miRNAs.

Identificación de novo.

En 1993, dos grupos de investigación (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993) encontraron que un pequeño RNA de 22 nucleótidos derivado de un gen llamado *lin-4* suprimía la expresión de *lin-14*, que controla el tiempo de desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans*. Por ello, *lin-4* es reconocido como el miembro fundador de una nueva clase de pequeños RNAs llamada miRNAs. Desde que *lin-4* fue reconocido como miRNA en 2001 (Lee y Ambros, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2001), miles de miRNAs han sido identificados a partir de diversos organismos incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, peces, ratones, ratas y humanos (Zhang *et al.*, 2006).

Los métodos para identificar miRNAs se basan en sus principales características. En primer lugar, como ya se mencionó previamente, todos los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes, que por lo general constan de 20-22 nucleótidos para los animales y 20-24 nucleótidos para plantas. Además, todos los precursores de miRNA tienen una estructura en forma de horquilla (stem-loop) bien predicha, con una energía libre considerablemente menor que los RNA de transferencia (tRNA) o RNA ribosómicos (rRNA). Actualmente, existen diferentes métodos que permiten la búsqueda de nuevos miRNAs.

Inicialmente, los miRNAs fueron identificados por cribado genético. Pese a que este método fue útil para identificar algunos miRNAs, tales como *lin-4* (Wightman *et al.*, 1993) y *lin-7*, su aplicación es limitada porque es caro y consume mucho tiempo.

Para superar algunas de las deficiencias de los análisis genéticos, se desarrolló otro enfoque experimental, la clonación directa tras el aislamiento de los pequeños RNAs. En él, pequeñas moléculas de RNA son aisladas por fraccionamiento por tamaño, ligadas a adaptadores de RNA en ambos extremos y transcritos de forma inversa a cDNA, el cual es amplificado y secuenciado. Debido a que sólo los pequeños RNAs son aislados y examinados por este método, es una manera más eficiente de obtener miRNAs que la detección genética general y además, se puede cuantificar la abundancia del miRNA al mismo tiempo (Lu *et al.*, 2005).

Otro enfoque es el computacional tradicional, el cual se basa en el análisis de la secuencia del genoma. Varios laboratorios han diseñado programas computacionales, como MIRscan (Lim *et al.*, 2003) y MIRAlign (Wang *et al.*, 2005) y han predicho con éxito genes de miRNA. Sin embargo, presenta el inconveniente de resultar ligeramente ineficiente y no exhaustivo, y los miRNAs predichos necesitan ser confirmados por experimentos como la clonación o Northern blotting.

Finalmente, también se puede llevar a cabo un análisis de marcador de secuencia expresada (EST). Debido a que muchos miRNAs están conservados evolutivamente de especie a especie, se pueden predecir miRNAs por homología a otros anteriormente descritos. Esto resulta muy útil en especies cuyo genoma no está secuenciado, aunque este método sólo puede identificar miRNAs conservados y la mayoría de los miRNAs son más propensos a ser no conservados (Zhang *et al.*, 2006).

Por lo tanto, los cuatro enfoques existentes tienen diferentes ventajas y deficiencias (Tabla 1), pero mediante la combinación de estos métodos, más miRNAs se descubrirán rápidamente.

Tabla 1. Comparación de los distintos métodos de identificación de miRNAs basada en Zhang *et al.*, 2006.

	Genetic screening	Direct cloning after isolation of small RNAs	Computational method	EST analysis
Specific software	No	No	Yes	No
Require genome sequence	No	No	Yes	No
Cost	High	High, but less than genetic screening	Moderate	Low
Efficiency	Low	High	Low	High
False positive possibility	Low	Low	High	Moderate
Need experimental confirmation	No	No	Yes	Moderate
Possibility for new miRNAs	High	High	High	Low
Suitable to wide variety of species	Yes	Yes	No	Yes
miRNAs quantitative information	No	Yes	No	Somewhat

Caracterización de miRNAs predichos.

La detección fiable y la cuantificación de la expresión de los miRNAs en tejidos específicos es esencial para un mejor entendimiento de la regulación de los genes mediados por miRNAs. A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, los cuales tienen una población relativamente simple de pequeños RNAs que comprenden principalmente miRNAs y en la que no hay siRNAs, las plantas presentan una fracción compleja de pequeños RNAs. Esta complejidad hace que los miRNAs estén altamente subrepresentados en la fracción de RNA, afectando a los métodos de detección, ya que puede que no sean lo suficientemente sensibles debido a su poca abundancia (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

Entre los métodos tradicionales para detectar miRNAs se pueden distinguir el Northern Blot, RT-PCR, microarrays, secuenciación masiva e incluso, actualmente, se están desarrollando métodos basados en sondas derivadas de nanopartículas o métodos electroquímicos. No obstante, cada uno de estos métodos tiene sus propias limitaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de las principales técnicas de visualización de miRNAs basada en Åkerblom *et al.*, 2012.

Technique	Mechanism of activity	Advantage	Quantitative	High throughput	Limitations
Northern blot	Electrophoresis used to separate miRNA bound to hybridization probes Rare miRNA require long exposure times, leading to increased background	Most reliable technique for miRNA detection Improved sensitivity with LNA probes	Semi	No	Requires sorting cell populations Requires large amount of starting material
miRNA RT-PCR	Quantitative analysis of a specific miRNA in a sample	Quantitative analysis of miRNA Highly sensitive and selective with LNA probes	Yes	Yes	Requires sorting cell populations Primers designed to detect precursor sequence, may not necessarily indicate the level of mature miRNA High cost
miRNA microarray	Chip based assay using miRNA hybridization probes	High throughput technique to profile differential expression of known miRNA	Yes	Yes	Lack of comparability due to differences between microarray chips No standard for hybridization based profiling Requires large amount of starting material
Deep sequencing	Chip based sequencing assay for miRNA profiling	Can detect known as well as novel miRNA sequences within and sample	Yes	Yes	Requires large amount of starting material

Por una parte, el Northern blot resulta un método complejo, ya que hay que someter la muestra a una electroforesis y a una posterior hibridación en una membrana con sondas radioactivas o marcadas químicamente. Además, consume mucho tiempo y requiere grandes cantidades de muestra de RNA (Li y Ruan, 2009).

Otra de las principales tecnologías son los microarrays, basados en la hibridación entre los miRNAs, que son marcados con un colorante fluorescente, y sus correspondientes sondas complementarias, pudiendo detectar los distintos tipos de miRNAs y sus cantidades relativas en las muestras estudiadas midiendo la señal de fluorescencia emitida. Sin embargo, su uso se ve limitado por el alto coste del material y del equipo (Li y Ruan, 2009), y sobre todo, por el hecho de que sólo permite detectar miRNAs que ya se encuentran descritos.

La identificación de los miRNAs también es posible mediante la secuenciación masiva de los pequeños RNAs. Para ello, se crean bibliotecas de cDNA, generado a partir de una reacción de retrotranscripción, gracias a la previa unión de adaptadores en ambos extremos del sRNA, y una posterior amplificación por PCR. A continuación, cada cDNA se une a un cluster distinto por los adaptadores. Dichos clusters consisten en regiones que contienen múltiples copias de oligos. La secuenciación de las librerías tiene lugar mediante un proceso en el que, al añadir los nucleótidos marcados fluorescentemente a las diferentes copias de cDNA de los clusters, se genera una emisión de luz que es registrada, pudiendo determinar también la abundancia de cada sRNA medida en CPM (cuentas por millón).

A pesar de su elevado coste, la RT-PCR es una de las técnicas más ampliamente utilizadas, ya que presenta una mejor sensibilidad y especificidad respecto a las técnicas mencionadas anteriormente. Este método consiste en la conversión del miRNA en cDNA mediante una transcripción reversa, seguido de su amplificación por PCR (Fig. 2). Para ello, es necesario el previo alargamiento de la molécula de miRNA mediante la hibridación con cebadores específicos o la ligación de adaptadores, pues el reducido tamaño de la molécula de miRNA limita la aplicación directa de los protocolos convencionales de RT-PCR (Kramer, 2011). Algunos de los cebadores empleados para hacer la RT contienen una secuencia específica del miRNA a amplificar y se diseñan con una estructura lineal (Fig. 3A) o en forma de horquilla (stem-loop) (Fig. 3B). Otras estrategias consisten en añadir una cola común al extremo 3' de todos los miRNAs, como es el caso de la adición de poli(A) (Fig. 3C), o bien la ligación con una T4 RNA ligasa de un adaptador de secuencia conocida (Fig. 3D), en cuyo caso la reacción RT se llevaría a cabo a partir de un cebador oligo dT o un cebador universal complementario al adaptador, respectivamente.

Uno de los sistemas más ampliamente utilizado es la retrotranscripción con un cebador en forma de horquilla (stem-loop), ya que su estructura presenta una serie de ventajas como son la mejora de la estabilidad del dúplex cebador/RNA, y además, a diferencia de los cebadores lineales, previene las uniones no específicas con otras moléculas de RNA y es capaz de discriminar entre miRNA maduro y sus precursores, mejorando la especificidad del método (Li y Ruan, 2009).

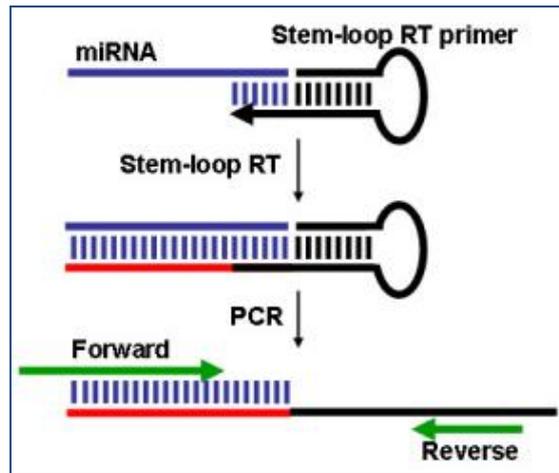


Figura 2. Esquema que muestra el ensayo de RT-PCR stem-loop de los miRNAs. Primero tiene lugar una RT (transcripción reversa) seguido de una PCR convencional. El cebador RT stem-loop se une al extremo 3' de la molécula de miRNA, iniciando su transcripción reversa. A continuación, el producto de RT es amplificado utilizando un cebador directo específico del miRNA y un cebador reverso universal. (Varkonyi-Gasic, 2007)

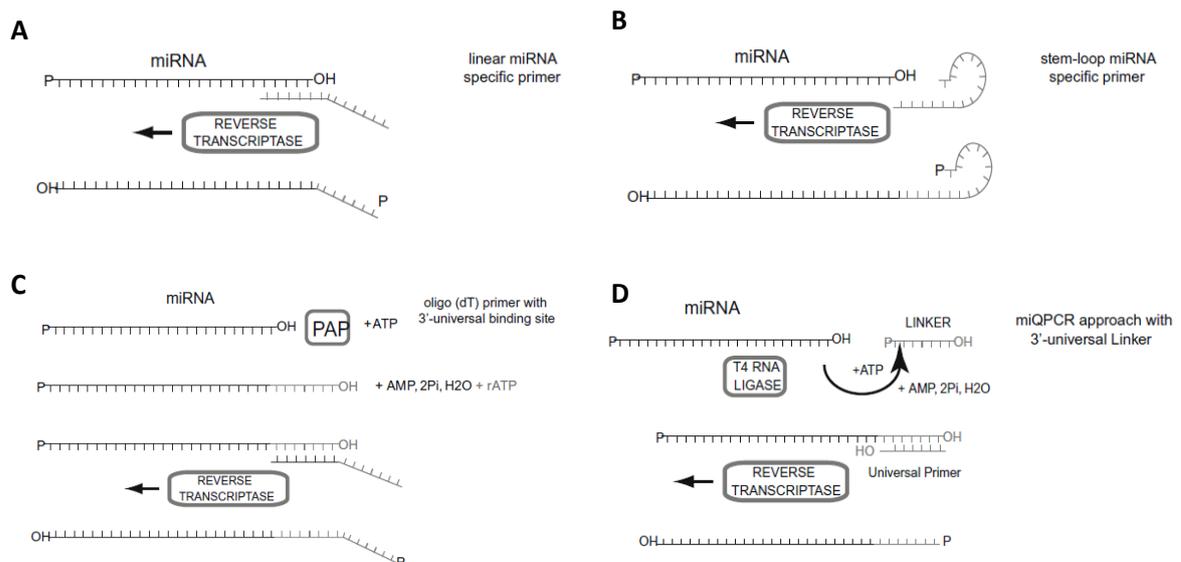


Figura 3. Representación esquemática de las alternativas metodológicas de transcripción inversa de los miRNAs. (A) Cebador stem-loop (B) Cebador lineal. (C) Adición de cola poli(A). (D) Unión de adaptador por T4 RNA ligasa (Benes y Castoldi, 2010).

1.3.1.3. miRNAs y la respuesta a estrés.

Los distintos estreses ambientales hacen que las plantas modifiquen la expresión de determinados miRNAs o sinteticen nuevos para hacer frente al estrés. El papel que juegan estos miRNAs en la respuesta de la planta frente a un estrés fue sugerido a partir de la predicción de las dianas de los miRNAs y los estudios de perfiles de expresión de miRNAs durante dicha respuesta.

Numerosos estudios realizados en plantas modelo sometidas a condiciones de estrés biótico y abiótico, incluyendo deficiencia de nutrientes, sequía, frío, salinidad, infecciones bacterianas, radiación UV y tensión mecánica, han permitido la identificación de miRNAs implicados en la regulación de las respuestas a estrés (Khraiwesh *et al.*, 2012). Uno de los estudios iniciales fue el realizado por Sunkar y Zhu en 2004, quienes construyeron librerías de pequeños RNAs de plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés por frío, estrés salino, sequía y tratadas con diferentes hormonas, e identificaron miRNAs que se acumulaban de forma diferencial en los tratamientos.

Entre otros estudios centrados en la investigación del papel de los miRNAs en la respuesta a estrés, destacan los realizados en cultivos de algodón con distinta resistencia a salinidad (Yin *et al.*, 2012) y en plantas de melón tanto resistentes como susceptibles al pulgón herbívoro (Sattar *et al.*, 2012), en los cuales se identificaron alteraciones en la expresión de estas moléculas.

Según ha sido comprobado por diversos ensayos, puede ser que un miRNA responda a un mismo estrés de forma diferente dependiendo de la especie de planta, o que diferentes miRNAs respondan a un mismo estrés de una manera similar (Zhang, 2015).

Por otra parte, el alto grado de complementariedad entre los miRNAs y sus dianas proporciona un poderoso enfoque para predecir y validar los genes diana de los miRNA en las plantas. Es bien sabido que la mayoría de los miRNAs sensibles a estrés se dirigen a factores de transcripción, por lo que dichos factores también juegan un papel importante durante la respuesta de la planta a diferentes estreses medioambientales.

A pesar de que muchos estudios se han centrado en la expresión aberrante de ciertos miRNAs inducida por unos pocos estreses en diferentes especies, algunas de ellas de interés agronómico, la aplicación de estos conocimientos a nivel práctico resulta difícil, pues la información obtenida está incompleta. Hasta el momento no se ha realizado un análisis sistemático de la acumulación global de pequeñas especies de sRNAs en respuesta a muchos estreses sobre una única especie vegetal. El presente trabajo muestra un pequeño apartado de un estudio mucho mayor conducente a salvar este inconveniente en melón. Los resultados obtenidos podrían ser usados para desarrollar estrategias que permitieran mejorar el rendimiento de dicho cultivo cuando se desarrolla en condiciones de estrés, no sólo por medio de la manipulación de los genes de respuesta a estrés, sino también de los miRNAs que los regulan (Saini *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo se centra en la puesta a punto de un método de detección y análisis de la expresión de miRNAs, con el fin de validar los resultados obtenidos de un estudio previo de secuenciación masiva de librerías de pequeños RNAs provenientes de plantas de melón (*Cucumis melo*) sometidas a diversos tipos de estreses tanto abióticos como bióticos.

Con esta finalidad, se siguieron los siguientes objetivos parciales:

1. Amplificación por RT-PCR de algunos posibles miRNAs detectados en análisis previos de secuenciación masiva.
2. Clonación y secuenciación de los miRNAs amplificados para identificarlos y confirmar la validez de la técnica de RT-PCR empleada.
3. Análisis de la expresión diferencial de miRNAs por RT-PCR a tiempo real y validación de los resultados obtenidos por secuenciación masiva.
4. Predicción mediante aproximaciones bioinformáticas de los mRNAs de melón que son potenciales dianas de los miRNAs analizados.
5. Análisis por RT-PCR a tiempo real de los niveles de acumulación de los mRNAs diana de los miRNAs analizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal.

Los distintos análisis realizados en este trabajo se llevaron a cabo a partir de muestras de plantas de melón sometidas a diversos tratamientos, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones ambientales en las que crecieron las plantas de melón.

Condición ambiental	Tratamiento
Frío	Temperatura día/noche (18°C/15°C)
Salinidad	Un riego con LiCl (200 mM)
Día corto	Ciclos de luz/oscuridad (12hs/12hs)
Sequía	Cese del riego
Monosporascus	Inoculación del sustrato con esporas (50000 ufc)
HSVd	Agrotransformación con plásmido de sobreexpresión del viroide
Agrobacterium	Inoculación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Las muestras se tomaron 24 días a partir de la siembra de las plantas y 11 días después de haber realizado el tratamiento.

3.2. Extracción de sRNAs a partir de RNA total.

La purificación de los pequeños RNAs de las plantas control así como las sometidas a los diferentes estreses (apartado 3.1.) se realizó partiendo de muestras de RNA total siguiendo las instrucciones detalladas en el kit “REALTOTAL miRNA kit” (Durviz SL, Paterna, Valencia) con ligeras modificaciones.

Al tratarse de RNA total previamente purificado se empleó el protocolo descrito en el manual para la extracción de miRNAs a partir de muestras de sangre. Esta extracción comienza con la adición de un tampón de lisis, que proporciona las sales necesarias para facilitar una posterior precipitación de los ácidos nucleicos con etanol. A continuación se añade etanol a una concentración final de 35%, que precipita selectivamente los RNAs de mayor tamaño, los cuales quedan retenidos en una columna (“LargeRNA renoval Spin Column”). Al eluido se le añade etanol, y es ensamblado en una columna “microRNA”, en la que quedan acumulados estos pequeños RNAs. Mediante un tampón de lavado de RNA se eliminan las sales residuales, y finalmente, con un tampón de elución de RNA, los microRNAs son recogidos en un tubo eppendorf, los cuales pueden ser almacenados a largo plazo a -70°C, o a corto plazo a -20°C.

Por último, los sRNAs purificados son cuantificados en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

3.3. Reacción de Transcripción Reversa (RT) de los sRNAs.

Para la síntesis del cDNA de los miRNAs se empleó como cebador un oligo en forma de horquilla (stem-loop) (Fig. 4) con una secuencia en su extremo 3' complementaria a los 6-7 nucleótidos de la secuencia del miRNA que se desea amplificar (Tabla 4) (apartado 1.3.1.2., "Caracterización de miRNAs predichos"). Como paso previo a la reacción se realizó una desnaturalización de estos cebadores (95°C durante 10 minutos) seguida de una lenta renaturalización con el fin de asegurar un correcto plegamiento del oligo.

La RT se realizó utilizando el kit " RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Scientific).

Para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa, se elaboró una mezcla que contenía: 1 µl de dNTPs Mix (10 mM), 2 µl de sRNA (conteniendo cantidades variables de entre 1 y 100 ng totales) y 2 µl de agua estéril. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos, con el objetivo de romper la estructura secundaria de los sRNAs y evitar así la detención de la RT.

A continuación, a esta misma mezcla se le añadieron 2 µl de tampón de reacción 5x, 0,2 µl de *RiboLock RNase Inhibitor* (200 U/µl), 0,2 µl de RevertAid M-MuLV RT (20 U/µl), 1 µl del cebador RT específico (1µM) y 2 µl de agua estéril. Para aumentar la eficiencia de la reacción, se realizó una RT pulsada, cuyo protocolo de incubación se muestra en la Figura 5.

Asimismo se llevaron a cabo controles de reacción negativos a los que no se añadía transcriptasa reversa.

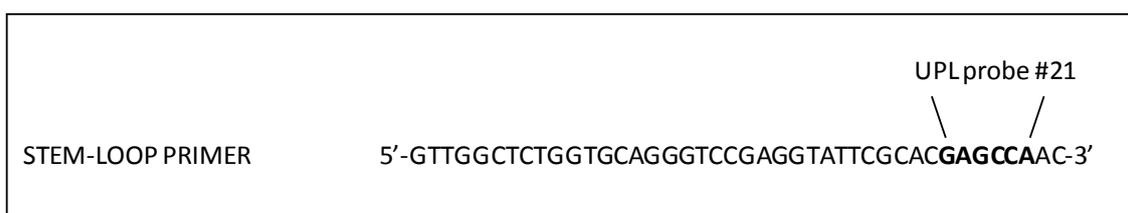


Figura 4. Secuencia universal del cebador stem-loop para RT. Incluye una secuencia para la unión de la sonda UPL#21 (Universal ProbeLibrary Probe 21) que permite el uso de sondas TaqMan para la detección en PCR cuantitativa. (Varkonyi-Gasic y Hellens, 2010)

Tabla 4. Secuencias del cebador específico para la RT de cada miRNA analizado. En minúsculas, la secuencia específica del miRNA.

miRNA	miRNA sequence	RT Primer sequence
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTagagc
miR160	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTggcat
miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAACTagagc
miR166	TCGGACCAGGCTTCATCCCC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAcggggaa
miR168	TCGCTTGGTGCAGGTCCGGAA	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAcctcccg
miR397	CATTGAGTGCAGCGTTGATGT	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAcAcatca
miR398	TGTGTTCTCAGGTCGCCCTG	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAcCagggg
miR408	ATGCACTGCCTCTCCCTGGC	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAcCgccagg

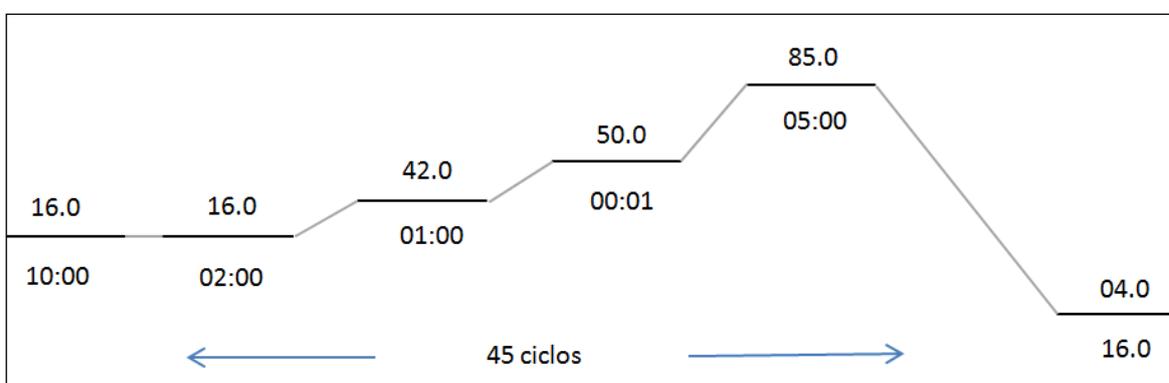


Figura 5. Protocolo de RT pulsada. En la parte de arriba se representa la temperatura y en la de abajo el tiempo.

3.4. Amplificación de miRNAs por PCR.

El cDNA correspondiente a cada miRNA y de cada una de las muestras fue amplificado por PCR. Para ello, se partió de una dilución 1:10 en agua MiliQ de cada uno de los productos de RT y se añadieron en tubos eppendorf los reactivos necesarios para que tenga lugar la reacción, incluyendo: 2 µl de cDNA, 5 µl de cebador directo (1 µM), 0,5 µl de cebador reverso (10 µM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1,5 µl de buffer 10x, 0,5 µl de Taq-polimerasa Netzyme® (1U/ µl) y 5 µl de agua estéril, resultando un volumen final de 15 µl para cada miRNA. Las secuencias del cebador directo específico para cada miRNA así como el reverso universal se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencias del cebador directo de PCR específico de cada miRNA y del cebador reverso universal. En mayúsculas, la secuencia específica del miRNA; en minúsculas, la cola de nucleótidos que se añade para equiparar las Tm.

miRNA	Forward Primer sequence	Universal Reverse Primer sequence
miR159	gcgccTTTGGATTGAAGGGAG	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR160	ctagtTTGCCTGGCTCCCTG	
miR162	gcgccTTTGGATTGAAGGGAG	
miR166	gcgaaTCGGACCAGGCTTC	
miR168	gggtatTCGCTTGGTGCAGG	
miR397	ccatgcCATTGAGTGCAGCG	
miR398	gcgcaTGTGTTCTCAGGTCG	
miR408	ccgcaATGCACTGCCTCTTC	

Los tubos se introdujeron en un termociclador de PCR Mastercycler® pro S (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), donde se completó la amplificación siguiendo el proceso que se muestra a continuación:

- | | | | |
|------------------------------|------|-------------|-------------|
| 1. Desnaturalización inicial | 94°C | 2 minutos | } 35 ciclos |
| 2. Desnaturalización | 94°C | 20 segundos | |
| 3. Alineamiento | 58°C | 30 segundos | |
| 4. Extensión | 72°C | 20 segundos | |
| 5. Extensión final | 72°C | 5 minutos | |
| 6. Conservación | 4°C | ∞ minutos | |

Una vez terminada la reacción, se comprobó la detección de estos miRNAs mediante una electroforesis en gel de acrilamida al 10% en tampón TBE 10x. El gel se preparó a partir de una mezcla de 5 ml de acrilamida en una proporción 29:1 (acrilamida/bisacrilamida), 750 µl de TBE 10x, 9 ml de agua estéril, 200 µl de persulfato amónico (APS) al 10% y 10 µl de TEMED. Las muestras corrieron 30 minutos a 200 voltios, el gel fue incubado en una solución de bromuro de etidio y finalmente, las bandas se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta a 250 nm.

3.5. Secuenciación de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron tratados con exonucleasas (ExoSAP-IT®). Para ello, se mezclaron 5 µl de producto de PCR y 2 µl de exonucleasas y se incubó, primero a 37°C durante 15 minutos para degradar los cebadores y nucleótidos restantes, y luego a 80°C durante 15 minutos para inactivar el reactivo ExoSAP-IT. Posteriormente, se procedió a la secuenciación

de dichos productos de PCR utilizando como cebador una secuencia compuesta por los 12 primeros nt del cebador stem-loop RT y una cola de 5 nt para equiparar la Tm (apartado 3.3., Figura 4). La secuenciación fue realizada por el servicio de Secuenciación de DNA y Análisis de la expresión génica del IBMCP con un “Secuenciador capilar ABI 3100”.

3.6. Clonación en plásmidos bacterianos.

Los miRNAs amplificados por PCR fueron clonados en plásmidos bacterianos, con el fin de obtener su secuencia. Esta estrategia consiste en colocar el segmento de cDNA de cada miRNA en una molécula de DNA extracromosómico autorreplicante y que contenga genes que permitan la selección de moléculas híbridas en el interior de una bacteria, la cual puede multiplicarse a gran velocidad formando clones (grupo de células con los mismos genes).

3.6.1. Ligación.

El primer paso para llevar a cabo el proceso de clonación de los cDNA es la ligación, con el fin de introducir el segmento del miRNA en un plásmido bacteriano. Para ello, se preparó, para cada miRNA, un tubo eppendorf en el que se mezclaron los siguientes componentes: 5 µl de producto de PCR (apartado 3.4) (dilución 1:5), 2 µl de tampón de ligasa 5x, 1 µl de vector pTZ57R/T (20 ng) y 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/µl), haciendo un total de 9 µl. Estos tubos se incubaron a 4°C toda la noche.

El vector utilizado para este proceso fue el pTZ57R/T (Fig. 6), el cual contiene un origen de replicación, que permitirá la replicación en la célula independientemente del cromosoma, así como un gen de resistencia a ampicilina (Ap^R), que permitirá que sólo sobrevivan aquellas bacterias que hayan insertado el plásmido, ya que la cepa bacteriana es sensible a este antibiótico. Además, para diferenciar los transformantes con y sin inserto se utiliza otro marcador, el gen lacZ, que codifica para la enzima β-galactosidasa, en cuya secuencia codificante se encuentra insertado un “sitio de clonación múltiple (“polylinker”) con secuencias de corte únicos para decenas de enzimas de restricción, así como dos ddT, que en nuestro caso serán utilizados para insertar el fragmento de PCR que contiene colas ddA en los extremos de su secuencia proporcionadas por la Taq polimerasa empleada.

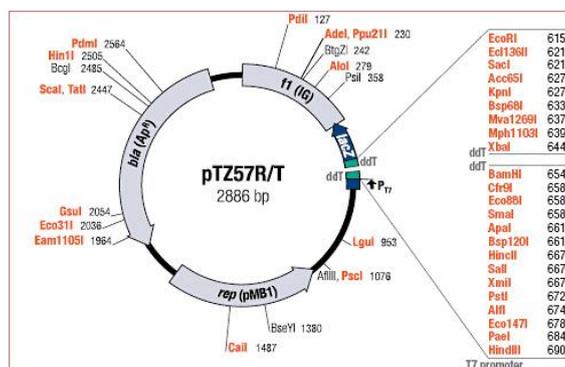


Figura 6. Vector pTZ57R/T, utilizado para llevar a cabo la ligación (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016)

3.6.2. Transformación.

A continuación, se realizó la transformación, que consiste en la introducción del DNA del plásmido que contiene el inserto del miRNA en bacterias competentes. En este caso, las bacterias utilizadas en este proceso son la estirpe de *Escherichia coli* DH5 α . Esta estirpe está modificada genéticamente, de manera que es posible inducir en el laboratorio la competencia de las células así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

Para realizar la transformación, se tomaron 5 μ l de producto de ligación y se añadieron a 50 μ l de células competentes, que fueron sometidas a electroporación, exponiéndose a una descarga eléctrica de 1700 voltios durante unos 5 milisegundos en un electroporador (Eppendorf Eporator®). Posteriormente, se añadieron a la mezcla 600 μ l de medio de cultivo LB sin antibióticos y las células fueron incubadas a 37°C durante media hora con el fin de favorecer la expresión del gen de resistencia.

Tras haber transcurrido el tiempo de incubación, las células DH5 α transformadas fueron sembradas en placas LB con ampicilina (50 μ g/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (20 ng/ μ l), un β -galactósido que es degradado por la β -galactosidasa. Uno de los productos de degradación del X-gal forma un precipitado de color azul sobre las colonias bacterianas con función β -galactosidasa, por lo que, tras incubar las muestras a 37°C toda la noche, las tres poblaciones bacterianas que se esperaba encontrar en una placa con LB+Amp+X-gal son:

- Bacterias no transformadas. Carecen del plásmido, por lo que no crecen en la placa dado que son sensibles a la ampicilina.
- Bacterias transformadas con plásmido no recombinante. Es decir, no presentan el inserto, por lo que crecen formando colonias de color azul, ya que son resistentes a ampicilina y tienen actividad β -galactosidasa.
- Bacterias transformadas con plásmido recombinante. El plásmido contiene el inserto de PCR, por lo que crecen formando colonias de color blanco, ya que son resistentes a ampicilina y no tienen actividad β -galactosidasa, al hallarse el gen truncado por la secuencia del inserto.

3.6.3. PCR de colonia.

En la práctica resultó difícil distinguir visualmente las colonias de bacterias que contenían el plásmido vacío o el recombinante, pues al ser el producto de PCR obtenido en la amplificación de los miRNAs tan pequeño (60 nt), la β -galactosidasa mantenía parte de su actividad. Así, se realizó una PCR de colonia de los clones que menos actividad β -galactosidasa presentaban para asegurar que, efectivamente, contenían el inserto y no resultaban falsos negativos. Para ello se utilizó un cebador específico del miRNA (apartado 3.4., Tabla 5) y oligos específicos del vector (M13 directo o reverso) (Tabla 6), con el fin de poder amplificar la

secuencia independientemente de la orientación en la que se hubiera insertado. Las condiciones del termociclador para la PCR fueron las mismas que las del apartado 3.4.

Tabla 6. Secuencia del cebador M13/pUC directo y reverso.

M13/pUC Forward	5'-CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13/pUC Reverse	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

En este caso, para la visualización del producto de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 7, acetato sódico 20 mM, EDTA 1 mM), con bromuro de etidio para la tinción del gel. Las muestras corrieron durante 20 minutos a 120 voltios y fueron observadas en un transiluminador con luz ultravioleta.

3.7. Extracción del DNA plasmídico (Miniprep).

A continuación se llevó a cabo la purificación del DNA plasmídico recombinante a partir del cultivo bacteriano mediante una miniprep, utilizando el kit “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Scientific™).

Para ello se crecieron las bacterias en 4 ml de medio LB con ampicilina manteniéndose a 37°C en agitación toda la noche. El contenido se pasó a tubos de 5 ml, los cuales se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos, eliminando después el sobrenadante. En caso de que la extracción no se fuera a realizar en el momento, el pellet se congelaría a -20°C.

A continuación, se siguió el protocolo del fabricante del kit. Este método, se basa en resuspender primero el pellet con una solución de resuspensión para luego romper las células del cultivo mediante una solución de lisis. Tras esto, se añade una solución de neutralización, que provoca la renaturalización del DNA plasmídico y la precipitación de proteínas y del DNA cromosómico. Los agregados insolubles se separan por centrifugación, quedando el DNA plasmídico en el sobrenadante, el cual se transfiere a una columna de spin “GeneJet”, en la que se añade la solución de lavado (que contiene etanol), y tras centrifugar varias veces, la columna se traspasa a un tubo eppendorf donde se recogerá el DNA plasmídico purificado, después de la adición del buffer de elución.

El DNA plasmídico purificado tras haber realizado la miniprep se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

3.8. Secuenciación.

El inserto fue secuenciado utilizando como cebador el oligo M13 directo específico del plásmido. La secuenciación fue realizada por el servicio de Secuenciación de DNA y Análisis de la expresión génica del IBMCP con un “Secuenciador capilar ABI 3100”.

3.9. PCR cuantitativa.

3.9.1. Comprobación de la eficiencia de la reacción.

La comprobación de la eficiencia de reacción de PCR para la cuantificación de los miRNAs por qPCR se realizó a partir de diluciones seriadas (1:1, 1:5, 1:25, 1:125) de una dilución previa 1:4 de la RT obtenida a partir de RNA total de planta sana (apartado 3.2.).

Para ello, se cargaron los pocillos de una placa de PCR con una mezcla compuesta por: 4 µl de Mix 5x PyroTaq (Cultek Molecular Bioliner) (incluye dNTPs, tampón, DNA polimerasa y EVA Green), 0,8 µl de cebador reverso universal (10 µM), 8 µl de cebador directo (1 µM) específico del miRNA (apartado 3.4 Tabla 5), 4 µl de agua estéril y 4 µl de las distintas diluciones de cDNA.

Asimismo, en la comprobación de la eficiencia de la qPCR en la cuantificación de la acumulación relativa de los transcritos de algunas posibles dianas de los miRNAs, se partió de una dilución 1:16 de una mezcla de cDNAs proveniente de cada una de las muestras, sobre la que se hicieron diluciones seriadas (1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000). La reacción de PCR para este caso estaba compuesta por: 4 µl de Mix 5x PyroTaq, 2,4 µl de una mezcla de cebador directo y reverso específicos (Tabla 7) del transcrito a 10 µM, 8 µl de las distintas diluciones de cDNA y 5,6 µl de agua estéril.

Tabla 7. Secuencias del cebador directo y reverso de cada una de las posibles dianas de los miRNAs analizados por qPCR.

miRNA	mRNA target	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
miR160	Factor de respuesta a la auxina (ARF17)	5'-TGAAAATGCCTGTGGAGACG-3'	5'-CCCATGTAACCTCAAGCATACG-3'
miR166	Subunidad I de la RNA polimerasa	5'-AGCAGACAGATGAGATCGGC-3'	5'-GAACCAACCAACTAATCCAAGG-3'
miR397	Lacasa	5'-CCCTTCACAAAGGGGCTTC-3'	5'-ACTGTTAACCTGTGGCCTGC-3'
miR398	Cupredoxina	5'-CTCACAACGTCGGCGATTC-3'	5'-CCGGTGGTGAAATTGAAAAAGAG-3'

En ambos casos se realizaron tres réplicas por miRNA y dilución.

Una vez preparada la placa, se calculó la eficiencia de la reacción en un termociclador “PCR cuantitativa ABI 7500 Fast-Real Time” del servicio de Secuenciación de DNA y Análisis de la expresión génica del IBMCP.

3.9.2. Reacción qPCR.

Para el cálculo de las diferencias en la abundancia de los miRNAs y de sus dianas en las diferentes muestras se realizaron reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real. El proceso se realizó de forma similar a lo descrito para el análisis de la eficiencia de la reacción (apartado 3.9.1.) con cDNAs procedente de cada una de las muestras.

En el caso de los miRNAs, se partió de una RT realizada con 100 ng de un extracto de pequeños RNAs (apartado 3.3.) diluida 4 veces; en el caso de las dianas, la qPCR se realizó a partir de una dilución 1:84 de producto de RT, para la cual se emplearon 1,5 µg de RNA total utilizando cebadores oligo dT y siguiendo el kit del comerciante “RevertAid RT Reverse Transcription Kit” (Thermo Fisher Scientific). Por ser el nivel de expresión del mRNA diana del miRNA 160 muy bajo, para éste se partió de una dilución 1:16 del cDNA. Las condiciones del termociclador para llevar a cabo la reacción se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8. Condiciones de la reacción qPCR.

Ciclo de PCR	Ciclo de curva de melting
50°C 20'' 95°C 15' 95°C 15'' } 40 ciclos 60°C 1' } → Lectura de fluorescencia	95°C 15'' 60°C 1' → 95°C 30'' Rampa del 1% 60°C 15' y lectura de fluorescencia

La posición de las muestras en la placa de PCR se realizó según se detalla en la Figura 7. Este experimento se repitió un mínimo de dos veces.

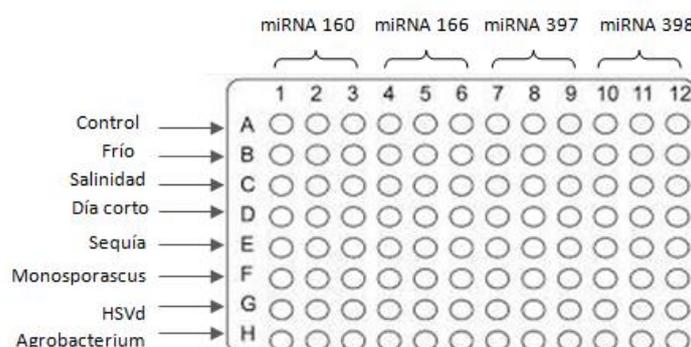


Figura 7. Placa de 96 pocillos para PCR cuantitativa. Se realizaron tres réplicas de cada miRNA por lo que cada tres columnas son para el mismo miRNA. Las filas se diferencian en el tipo de tratamiento al que fueron sometidas las muestras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación en el que se estudia el efecto que determinados estreses bióticos y abióticos tienen sobre las poblaciones de pequeños RNAs de melón (*Cucumis melo*), con el fin de estudiar el papel de éstos en la regulación de las respuestas a estrés. A continuación, se analizarán los resultados obtenidos en el estudio de determinados miRNAs, así como una validación biológica de los mismos.

4.1. Detección de los miRNAs mediante RT-PCR.

De entre las secuencias obtenidas por secuenciación masiva de los pequeños RNAs presentes en muestras de melón sometidas a diferentes estreses (apartados 1.3.1.2. y 3.1) se seleccionaron algunas que presentaban una homología del 100% con miRNAs previamente descritos en alguna especie de la familia Viridiplantae como miRNAs candidatos para la validación biológica de los resultados de secuenciación (Tabla 9). Algunas de ellas se acumulan de forma diferencial en algunos estreses, mientras que otras no cambian significativamente, y se tomaron como miRNAs de referencia.

La expresión de los diferentes miRNAs fue detectada mediante un proceso que tuvo lugar en dos etapas a partir de un extracto de pequeños RNAs, sin realizarse un tratamiento con Dnasa, pues aunque una contaminación con DNA genómico podría resultar en una cuantificación inexacta (Bustin, 2002) la presencia de dichos ácidos nucleicos en estas muestras purificadas es mínima.

4.1.1. RT pulsada.

El primer paso consiste en la transcripción reversa del miRNA para lo cual es necesaria la hibridación del cebador que permita que se produzca la reacción. En nuestro caso optamos por la utilización de un oligo en forma de horquilla (stem-loop) para la RT, pues según la bibliografía proporciona una gran especificidad, amplificando específicamente las formas maduras de los miRNAs (Chen *et al.*, 2005). La especificidad de este cebador a cada miRNA es conferida por una extensión de seis nucleótidos en el extremo 3', cuya secuencia es la complementaria reversa de los últimos seis nucleótidos del extremo 3' del miRNA (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007). El cebador RT stem-loop utilizado en este trabajo es una modificación del diseñado por Chen y colaboradores en 2005 (Fig. 8), para incluir una secuencia de reconocimiento de una sonda TaqMan universal (Universal Probe Library Probe #21) (Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007).

La RT es un paso crítico para una cuantificación sensible y precisa, y la cantidad de cDNA producida por la transcriptasa reversa debe representar exactamente la cantidad de RNA de partida. Por tanto, el rango dinámico, sensibilidad y especificidad del enzima son las principales consideraciones para un ensayo RT-PCR exitoso. En nuestro caso, para realizar este ensayo, la RT se llevó a cabo partiendo de 50 ng de un extracto de sRNAs, un valor intermedio

a lo observado en la bibliografía existente relacionada con la detección de miRNAs (Kramer *et al.*, 2011; Czimmerer *et al.*, 2013).

Normalmente, las reacciones RT son llevadas a cabo entre 40-50°C y estas bajas temperaturas pueden contribuir a la no especificidad relativa de la reacción. Esto, además, resulta un problema cuando las concentraciones de la muestra de partida son muy bajas. Es por ello, que en una RT normal, las reacciones secundarias no específicas pueden competir fuera de la reacción deseada y, si la concentración de la verdadera diana es suficientemente baja, se produce la inhibición completa del producto específico de amplificación (Bustin, 2002).

Por esta razón, se realizó una reacción RT pulsada (apartado 3.3.), en la que los tiempos de exposición a las diferentes temperaturas son menores y en la que se estabiliza el cebador al hibridar a baja temperatura, con el fin de incrementar la eficiencia de la RT y reducir también las interacciones no específicas entre los cebadores para los diferentes miRNAs. Asimismo, este tipo de reacción proporciona una mejor sensibilidad de detección comparado con una condición no pulsada (Tang *et al.*, 2006).

4.1.2. Amplificación por PCR.

El segundo paso consiste en la amplificación por PCR del cDNA. Para ello se empleó un cebador reverso universal presente en la horquilla del oligo empleado en la transcripción reversa y un cebador directo específico del miRNA consistente en la secuencia de miRNA (excepto los seis últimos nucleótidos del extremo 3') con la adición de una cola de 5-7 nucleótidos en el extremo 5' necesaria para equiparar la T_m a la del cebador reverso universal (Fig. 8).

El producto de la reacción fue visualizado por tinción con bromuro de etidio de un gel de poliacrilamida. Según puede observarse en la figura 9 se obtuvo un producto específico para todos los miRNAs ensayados con el tamaño esperado de amplicón (60 nucleótidos); si bien la cantidad de producto observada para cada uno de ellos no se correspondía con la abundancia determinada en las librerías (Fig. 9B), ello podría deberse a diferencias en la eficiencia de unión del cebador para la RT o la amplificación de los diferentes oligos.

Por otra parte, los controles negativos (reacciones de RT sin transcriptasa reversa) no dieron lugar a productos visibles en las mismas condiciones (datos no mostrados).

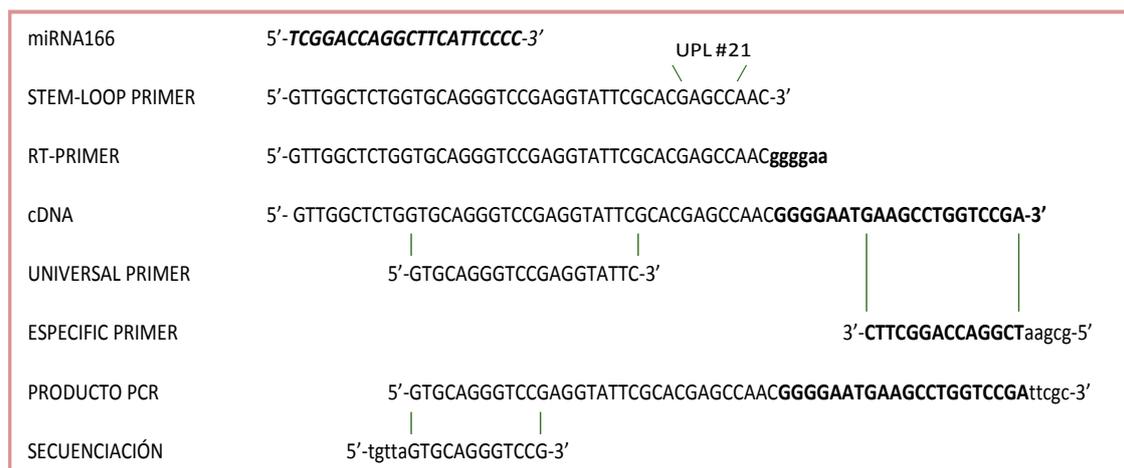


Figura 8. Ejemplo de diseño de los cebadores para la amplificación de miRNAs por RT-PCR. Caso particular del miRNA166. La secuencia del cebador reverso universal obtenido a partir de la secuencia del cebador RT stem-loop. La secuencia del cebador directo específico es la complementaria del miRNA con 5 nucleótidos añadidos para conferir una Tm de 60°C. Por último, diseño del oligo para secuenciar el producto de PCR.

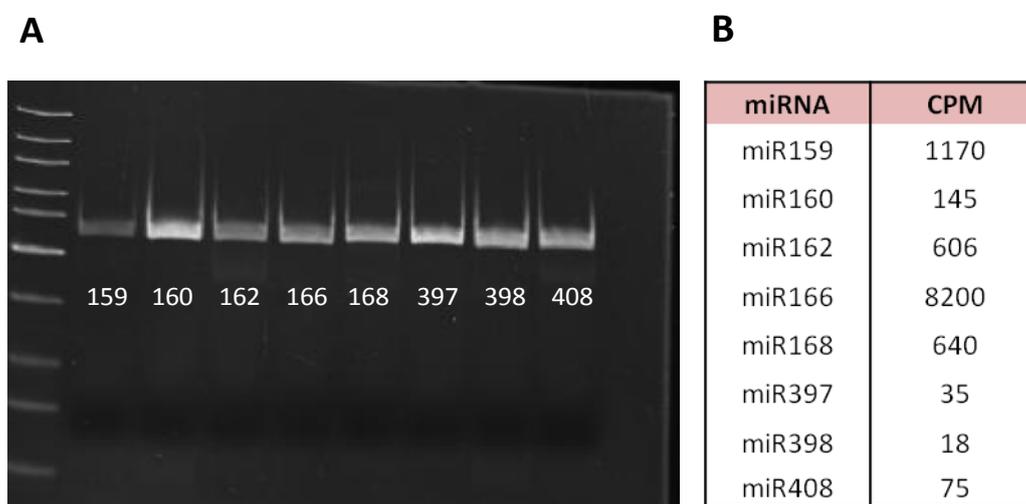


Figura 9. Resultados de la detección de los miRNA por RT-PCR. (A) Resultado en gel de poliacrilamida de la presencia de los miRNAs seleccionados en una muestra de melón de planta sana. (B) Datos en CPM de la abundancia de cada miRNA obtenidos mediante herramientas informáticas a partir de los datos de secuenciación masiva.

4.1.3. Evaluación de los productos de PCR por secuenciación.

Si bien los productos de la reacción de PCR tenían el tamaño esperado, para verificar que la secuencia amplificada se correspondía con el miRNA en cuestión y no era un producto inespecífico o un artefacto se procedió a secuenciar los amplicones obtenidos. En primera instancia se llevó a secuenciar el producto de PCR tratado con exonucleasas utilizando como cebador una pequeña secuencia diseñada en el extremo 5' (apartado 4.1.2., Fig. 8). Al tratarse de una secuencia tan pequeña, se encuentra por debajo del límite mínimo requerido para obtener una secuencia de calidad, no pudo leerse la secuencia completa del miRNA, a pesar de ello, con esta aproximación se obtuvieron secuencias únicas con una homología de

aproximadamente el 80% a la secuencia esperada (Fig. S2). Así, podía decirse que se trataba de productos específicos para cada miRNA.

Corroborada de forma aproximada la bondad de la técnica empleada y con el fin de obtener la secuencia exacta del miRNA amplificado se procedió a clonar los amplicones en un vector bacteriano para su posterior secuenciación.

El vector empleado fue el pTZ57R/T, que inserta fragmentos con extremos de adenina dentro un gen lacZ, interrumpiendo generalmente su expresión e impidiendo, por tanto, la producción de β -galactosidasa. Por esta razón, las bacterias transformadas por un plásmido recombinante y crecidas en un medio con X-gal aparecerían de color blanco, mientras que las que contuvieran el plásmido vacío adquirirían un tono azulado.

Los resultados obtenidos tras la transformación mostraron que prácticamente la totalidad de las colonias crecidas eran azules, y sólo en unos pocos casos, y después de reducir la concentración de X-gal en las placas unas 4 veces, se obtenían colonias blancas.

Por esta razón, la presencia del inserto se confirmó mediante una PCR de colonia. Este análisis estructural tanto de los plásmidos recombinantes como de los no recombinantes no sólo tiene este objetivo, sino que también determina la orientación de dichos insertos. Para cada miRNA se analizaron un total de 8 colonias utilizando un cebador específico del miRNA (apartado 3.4., Tabla 5, cebador directo) junto con un cebador específico del vector (M13 directo o M13 reverso)(apartado 3.6.3., Tabla 6).

La práctica totalidad de las colonias azules analizadas por PCR de colonia contenían un plásmido con inserto (Fig. S3). Ello se debería a que la secuencia introducida, de 60 nucleótidos, no sólo no altera la pauta de lectura del gen lacZ, sino que además, la adición de esos 20 aminoácidos extra a la secuencia de la β -galactosidasa no afecta a su actividad, resultando en colonias azules.

A continuación se llevaron a secuenciar 5 minipreps procedentes de colonias que habían dado positivo en la PCR de colonia utilizando el oligo M13 directo como cebador, resultando que el 100% de ellas contenían una secuencia idéntica al miRNA sobre el cual se había realizado la RT-PCR.

Así, pudimos comprobar que la técnica de stem-loop RT-PCR empleada resulta efectiva para la detección y amplificación específica de miRNAs.

4.1.4. Determinación de la cantidad mínima detectable por RT-PCR.

Una vez comprobada la amplificación de los miRNAs de las bandas a partir de 50 ng de un extracto de pequeños RNAs, se estudió cuál sería la cantidad mínima de RNA necesaria para su detección, ya que se trata de muestras valiosas y, además, hay que consumir RNA por cada miRNA a estudiar debido a que son reacciones específicas. Para ello, se realizaron RT a partir de distintas cantidades de RNA (50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng y 1 ng), amplificando de forma específica los miRNAs 160, 166 y 168 (Fig. 10), seleccionados por presentar diferentes niveles de acumulación según los datos obtenidos de las librerías de sRNAs secuenciadas (Fig. 10B).

Los resultados obtenidos reflejan que los tres miRNAs son detectados a partir de tan sólo 1 ng de RNA inicial. Además, si bien no se observan diferencias en la intensidad de las bandas para cada miRNA amplificado a partir de 50 y 25 ng de sRNA, éstas empiezan a hacerse patentes cuando se disminuye la cantidad de RNA de partida, existiendo una correlación entre la cantidad de producto de PCR y la abundancia del miRNA observada en las librerías de sRNAs (CPM). Todo ello apunta a una eficaz amplificación de los miRNAs, lo cual hace posible un análisis cuantitativo de los mismos en las diferentes muestras.

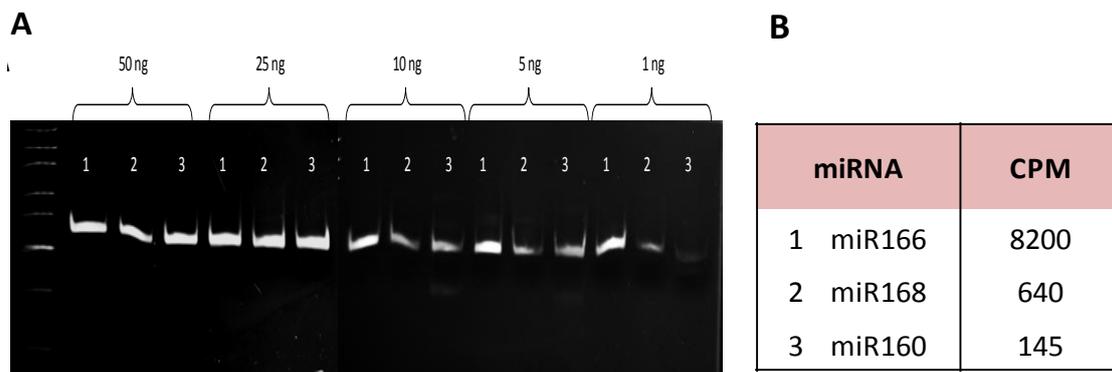


Figura 10. Resultado de la amplificación de los miRNAs 160, 166 y 168, partiendo de distintas cantidades de sRNAs. (A) Resultado de las electroforesis en gel de poliacrilamida de las RT realizadas a partir de distintas cantidades de RNA (50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng y 1 ng). (B) Datos de la abundancia de los miRNAs 160, 166 y 168 obtenidos a partir de las librerías de sRNAs medida en cuentas por millón.

4.2. Validación de la acumulación diferencial de miRNAs por RT-qPCR.

4.2.1. Eficiencia de la qPCR para los miRNAs.

Aunque observamos que por RT-PCR convencional se pueden detectar miRNAs a partir de 1 ng de sRNA (apartado 4.1.4), estudios previos realizados en el laboratorio pusieron de manifiesto que para obtener unos niveles detectables de un determinado miRNA en qPCR es preciso partir de al menos 100 ng de sRNA. Ello podría deberse a que el amplicón resultante de la reacción de PCR (60 nt) se encuentra por debajo del umbral para el cual ha sido diseñada la técnica. Así, esa es la cantidad de sRNA que se emplea en la RT para los análisis de acumulación relativa de miRNAs en las diferentes muestras.

Para determinar experimentalmente la eficiencia de la qPCR, se generó una curva estándar para cada miRNA a estudiar, así como de sus respectivos mRNAs dianas, mediante la realización de una qPCR a partir de diluciones seriadas de una mezcla de las distintas muestras. La determinación de esta eficiencia resulta una herramienta excelente para probar la eficiencia del ensayo, la precisión, la sensibilidad y el rango de trabajo, y es calculada a partir de la pendiente de la recta usando la ecuación: $\text{Eficiencia} = 10^{(-1 / \text{pendiente})} - 1$.

Si, finalmente, la PCR es 100% eficiente, la cantidad de cDNA se doblará con cada ciclo y la pendiente de la curva estándar será -3.33 ($100 = 100\% = 10^{(-1 / -3,33)} - 1$). Por tanto, una pendiente entre -3.9 y -3,0 (Eficiencia 80 a 110%) es aceptable.

En general, los resultados obtenidos mostraron una eficiencia del 90-110% (Fig. S4), salvo los miRNAs 160 y 166, cuyos valores eran mayores debido a su baja abundancia, por lo que nos encontramos en el límite de detección.

4.2.2. Análisis de la expresión diferencial de los miRNAs.

Uno de los objetivos principales de este estudio consiste en la validación biológica mediante el método RT-qPCR de una serie de miRNAs obtenidos previamente por secuenciación masiva y que se encuentran diferencialmente representados en librerías.

El análisis bioinformático de la acumulación relativa de las secuencias en las librerías de sRNAs no forma parte del ámbito de este trabajo, no obstante, a continuación hago una presentación somera de aquellos resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio que son necesarios para la comprensión de los resultados.

Las secuencias fueron analizadas por el Servicio de Bioinformática del IBMCP, y a partir de ellas se detectaron diferencias significativas basándose en el número de lecturas (CPM) obtenidas para cada una de ellas. Estas diferencias fueron medidas en valores de LogFoldChange (logaritmo en base dos del ratio muestra tratada/control) (Tabla 9), el cual indica la variación producida en la acumulación de una secuencia sometida a un determinado tratamiento respecto a la muestra no tratada. Por una parte, que este valor sea positivo o negativo indica una mayor expresión en las muestras procedentes de plantas sometidas a una situación potencialmente estresante o en plantas control, respectivamente.

Tabla 9. Valores de Log Fold Change de los miRNAs para cada una de las muestras. Los valores que se encuentran en celdas coloreadas presentan un p-value < 0,05, es decir, son estadísticamente significativos. Los distintos colores representan el nivel de acumulación de los miRNAs en cada una de las muestra respecto al control, reflejado en la escala de colores, debajo de la tabla.

miRNA	Sequence	COLD	DROUGH T	SALINITY	SHORT DAY	MONOSP.	HSVd	AGRO.
miR159	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA	-0,68	-0,25	0,46	0,02	0,10	-0,01	-0,15
miR160	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	-2,20	-0,77	0,02	0,29	-0,84	-1,21	-0,15
miR162	TCGATAAACCTCTGCATCCAG	1,27	-0,26	0,09	0,44	0,24	-0,05	0,52
miR166	TCGGACCAGGCTTCATCCCC	-2,63	-0,02	1,11	-0,27	0,51	-0,63	0,31
miR168	TCGCTTGGTGCAGGTCGGGA A	-4,04	-2,58	0,02	-0,72	-1,07	-1,78	-0,51
miR397	CATTGAGTGCAGCGTTGATGT	8,50	11,64				10,81	9,85
miR398	TGTGTTCTCAGGTCGCCCTG	8,09	9,17	-0,69	-0,74	-0,44	10,62	9,30
miR408	ATGCACTGCCTCTCCCTGGC	1,89	6,43	0,38	-1,93	-1,80	6,13	7,38



Para obtener una cuantificación relativa precisa de los miRNAs es necesario evaluar también el nivel de acumulación de una pequeña secuencia que se mantenga constante en las diferentes muestras analizadas y que actúe como control endógeno. Usando este control como una referencia activa, es posible normalizar la cuantificación de los miRNAs y así compensar las diferencias existentes como consecuencia de variaciones en la cantidad de cDNA en cada reacción. Algunos de los factores que causan las diferencias en la cantidad de cDNA haciendo necesaria esta normalización son la imprecisión en la medida del RNA tras la extracción, las diferencias en la integridad del RNA, así como errores durante el pipeteo.

Puesto que *a priori* no disponíamos de información acerca de miRNAs que permanecieran estables en las diferentes muestras analizadas, los buscamos en la información procedente de la secuenciación de las diferentes librerías de sRNAs. Así, seleccionamos los miRNAs 159 y 162 como controles de referencia, por mostrar una homología del 100% con miRNAs previamente descritos (lo cual los identificaba como verdaderos miRNAs), tener unos niveles medios de abundancia, y no presentar diferencias importantes ($LFC < 1,2$) en los valores de expresión entre las muestras sometidas a estrés y el control.

La acumulación relativa de ambos miRNAs fue analizada por qPCR observándose que los valores de expresión se encuentran alrededor de 1 en todas las muestras, es decir, no difieren con los observados en las muestras procedentes de las plantas no sometidas a condiciones de estrés.

A continuación se realizó la media geométrica de los valores observados en cada uno de los miRNAs de referencia para cada muestra. Estos datos son los que se utilizaron para normalizar los resultados de los miRNAs a validar (Fig. 11).

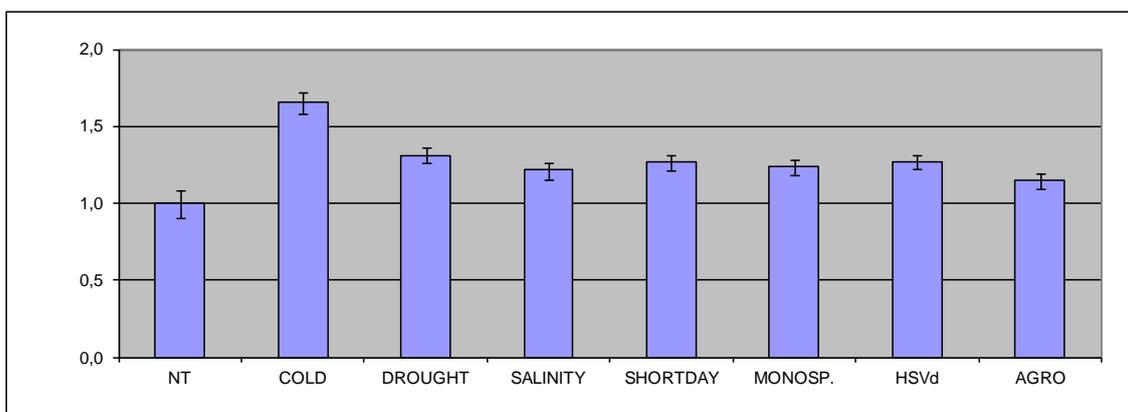


Figura 11. Representación de los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los controles endógenos para la validación de los miRNAs. Es un control normalizador que resulta de la media geométrica obtenida a partir de los miRNAs 159 y 162, habiendo realizado dos réplicas para cada uno de ellos.

A continuación, para validar la predicción bioinformática, se analizó la expresión diferencial de cuatro miRNAs distintos por qPCR (miR160, miR166, miR397 y miR398). Los datos de expresión relativa se calcularon mediante el método $\Delta\Delta Ct$, en el que primero se normaliza con el control de referencia y luego con la muestra no tratada. Los resultados se muestran en la figura 12.

En primer lugar, se estudió el miRNA 397. Como se puede observar existe una sobreexpresión de este miRNA en las muestras sometidas a estrés por frío y sequía y en respuesta a la infección con HSVd y Agrobacterium, mientras que en el resto de muestras no se producen cambios significativos respecto al control. Estos resultados se correlacionan con los datos provenientes de las librerías, ya que éstos muestran unos valores positivos y elevados de LFC para aquellas muestras en las que se refleja gráficamente un mayor cambio (FC) (Fig. 12A). Por otra parte, los niveles de acumulación de este miRNA en las librerías procedentes de muestras crecidas en condiciones de salinidad, día corto e infección con Monosporascus no fueron lo suficientemente abundantes y/o consistentes como para reflejar un valor, y se consideró no detectable. Sin embargo, por qPCR somos capaces de detectar una leve expresión; ello podría deberse a que cuando los niveles de expresión son tan bajos que se encuentran cerca del límite de detección aumenta la señal debida a productos de reacción inespecíficos.

Resultados similares presenta el miRNA 398 (Fig. 12B). Al igual que en el caso anterior, en éste también se observa una alta expresión en frío, sequía, HSVd y Agrobacterium, mientras que en salinidad, día corto y Monosporascus apenas era detectado. En general, existe una cierta correlación entre los resultados de la qPCR y los de las librerías, aunque ésta no es exacta, ya que gráficamente, debería mostrar mayor abundancia las muestras tratadas con HSVd en vez de sequía.

En el caso de los miRNAs 160 (Fig. 12C) y 166 (Fig. 12D), los cambios de expresión producidos en las distintas muestras son mucho menores en comparación con los dos miRNAs anteriores. Respecto al primero de ellos, se puede apreciar una cierta correlación con los valores obtenidos de la secuenciación masiva, pues en todos los tratamientos se muestra una menor expresión que en el control, mientras que en el segundo miRNA, esta correlación no es del todo percibida. Esto podría deberse al tamaño de las secuencias que se pretenden detectar, el cual es mucho menor que el mínimo que requiere esta técnica para asegurar una buena cuantificación, por lo que la sensibilidad de la qPCR se ve afectada. Por esta razón, resultará más difícil la detección de un miRNA en aquellas muestras en las que el cambio de expresión frente al control no es lo suficientemente grande. Por otra parte, según se vio en el apartado 4.2.1., la eficiencia de la reacción para estos miRNAs estaba fuera de los límites aceptables, lo cual hace que sea menos precisa la evaluación del cambio.

En general observamos que la amplitud del cambio observado por qPCR es mucho menor a lo detectado en la secuenciación masiva de las librerías de sRNAs. Así, se pone de manifiesto que la segunda técnica es mucho más eficiente y sensible en la detección de pequeñas secuencias. Asimismo, se pone en entredicho la bondad de la validación biológica utilizando técnicas como la qPCR, pues sólo permite detectar de forma fiable aquellas secuencias con una magnitud de cambio entre las muestras considerablemente grande.

Una posible solución para aumentar la sensibilidad de la qPCR y mejorar así la detección podría ser el uso de sondas Taqman en lugar de realizar la cuantificación a partir de fluoróforos que se intercalan como en este caso lo es el EVA Green empleado en la reacción.

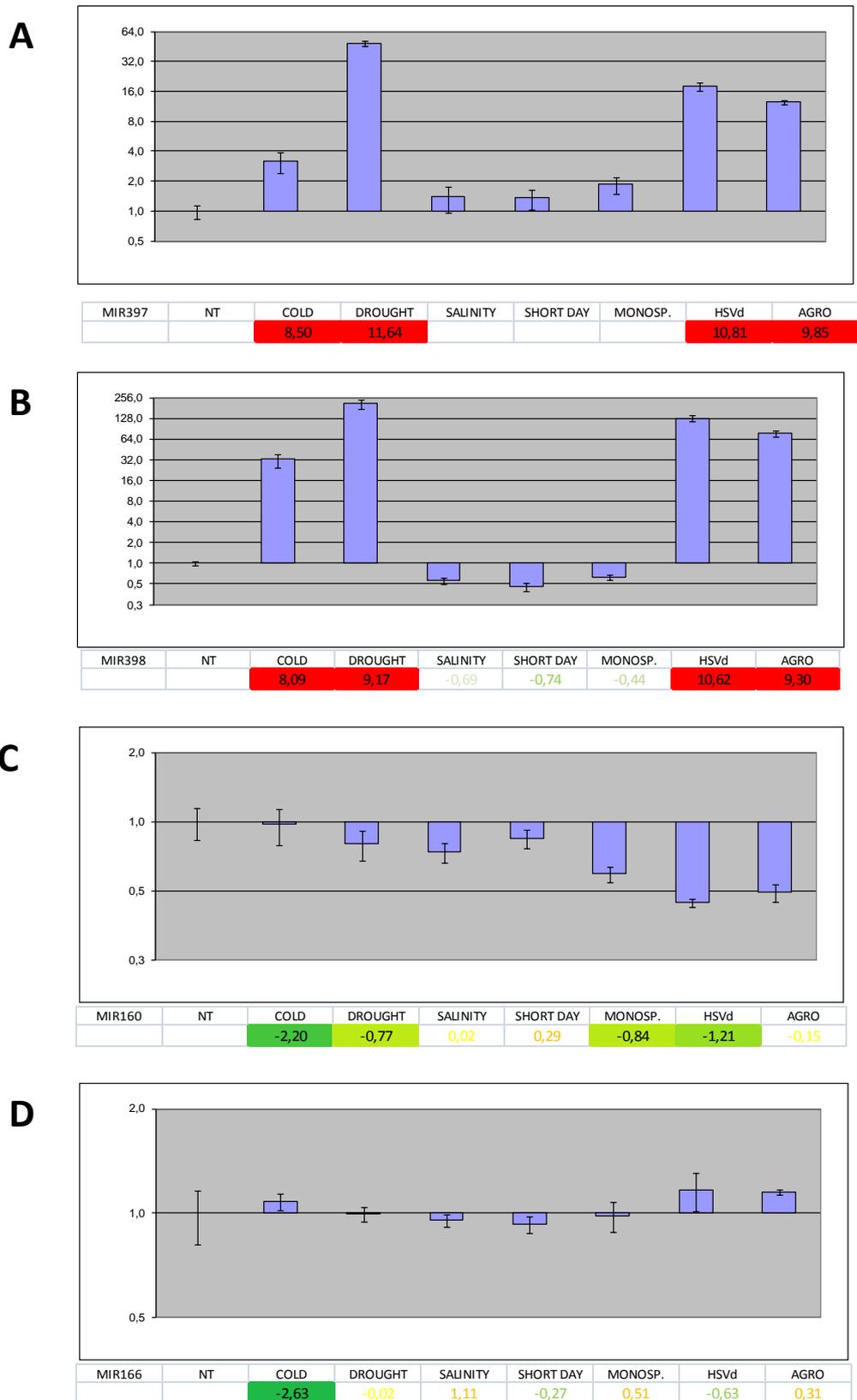


Figura 12. Resultados de la validación biológica de los miRNAs por qPCR. Las gráficas muestran la expresión diferencial de los miRNAs obtenida mediante qPCR en cada uno de los diferentes estreses. Esta expresión está medida en magnitudes de cambio (FC) y representada en escala logarítmica en base 2. Las tablas muestran los valores de LFC pertenecientes a las librerías. Las celdas coloreadas presentan un p-value < 0,05, por lo que representan valores significativos. (A) Validación del miRNA397. (B) Validación del miRNA398. (C) Validación del miRNA160. (D) Validación del miRNA166.

4.3. Análisis de la acumulación diferencial de los mRNAs.

4.3.1. Predicción de las potenciales dianas de los miRNAs estudiados.

A continuación, se procedió a la búsqueda de los posibles mRNAs diana cuya acumulación podría estar regulada por los miRNAs estudiados en el apartado anterior. Con esta finalidad, se utilizó la herramienta psRNA Target (Dai y Zhao, 2011), que permite analizar distintas secuencias mediante la realización de una serie de alineamientos, obteniendo así los mejores candidatos como posibles mRNA diana. Este análisis se basa en dos parámetros principales que son, la expectativa y la UPE, los cuales miden la complementariedad entre el miRNA y su diana, y accesibilidad del mRNA por su correspondiente miRNA, respectivamente.

Una vez obtenidas aquellas secuencias que se presentan como mejores candidatos a ser mRNAs dianas de los miRNAs anteriores, se determinó la función de cada uno de ellos mediante la búsqueda de secuencias homólogas bien en melón o en otras especies. Para ello, se utilizó la herramienta bioinformática BLASTx (Altschul *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 10.

Tabla 10. mRNAs dianas seleccionados como mejores candidatos a ser regulados por cada miRNA.

miRNA	DIANA	FUNCIÓN
miR160	<i>Cucumis melo</i> auxin response factor 17 (ARF17) (XM_008447139.1)	Regula los genes de respuesta temprana a la auxina, encargada de la elongación de las células.
miR166	<i>Cucumis melo</i> DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA12-like (XM_008447114.1)	Enzima encargada del proceso de transcripción produciendo RNA.
miR397	<i>Cucumis melo</i> laccase-4-like (XM_008444242.1)	Enzima encargada de catalizar la oxidación de un sustrato y de la reducción de oxígeno a agua.
miR398	Cucumber peeling cupredoxin-like (XM_008458647.1)	Enzima que contiene uno o más iones de cobre y que participa en procesos de óxido reducción y en el transporte de oxígeno.

4.3.2. Eficiencia de la qPCR para los mRNAs dianas.

Del mismo modo a como se procedió en el caso de la validación biológica de los miRNAs, como paso previo a la evaluación de la expresión de los mRNAs diana se realizó un análisis de la eficiencia de la qPCR. Los detalles de la reacción se muestran en el apartado 3.9.1. de materiales y métodos. En esas condiciones se observó que la eficiencia de la reacción oscilaba

en torno a 100 y 110% en todos los transcritos analizados, salvo en el caso del factor de respuesta a auxinas ARF17, que rondaba el 160%. Ello se debía a que los niveles de expresión de dicho gen eran muy bajos en las muestras analizadas, y tuvo que incrementarse la cantidad de cDNA de partida en 4 veces para que la eficiencia de la reacción llegara a límites aceptables.

4.3.3. Análisis de la expresión diferencial de los mRNAs dianas por RT-qPCR.

Los mRNAs predichos a través de herramientas bioinformáticas se validaron biológicamente. Como en el caso de los miRNAs, éstos fueron normalizados con genes control, como el factor de ribosilación del ADP (*Cucumis melo* ADP-ribosylation factor-like; XM_008463181.1), la proteína profilina (*Cucumis melo* profilin; NM_001297545.1) o la actina (*Cucumis melo* actin-7; XM_008442791.1) (Fig. 13), cuya expresión no presenta cambios significativos entre las muestras sometidas a los distintos tratamientos de estrés (Kong *et al.*, 2014).

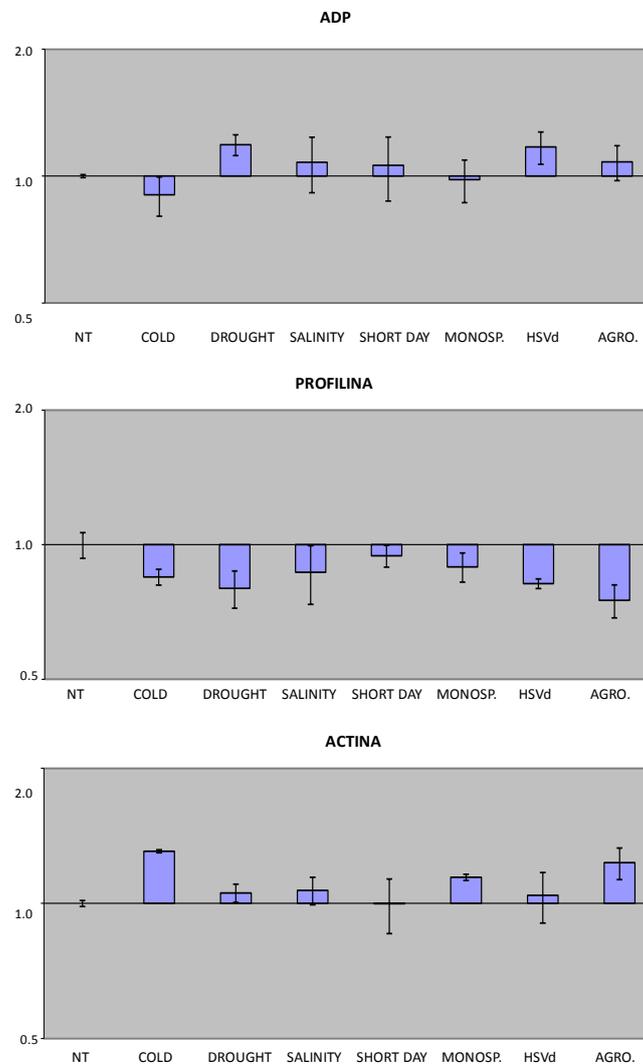


Figura 13. Representación de los resultados obtenidos en el análisis de expresión de los genes de referencia para la validación de los mRNAs. El factor de ribosilación del ADP, la proteína profilina y la actina son los genes control, ya que su expresión no presenta cambios significativos entre las distintas muestras.

Del mismo modo a como se actuó en el caso de los miRNAs, el control de referencia con el que se hizo la normalización de los datos de qPCR que se muestran a continuación procedía del resultado de hacer la media geométrica de los valores relativos obtenidos para cada uno de los tres genes control en cada una de las muestras.

Para validar biológicamente las dianas predichas "*in silico*", primero se analizó la expresión diferencial de los distintos mRNAs mediante el método RT-qPCR y luego se estudió su correlación con la de los miRNAs.

Si partimos de la hipótesis previa de que la principal función de los miRNAs consiste en la degradación de los transcritos reconocidos por ellos, cuanto mayor sean los niveles de un determinado miRNA menor debería ser la acumulación del mensajero diana.

Los resultados obtenidos para el factor de transcripción de respuesta a la auxina (XM_008447139.1), que es identificado como una posible diana del miRNA 160, muestra una sobreexpresión en cada uno de los tratamientos, siendo mayor en sequía y frío (Fig. 14A). Tras comparar los datos con los obtenidos de la acumulación del miRNA, se puede observar cierta correlación, ya que todas las muestras presentan una menor expresión que el control, por lo que se puede deducir que el gen que produce el elemento de respuesta a la auxina está podría estar regulado post-transcripcionalmente en cierta medida por este miRNA. Lo mismo podría decirse para la RNA polimerasa (XM_008447114.1)(Fig. 14B), diana potencial del miR166, cuyos niveles de acumulación son ligeramente inferiores en las plantas sometidas a condiciones de estrés (Fig. 12D), aunque en este caso, debido a las deficiencias observadas en la sensibilidad de la técnica empleada, la correlación no está tan clara.

En el caso de las dianas de los miRNAs 397 y 398, lacasa (XM_008444242.1) (Fig. 14C) y cupredoxina (XM_008458647.1) (Fig. 14D) respectivamente, se observa una importante reducción de los niveles de mensajero en aquellas muestras en las que la acumulación dichos miRNAs es mayor. Así, podría decirse que dichos miRNAs actúan sobre sus dianas cortando el mRNA.

No obstante, cuantitativamente, se observa que no hay una relación directa entre los niveles de acumulación de miRNA y la reducción en los niveles de mensajero diana. Así, por ejemplo, la acumulación del mensajero de lacasa es similar en frío y sequía, aunque según nuestros datos, los niveles de miRNA son mayores en la segunda condición. El hecho de que no exista correlación entre la expresión de un miRNA y su diana no quiere decir que no se produzca una regulación por parte de los miRNAs, sino simplemente pone de manifiesto que la regulación de la expresión de los genes es mucho más compleja, interviniendo también otros factores que afectan a los procesos de transcripción y traducción.

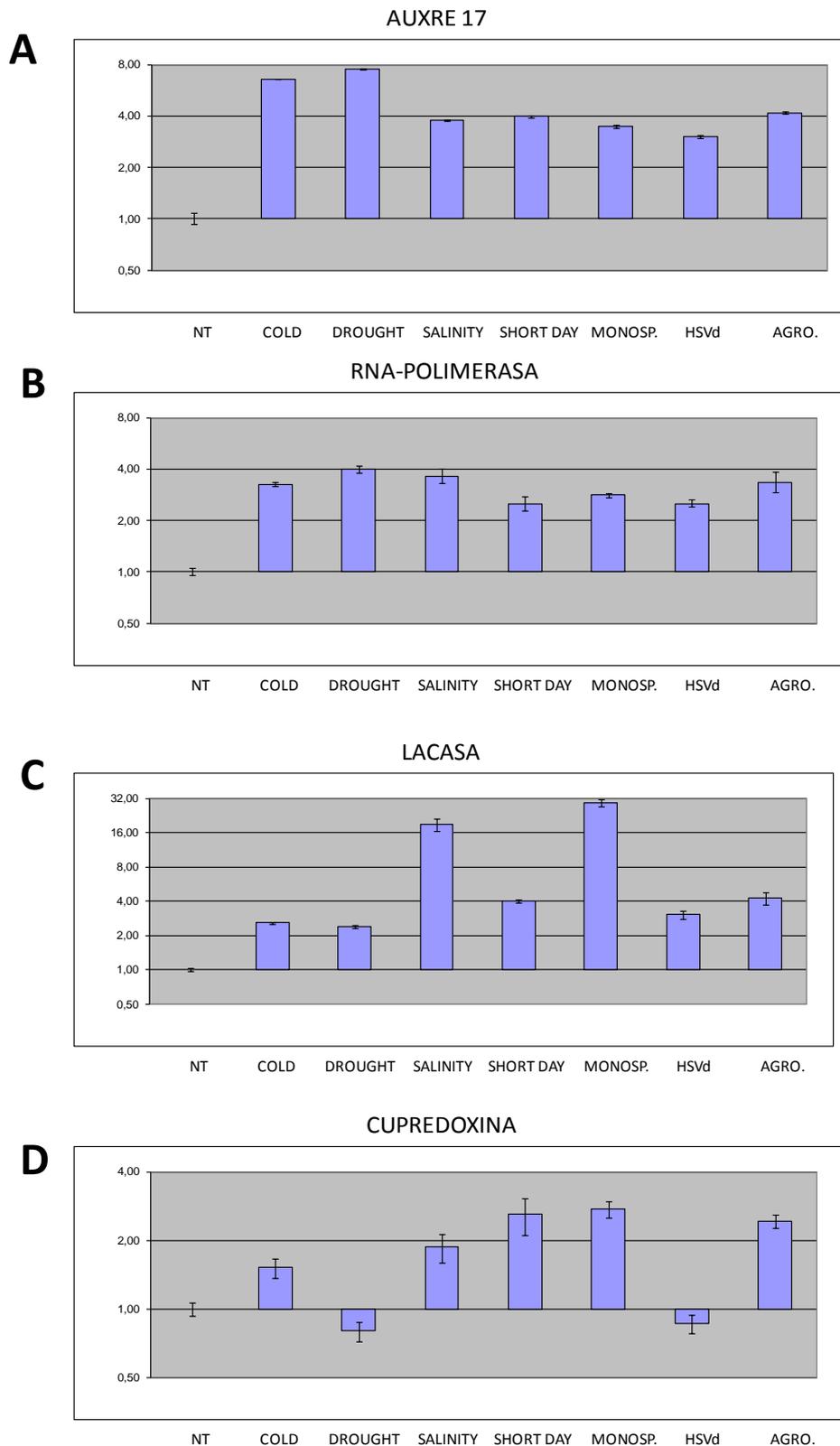


Figura 14. Resultados de la validación biológica de las posibles dianas de los miRNAs estudiados. Las gráficas muestran la expresión diferencial de los mRNAs obtenida mediante qPCR en cada uno de los diferentes estreses. Esta expresión está medida en magnitudes de cambio (FC) y representada en escala logarítmica en base 2. (A) Validación del mRNA que codifica para el factor 17 de respuesta a la auxina. (B) Validación del mRNA que codifica para la subunidad I de la RNA polimerasa. (C) Validación del mRNA que codifica para la lacasa. (D) Validación del mRNA que codifica para cupredoxina.

5. CONCLUSIONES

1. Una serie de secuencias provenientes de la secuenciación masiva de librerías de pequeños RNAs fueron amplificadas a partir de RNA total de plantas de *Cucumis melo* mediante el método *stem-loop* RT-PCR.
2. La clonación y posterior secuenciación de los productos obtenidos confirmó la validez del método empleado para la identificación de miRNAs maduros específicos.
3. El análisis de expresión diferencial de los miRNAs mediante RT-PCR a tiempo real puso de manifiesto que en la mayoría de los casos existía una correlación entre los resultados obtenidos por RT-qPCR y los obtenidos de la secuenciación masiva, lo cual sirvió para validarlos.
4. La técnica de qPCR empleada parece ser menos eficiente y sensible en la detección de pequeñas secuencias que la secuenciación masiva. Ello podría deberse al reducido tamaño del amplicón, que se encuentra por debajo del límite establecido para esta técnica.
5. El programa informático psRNA Target permitió la identificación de potenciales mRNAs diana de los miRNAs analizados por qRT-PCR. El análisis de la expresión diferencial de éstos reveló que en la mayoría de los casos existía una correlación entre una mayor expresión del miRNA y una reducción en la acumulación del transcrito diana (y viceversa), indicando que el mecanismo de regulación de los primeros podría consistir en la degradación del mensajero.
6. Los resultados obtenidos también ponen de manifiesto que en algunos casos no se pueden establecer estas correlaciones, indicando que el resultado de la interacción entre los miRNAs y sus dianas puede también estar sometida a muy diferentes tipos de regulación.

6. BIBLIOGRAFÍA

ÅKERBLOM, M.; SACHDEVA, R.; JAKOBSSON, J. (2012). Functional studies of microRNAs in neural stem cells: problems and perspectives. *Front. Neurosci.*, 6: 14.

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.

BENES, V.; CASTOLDI, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 50(4): 244-9.

BUSTIN, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23–39.

CHEN, C.; RIDZON, D.A.; BROOMER, A.J.; ZHOU, Z.; LEE, D.H.; NGUYEN, J.T.; BARBISIN, M.; LAN XU, N.; MAHUVAKAR, V.R; ANDERSEN, M.R; QIN LAO, K.; LIVAK, K.J.; GUEGLER, K.J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 33(20): e179.

CZIMMERER, Z.; HULVELY, J.; SIMANDI, Z.; VARALLYAY, E.; HAVELDA, Z.; SZABO, E.; VARGA, A.; DEZSO, B.; BALOGH, M.; HORVATH, A.; DOMOKOS, B.; TOROK, Z.; NAGY, L.; BALINT, B.L. (2013). A Versatile Method to Design Stem-Loop Primer-Based Quantitative PCR Assays for Detecting Small Regulatory RNA Molecules. *PLoS ONE*, 8(1): e55168.

DAI, X.; ZHAO, P.X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39(Web Server issue): W155–W159.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS (FAOSTAT), 2015. *Production of commodity in selected country*, Roma, Italia, visto el 24 de mayo de 2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>

GARCÍA-MAS, J.; BENJAK, A.; SANSEVERINO, W.; BOURGEOIS, M.; MIR, G.; GONZÁLEZ, V.; HÉNAFF, E.; CÂMARA, F.; COZZUTO, L.; LOWY, E.; ALIOTO, T.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; ZIARSOLO, P.; GONZÁLEZ-IBEAS, D.; RODRÍGUEZ-MORENO, L.; DROEGE, M.; DU, L.; ALVAREZ-TEJADO, M.; LORENTE-GALDÓS, B.; MELÉ, M.; YANG, L.; WENG, Y.; NAVARRO, A.; MARQUÉS-BONET, T.; ARANDA, M.A.; NUEZ, F.; PICÓ, B.; GABALDÓN, T.; ROMA, G.; GUIGÓ, R.; CASACUBERTA, J.; ARÚS, P.; PUIGDOMÈNECH, P. (2012). The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109: 11872–11877.

GONZÁLEZ, V.M.; BENJAK, A.; HÉNAFF, E.M.; MIR, G.; CASACUBERTA, J.M.; GARCIA-MAS, J.; PUIGDOMÈNECH, P. (2010a). Sequencing of 6.7 Mb of the melon genome using a BAC pooling strategy. *BMC Plant Biology*, 10: 246.

GONZÁLEZ, V.M.; GARCIA-MAS, J.; ARÚS, P.; PUIGDOMÈNECH, P. (2010b). Generation of a BAC-based physical map of the melon genome. *BMC Genomics*, 11: 339.

GONZALEZ-IBEAS, D.; BLANCA, J.; ROIG, C.; GONZÁLEZ-TO, M.; PICÓ, B.; TRUNIGER, V.; GÓMEZ, P.; DELEU, W.; CAÑO-DELGADO, A.; ARÚS, P.; NUEZ, F.; GARCÍA-MAS, J.; PUIGDOMÈNECH, P.;

- ARANDA, M.A. (2007). MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics*, 8: 306.
- HORNS, F.; HOOD, M.E. (2012). The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecology and Evolution*, 2(7): 1705–1711.
- HUANG, J.; YANG, M.; ZHANG, X. (2016). The function of small RNAs in plant biotic stress response. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58: 312–327.
- HÜTTENHOFERA, A.; SCHATNERB, P.; POLACEKA, N. (2005). Non-coding RNAs: hope or hype?. *Trends in Genetics*, 21(5): 289-97.
- 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*, 1819(2): 137–148.
- 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.
- KOYRO, H.W.; AHMAD, P.; GEISLER, N. (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: An Overview, en: *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer Science+Business Media. Nueva York, 1-28.
- KRAMER, M.F. (2011). STEM-LOOP RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 15, Unit 15.10.
- LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853– 858.
- LAU, N.C.; LIM, L.P.; WEINSTEIN, E.G.; BARTEL, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 858–862.
- LEE, R.C.; AMBROS, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294: 862– 864.
- LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843– 854.
- LI, W.; RUAN, K. (2009). MicroRNA detection by microarray. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 394: 1117-1124.
- LIM, L.P.; LAU, N.C.; WEINSTEIN, E.G.; ABDELHAKIM, A.; YEKTA, S.; RHOADES, M.W.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 17(8): 991–1008.
- LU, C.; TEJ, S.S.; LUO, S.; HAUDENSCHILD, C.D.; MEYERS, B.C.; GREEN, P.J. (2005). Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 309: 1567–1569.

- MACEDO, A.F. (2012). Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism to Productivity, en: *Abiotic Stress Responses in Plants. Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer Science+Business Media. Nueva York, 41-62.
- ROGERS, K.; CHEN, X. (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell*, 25(7): 2383–2399.
- SAINI, A.; LI, Y.; JAGADEESWARAN, G.; SUNKAR, R. (2012). Role of microRNAs in Plant Adaptation to Environmental Stresses, en: *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses. Signaling and Communication in Plants*. USA. 219-232.
- 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 Interact*, 25(6): 839-48.
- SUNKAR, R.; ZHU, J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2001– 2019.
- TANG, F.; HAJKOVA, P.; BARTON, S.C.; LAO, K.; SURANI, M.A. (2006). MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 34(2): e9.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016. *InsTAclone PCR Cloning Kit*, Waltham, Massachusetts, visto el 4 de junio de 2016. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1213>.
- VAN LEEUWEN, H.; MONFORT, A.; ZHANG H.B.; PUIGDOMÈNECH P. (2003). Identification and characterisation of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microcolinearity between *Cucumis melo* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 51(5): 703-18.
- VARKONYI-GASIC, E.; WU, R.; WOOD, M.; WALTON, E.F.; HELLENS, R.P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3: 12.
- WANG, X.; ZHANG, J.; LI, F.; GU, J.; HE, T.; ZHANG, X.; LI, Y. (2005). MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics*, 21 (18): 3610-3614.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. (1993). Post-transcriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75: 855–862.
- YANG, X.; LI, L. (2012). Analyzing the microRNA Transcriptome in Plants Using Deep Sequencing Data. *Biology*, 1(3): 297-310.
- YIN, Z.; LI, Y.; HAN, X.; SHEN, F. (2012). Genome-Wide Profiling of miRNAs and Other Small Non-Coding RNAs in the *Verticillium dahliae*–Inoculated Cotton Roots. *PLoS ONE*, 7(4): e35765.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G.P.; ANDERSON, T.A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology*, 289(1): 3-16.

ZHANG, B. (2015). MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 66: 1749–1761.

7. ANEXO

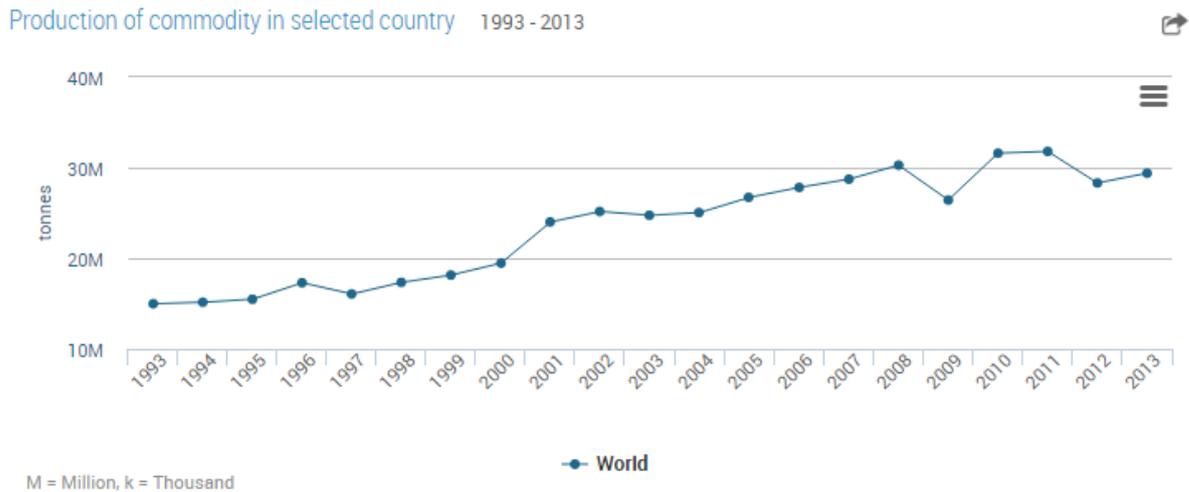


Figura S1. Producción mundial de melón entre los años 1993 y 2013. (FAOSTAT, 2015)

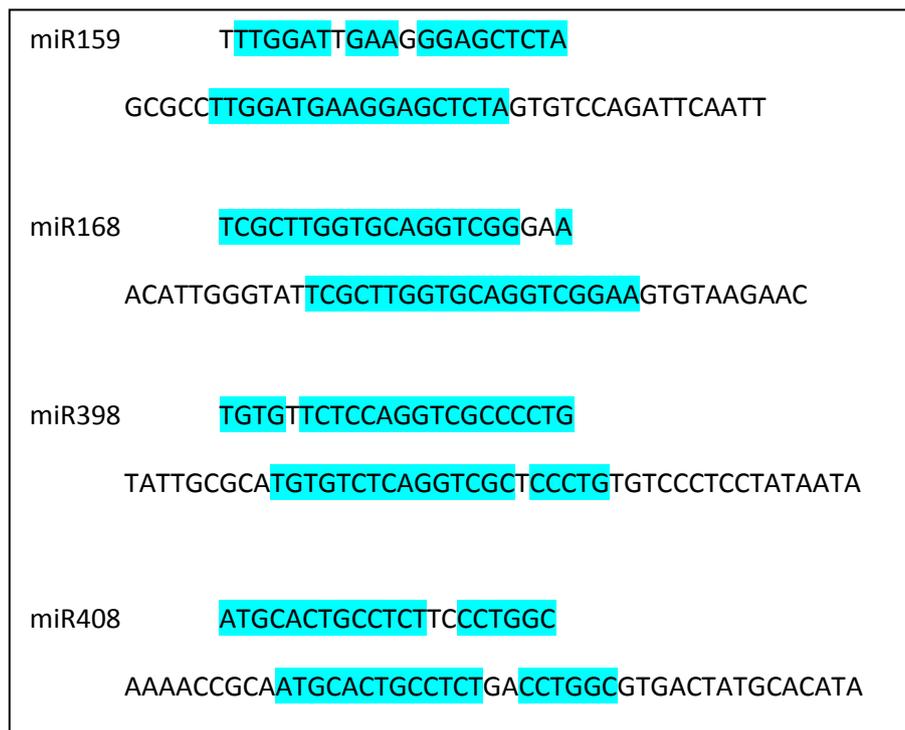


Figura S2. Resultados de la secuenciación realizada tras la PCR de algunos de los miRNAs estudiados. La primera secuencia es la obtenida a partir de las librerías; la segunda es la obtenida tras la secuenciación después de haber realizado la amplificación. En azul se muestran las partes de las secuencias que coinciden.

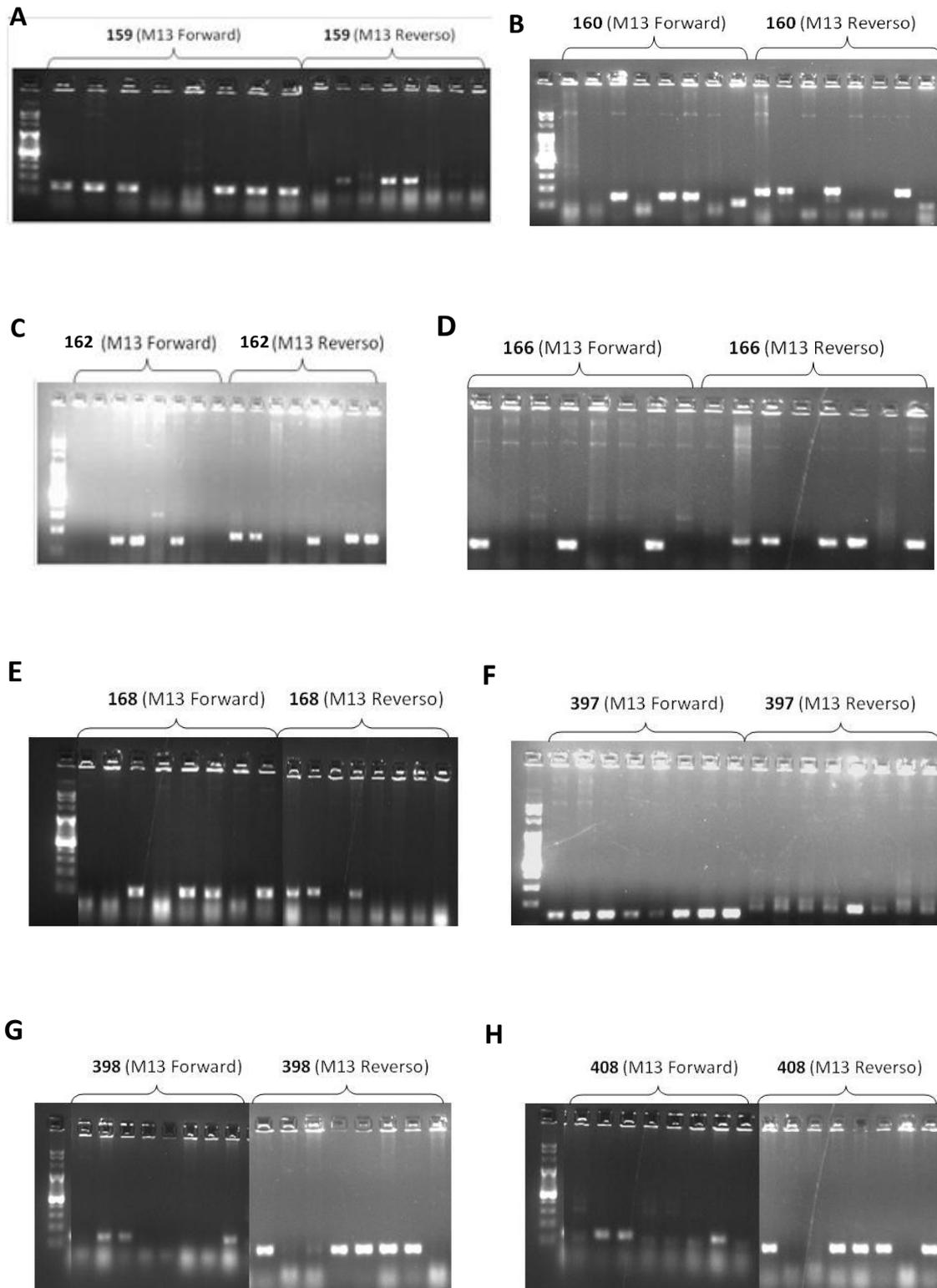


Figura S3. Resultados de las electroforesis en gel de agarosa para la detección de los clones de los distintos miRNAs. (A) Clones del miRNA 159; en la parte izquierda, a partir del cebador M13 directo y en la derecha, a partir del cebador M13 reverso. (B) Clones del miRNA 160. (C) Clones del miRNA 162. (D) Clones del miRNA 166. (E) Clones del miRNA 168. (F) Clones del miRNA 397. (G) Clones del miRNA 398. (H) Clones del miRNA 408.

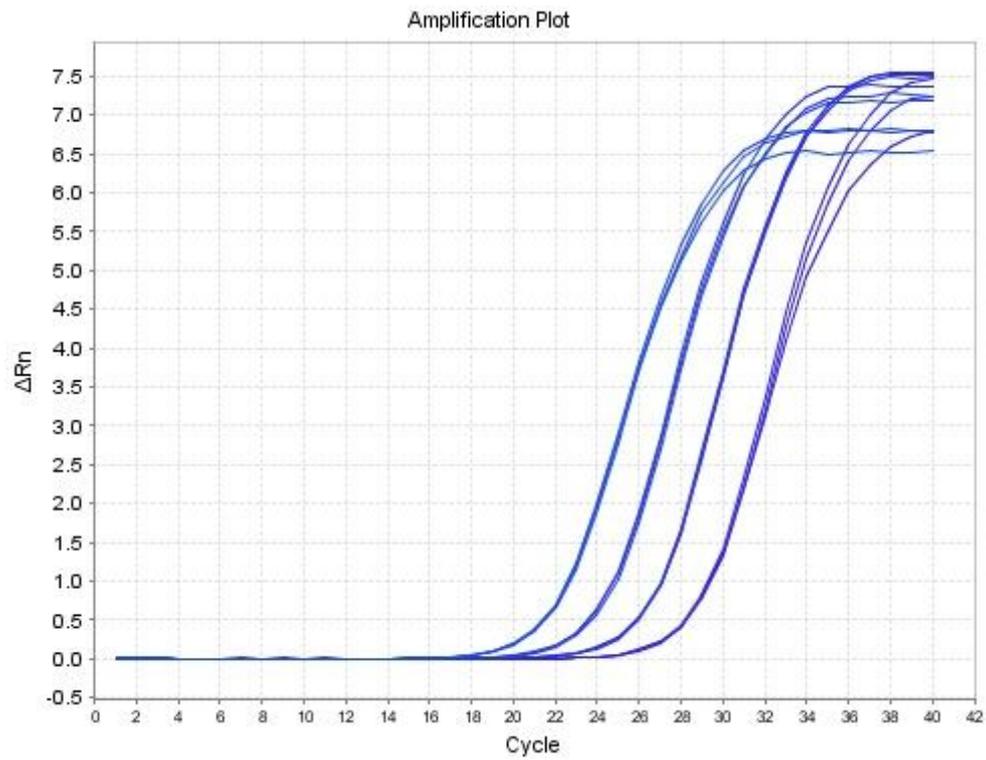


Figura S4. Curva de eficiencia del miRNA159. Cada una de las curvas representa una dilución, siendo la primera curva la muestra menos diluida. Se observa como la distancia entre las diferentes curvas es proporcional por lo que la eficiencia de la reacción es aceptable.